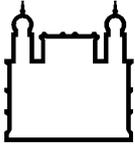


INSTITUTO CARLOS CHAGAS  
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

ANA LUISA KALB LOPES

CURITIBA/PR  
2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

*ANA LUISA KALB LOPES*

Análise do transcrito do *Trypanosoma cruzi* e da célula hospedeira durante o processo de infecção

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA/PR

2013

ii

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L864 Lopes, Ana Luisa Kalb

Análise do transcrito do *Trypanosoma cruzi* e da célula hospedeira durante o processo de infecção / Ana Luisa Kalb Lopes. – Curitiba, 2014.

xvii, 121 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 105-113

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Interação parasita-hospedeiro. 3. Sequenciamento em larga escala. 4. Transcritoma. I. Título.

CDD 616.9363



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Carlos Chagas  
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e  
Biotecnologia  
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775  
Cidade Industrial / 81350-010 Curitiba, PR  
Tel. / Fax: (041) 3316-3230 / 3316-3267

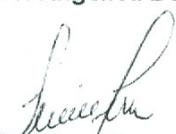


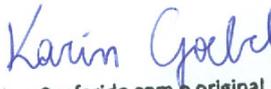
Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de **Mestre** em  
Biociências e Biotecnologia.

Aos vinte e seis dias do mês de agosto de dois mil e treze, às quatorze horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra Angélica Beate Winter Boldt, Iriane Eger e Juliano Bordignon, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata Ana Luisa Kalb Lopes, intitulada: "**Análise do transcrito do Trypanosoma Cruzi e da célula hospedeira durante o processo de infecção**", para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia. O candidato teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Juliano Bordignon**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela "**APROVAÇÃO**.....", habilitando-a ao título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da Banca Examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

  
**Prof. Dr. Juliano Bordignon**  
ICC

  
**Prof. Dr. Angélica Beate Winter Boldt**  
UFPR

  
**Prof. Dr. Iriane Eger**  
UEPG

  
Conferido com o original

**Karin Goebel**  
Analista de Gestão em Saúde  
Matrícula Siape 1956267  
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz PR

  
**Beatriz de Oliveira**  
Secretária Acadêmica  
Programa de Pós-Grad. em Biociências e Biotecnologia  
Instituto Carlos Chagas  
FIOCRUZ - PR



À Deus  
Aos meus pais  
Ao meu amado Cris

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Daniela Parada Pavoni pela orientação e apoio e confiança depositada a mim desde meus primeiros passos na ciência.

Ao Dr. Christian Probst pela grande ajuda, ensinamentos e discussões em diversas etapas deste projeto e pelas análises bioinformática.

Ao pessoal do laboratório de genômica pelo companheirismo e por compartilhar momentos agradáveis ao longo desta jornada. À Rita, pelos ensinamentos, apoio nos experimentos e por se importar com este projeto.

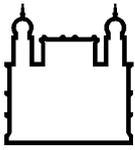
À Dra. Mirian Pereira pela disposição e apoio que foram fundamentais neste projeto e a todos do Lab de Ultraestrutura Celular que de alguma maneira ajudaram neste projeto.

A minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando. Aos meus pais pelo seu amor. Ao meu amor Cristhiano, que sempre está ao meu lado compartilhando momentos de alegria. À minha Irmã pela companhia e me entender como cientista. Amo muito vocês!

A Deus que tem me amado, me capacitado e me inspirado.

A Capes e Fiocruz pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

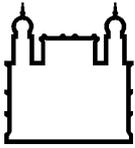
### ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DO *TRYPANOSOMA CRUZI* E DA CÉLULA HOSPEDEIRA DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Ana Luisa Kalb Lopes**

O processo de infecção nas células mamíferas pelo *T. cruzi* envolve uma série de etapas que geram mudanças estruturais, funcionais e bioquímicas na célula hospedeira e no parasita como reflexo de uma série de alterações na expressão gênica. Dentre as tecnologias mais recentes que permitem a análise dessas alterações gênicas em grande escala, estão as tecnologias de sequenciamento do RNA (RNA-Seq). Estas permitem a identificação de todos os transcritos de um sistema celular, incluindo aqueles pouco representados, como os de um parasita durante o processo de infecção. O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação do perfil da expressão gênica tanto do *T. cruzi* como da célula hospedeira através da tecnologia de sequenciamento em larga escala. Para tal propósito utilizamos a linhagem celular Vero e as cepas Dm28c e Y do *T. cruzi* e avaliamos o transcrito de ambas as células durante a infecção através da tecnologia de RNA-Seq com o equipamento SOLiD (Applied Biosystems). Os pontos avaliados ao longo da cinética de infecção foram 2, 6, 24 e 48 h pós infecção. Um grande número de genes diferencialmente expressos foi identificado na célula hospedeira, totalizando 1061 e 831 genes nas infecções com Dm28c e Y, respectivamente. Esses genes foram relacionados principalmente com a resposta imune, o ciclo celular e sua regulação e metabolismo energético. Os genes modulados positivamente na célula hospedeira durante a infecção foram relacionados à resposta imune como, quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias, e ao metabolismo celular, principalmente à  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Por outro lado, os genes com expressão diminuída estão envolvidos no ciclo celular com papel regulatório na progressão das fases do ciclo e no processo de replicação do DNA. Além disso, foram identificados genes modulados envolvidos na apoptose e citoesqueleto. Este trabalho foi pioneiro ao estudar a modulação do transcrito do parasita durante a infecção na interação *T. cruzi*-célula hospedeira. Ao todo 2372 genes foram identificados como modulado em Dm28c e 1233 a cepa Y, dentre os quais, cerca de 46 % foram identificados como proteínas hipotéticas. Proteínas de superfície celular que desempenham importante papel na adesão com a célula hospedeira foram reprimidos durante a infecção e representaram 20 % dos genes modulados. Os genes com expressão aumentada em 24 horas para Dm28c e em 6 horas para Y estão envolvidos no metabolismo energético e divisão celular. A infecção com ambas as cepas do *T. cruzi* levou a uma mudança no transcrito da célula hospedeira de maneira muito semelhante apesar da diferença no perfil de infecção. Além disso, as cepas do *T. cruzi* demonstraram utilizar vias de sinalização comuns e particulares durante o processo de infecção.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

### **ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DO *TRYPANOSOMA CRUZI* E DA CÉLULA HOSPEDEIRA DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

The process of infection in mammalian cells by *T. cruzi* involves a series of steps which generate structural, biochemical and functional changes in the host cell and the parasite as a result of a series of changes in gene expression. Among the latest methodologies available to analyze large scale gene alterations are the RNA sequencing technology (RNA-Seq). This allows the identification of all transcripts of a cellular system, including those underrepresented, such as a parasite during intracellular infection. The main objective of this study was to evaluate the gene expression profile of both *T. cruzi* and the mammalian cell during the infection by large scale sequencing technology. For this purpose we use the Vero cell culture and Dm28c and Y strains of *Trypanosoma cruzi* and evaluated the transcriptome of both cells during infection by RNA-Seq technology with equipment SOLiD (Applied Biosystems). The infection kinetic was evaluated 2, 6, 24 and 48 h after infection. Significant number, 1061 and 831, of differentially expressed genes were identified in the host cell in infection with Dm28c and Y, respectively. These genes were mainly related to the immune response, cell cycle and its regulation and energetic metabolism. Positively modulated genes in the host cell during infection were related to immune response as chemokines and cytokines pro and anti-inflammatory, and cellular metabolism, mainly in  $\beta$ -oxidation of fatty acids. On the other hand, genes with decreased expression are involved in cell cycle regulation with role in the progression of the cell cycle stages and on DNA replication process. In addition, modulated genes involved in apoptosis and cytoskeleton were identified. This study was pioneer on the modulation of transcriptome parasite during infection in the interaction *T. cruzi*-host cell. In all 2372 genes were identified as modulated in Dm28c and 1233 in Y strain, among which about 46% were identified as hypothetical proteins. Cell surface proteins that play an important role in adherence with the host cell were repressed during the infection, which represented 20 % of modulated genes in parasite. Genes with increased expression in 24 hours to Dm28c and 6 hours for Y are involved in energetic metabolism and cell division. The infection with both strains of *T. cruzi* led to change in the transcriptome of the host cell in a manner very similar despite the difference in the profile of infection. Furthermore, the strains of *T. cruzi* demonstrated use common and particular signaling pathways during the infection process.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 As três principais formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
Figura 1. 2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	21
Figura 1. 3 Modelo dos mecanismos de invasão, dependente e independente de lisossomos, do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	27
Figura 1. 4 Porcentagem de <i>reads</i> que mapearam no genoma do <i>T. cruzi</i> .	35
Figura 1. 5 Fragmento de DNA após o preparo das bibliotecas.	36
Figura 1. 6 PCR em emulsão.	36
Figura 1. 7 Sequenciamento plataforma SOLiD	37
Figura 1. 8 Sistema <i>color space</i> utilizado na plataforma SOLiD	38
Figura 3. 1 Preparo das bibliotecas de RNA-Seq (SOLiD).	46
Figura 4.1 Perfil de infecção das células Vero durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> Dm28c coradas com Giemsa.	51
Figura 4.2 Perfil de infecção das células Vero durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> Y coradas com Giemsa.	52
Figura 4.3 Porcentagem de células Vero infectadas com <i>T. cruzi</i> Dm28c durante a cinética de infecção.	52
Figura 4.4 Relação de parasitas intracelulares/100 células Vero durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> Dm28c.	53
Figura 4.5 Porcentagem de células Vero infectadas com <i>T. cruzi</i> Y durante a cinética de infecção.	53
Figura 4.6 Relação de parasitas intracelulares/100 células Vero durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> Y.	53
Figura 4. 7 Eletroferograma do RNA total obtido pelo Agilent 2100 Bioanalyzer das amostras infectadas Y24B e Dm2B.	55
Figura 4. 8 Sequência do miniéxon de <i>T. cruzi</i> e o esquema das 3 sondas complementares ao miniéxon (ME).	56
Figura 4. 9 Gráfico de amplificação obtido na PCR em tempo real para os genes actina (A) e 18S (B).	56
Figura 4. 10 Eletroferograma obtido pelo Agilent 2100 Bioanalyzer da amostra Y6B.	59
Figura 4. 11 Porcentagem de <i>reads</i> que mapearam no genoma de <i>T. cruzi</i> .	64
Figura 4. 12 <i>Clusters</i> de genes diferencialmente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y.	67
Figura 4.13 <i>Clusters</i> de genes diferencialmente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y.	68

Figura 4.14 Clusterização dos genes diferencialmente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y. ....	68
Figura 4.15 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 1.....	70
Figura 4. 16 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 2.....	70
Figura 4.17 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 3.....	71
Figura 4.18 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 4.....	71
Figura 4.19 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 5.....	73
Figura 4.20 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 6.....	74
Figura 4. 21 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 7.....	74
Figura 4. 22 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 8.....	75
Figura 4.23 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 9.....	76
Figura 4.24 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 10.....	76
Figura 4.25 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 11.....	77
Figura 4.26 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 12.....	78
Figura 4.27 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 13.....	79
Figura 4.28 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 14.....	79
Figura 4.29 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 15.....	80
Figura 4.30 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 16.....	81
Figura 4.31 Via de sinalização TGF- $\beta$ enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	82
Figura 4.32 Via de sinalização TNF enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	82
Figura 4.33 Via de sinalização NF-KappaB enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	83
Figura 4.34 Via de sinalização PI3K-Akt enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	84
Figura 4.35 Via de sinalização MAPK enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	84
Figura 4.36 Clusters de genes diferencialmente expressos no <i>T. cruzi</i> cepa Dm28c e Y durante a infecção de parasitas Dm28c e Y.....	87
Figura 4.37 Gráfico do padrão de modulação de genes de superfície celular de Dm28c e Y durante a infecção.....	87
Figura 4.38 Gráfico do padrão de modulação de genes da família MASP Dm28c e Y durante a infecção.....	88
Figura 4.39 Gráfico da expressão gênica do <i>cluster</i> 4, 5 e 12 de <i>T. cruzi</i> . ....	89

Figura 4.40 Gráfico do padrão de modulação de genes envolvidos no metabolismo energético em Dm28c e Y durante a infecção.....	90
Figura 4.41 Gráfico do padrão de modulação de genes envolvidos na divisão celular em Dm28c e Y durante a infecção..	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Sequência nucleotídica dos pares de <i>primers</i> utilizados na reação PCR em tempo real. ....	43
Tabela 4.1 Número de integridade do RNA total.....	54
Tabela 4.2 Quantidade de RNA das amostras após a amplificação com sequência de oligo dT e miniéxon.....	58
Tabela 4.3 Quantidade de sequências geradas pelo RNA-Seq.....	60
Tabela 4.4 Quantidade de <i>reads</i> mapeadas e a sua porcentagem em <i>Homo sapiens</i> e em <i>T. cruzi</i> .....	62
Tabela 4.5 Quantidade de genes diferencialmente expressos na célula hospedeira.....	65
Tabela 4.6 Genes diferencialmente expressos em <i>T. cruzi</i> durante a infecção na célula Vero.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt: serina/treonina quinase  
aRNAs: RNAs amplificado  
cDNA: DNA complementar  
CPC: *chromosomal passenger complex*  
DEG: Genes Diferencialmente Expressos  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
DNase: desoxirribonuclease  
dNTP: desoxiribonucleosídeo trifosfato  
edger: *empirical digital gene expression analysis using R*  
EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético  
ePCR: PCR de emulsão  
FDR: *false discovery rate*, taxa de descoberta falsa  
g: aceleração da gravidade  
GPI: glicosilfosfatidilinositol  
GO: *Gene Ontology*  
IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato  
ME: miniéxon  
miRNAs: micro RNAs  
mRNA: RNA mensageiro  
oligo dT: oligonucleotideo poli-T  
PBS: solução salina tamponada com fosfato  
PCR: reação em cadeia pela polimerase  
PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*  
PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase  
RIN: índice de integridade do RNA  
RNA: ácido ribonucléico  
RNase: ribonuclease  
RNA-Seq: sequenciamento do RNA  
RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute  
SFB: soro fetal bovino  
SOLiD: *Sequencing by oligonucleotide ligation and detection*  
SOM: *Self organizing map*, mapas auto-organizados  
Reads: pequenas sequencias geradas no sequenciamento  
MASP: proteínas de superfície associadas à mucina  
TASV: Tripomastigota, proteínas ricas em Alanina, Serina e Valina  
WGS : *whole genome shotgun*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.....	16
1.2 Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.....	19
1.3 Genoma e expressão gênica do T. cruzi .....	21
1.4 Interação Trypanosoma cruzi – célula hospedeira .....	23
1.4.1 Adesão celular e reconhecimento .....	24
1.4.2 Invasão do <i>Trypanosoma cruzi</i> na célula hospedeira .....	26
1.5 Avaliação da interação patógeno-hospedeiro em larga escala .....	28
1.6 Plataforma SOLiD .....	35
2 OBJETIVO .....	39
2.1 Objetivos específicos.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	40
3.2 OBTENÇÃO DOS PARASITAS.....	40
3.3 INTERAÇÃO T. CRUZI-CÉLULA HOSPEDEIRA.....	40
3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	41
3.5 ISOLAMENTO DO RNA MENSAGEIRO.....	42
3.6 PCR EM TEMPO REAL.....	42
3.7 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO.....	43
3.7.1 Síntese do cDNA fita dupla com oligo(dT).....	43
3.7.2 Síntese do cDNA fita dupla com miniéxon.....	44
3.7.3 Transcrição <i>in vitro</i> .....	45
3.8 RNA-SEQ.....	45
3.8.1 Preparo das bibliotecas .....	45
3.8.2 Preparo das esferas magnéticas para sequenciamento.....	47
3.8.3 Deposição das esferas e sequenciamento .....	48
3.9 ANÁLISES DOS DADOS .....	48
4 RESULTADOS .....	50
4.1 Perfil de infecção com parasitas cepa Dm28c e Y .....	50
4.2 Extração do RNA e captura do mRNA do Trypanosoma cruzi .....	54
4.3 Sequenciamento e alinhamento nos genomas de referência.....	59

4.4 Genes Diferencialmente Expressos (DEG) na célula Vero .....	64
4.5 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos na célula Vero.....	66
4.5.1 <i>Cluster</i> 1 .....	69
4.5.2 <i>Cluster</i> 2 .....	70
4.5.3 <i>Cluster</i> 3 .....	70
4.5.4 <i>Cluster</i> 4 .....	71
4.5.5 <i>Cluster</i> 5 .....	72
4.5.6 <i>Cluster</i> 6 .....	73
4.5.7 <i>Cluster</i> 7 .....	74
4.5.8 <i>Cluster</i> 8 .....	75
4.5.9 <i>Cluster</i> 9 .....	75
4.5.10 <i>Cluster</i> 10 .....	76
4.5.11 <i>Cluster</i> 11 .....	77
4.5.12 <i>Cluster</i> 12 .....	77
4.5.13 <i>Cluster</i> 13 .....	78
4.5.14 <i>Cluster</i> 14 .....	79
4.5.15 <i>Cluster</i> 15 .....	80
4.5.16 <i>Cluster</i> 16 .....	80
4.6 Análises de vias de enriquecimento .....	81
4.6 Genes Diferencialmente Expressos (DEG) em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	85
5 DISCUSSÃO .....	92
5.1 RNA-Seq: célula hospedeira .....	94
5.1.1 Resposta imune.....	95
5.1.2 Divisão celular.....	97
5.1.3 Metabolismo energético .....	98
5.1.4 Apoptose.....	100
5.2 RNA-Seq: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	101
6 CONCLUSÕES .....	105
7 PERSPECTIVAS .....	106
8 BIBLIOGRAFIA .....	107

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado unicelular pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida. Dentro desta família, o gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes em termos de saúde pública, por incluir diferentes espécies causadoras de importantes doenças humanas, como o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, e o *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. b. gambiense*, ambos agentes da doença do sono (HIDE, 1999).

A doença de Chagas foi descrita em 1909 por Carlos Chagas, o qual detalhou o ciclo de transmissão e as manifestações clínicas (CHAGAS, 1909). Notavelmente, relatos da doença de Chagas precedem a sua descoberta. Há evidências de infecção humana em múmias da região do deserto de Atacama de 9000 anos atrás (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Além disso, é possível que Charles Darwin tenha se infectado com *T. cruzi* durante sua expedição pela América do Sul em 1835 onde teve contato com triatomíneos (BERNSTEIN, 1984). Apesar do ciclo silvestre do *T. cruzi* já existir na natureza há milhões de anos, a sua adaptação a habitações humanas começou com o ciclo agrícola e se intensificou com a pecuária, através do desmatamento crescente e remoção dos animais selvagens. Com a domiciliação do inseto vetor, sobretudo o *Triatoma infestans*, desenvolveu-se o ciclo doméstico da doença de Chagas sendo o homem um hospedeiro definitivo (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004; COURA e DIAS, 2009).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), estima-se que existam 10 milhões de infectados na América Latina, com cerca de 25 milhões de pessoas sob risco de transmissão. A doença de Chagas representa a principal causa de aposentadoria antecipada devido a lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente produtivos nos países endêmicos da América Latina (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). Além disso, o recente fluxo de imigrantes de países endêmicos fez com que a doença de Chagas se tornasse um importante problema de saúde pública nos Estados Unidos, Canadá e várias partes da Europa (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. De acordo com o Ministério da Saúde (2012) no período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda.

Há diferentes vias de transmissão da doença, dentre as quais se destaca a vetorial que foi responsável pela grande maioria dos casos registrados antes das ações de combate ao inseto vetor. Nessa via, a transmissão acontece pelo contato do hospedeiro vertebrado com as excretas contaminadas do inseto o qual pertence à família Reduviidae, subfamília Triatominae (BRENER, 1973). Embora possuam hábitos diversos, todas as espécies de triatomíneos são potencialmente vetoras do *T. cruzi*. No Brasil, 52 espécies foram descritas, mas apenas cinco têm importância sob o ponto de vista epidemiológico: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. As demais espécies mantêm o ciclo natural em mamíferos silvestres como marsupiais, carnívoros, morcegos e primatas. Esse mecanismo de transmissão ainda pode ser responsável por 70% dos casos em países onde os programas de controle vetorial são incipientes ou ainda inexistentes, como Colômbia, Costa Rica e México (COURA e DIAS, 2009).

Além da via vetorial há a via transfusional, a congênita e, de menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgão e acidentes de laboratório (SCHMUÑIS, 2000). Todavia, recentemente, a transmissão por via oral tem sido responsável por um número significativo dos casos agudos da doença (COURA e CASTRO, 2002), principalmente na região Amazônica. Nos últimos anos foram registrados vários casos de contração da doença a partir da ingestão, por exemplo, de suco de açaí nos Estados do Pará e Bahia (NÓBREGA *et al.*, 2009), caldo de cana em Santa Catarina (STEINDEL *et al.*, 2008) e suco de goiaba na Venezuela (TOSO, VIAL e GALANTI, 2011) contaminados com formas infectivas do parasita. Dos casos registrados no Brasil no período de 2000 a 2011, a transmissão pela via oral foi responsável por 70%. A via transfusional tem se tornado o principal mecanismo de transmissão da doença em países não endêmicos como os Estados Unidos e Espanha (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2012) e podem ocorrer em até 20% nos países endêmicos sem controle dos bancos de sangue, como a Bolívia (COURA e DIAS, 2009).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Logo após a infecção e um período de incubação, inicia-se a fase aguda, usualmente rápida e com elevada parasitemia, podendo ser assintomática. Quando presente, os sintomas podem ser febre, cefaleia, edema, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e cardiopatia aguda. Os sintomas aparecem de uma a duas semanas após a infecção via vetorial ou alguns meses após a transfusão de sangue contaminado, e desaparecem espontaneamente em 90% dos casos (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010). O conjunto e a intensidade dos sintomas são bastante variáveis de caso a caso e a duração desta fase é de aproximadamente quatro a doze semanas. Dependendo da intensidade dos sintomas, pode

ocorrer a morte por insuficiência cardíaca ou meningoencefalite, principalmente em crianças (2 a 8% dos casos) (COURA, 2007).

O *T. cruzi* é capaz de invadir e se multiplicar em vários tipos celulares, como macrófagos, células musculares lisas e estriadas, fibroblastos e células nervosas. A ruptura das células infectadas causa inflamação e ao longo do desenvolvimento da infecção pode-se observar inflamação severa acompanhada de necrose de células parasitadas e não parasitadas, especialmente no coração (COURA e CASTRO, 2002). Degranulação de eosinófilos, patologias microvasculares, edema, trombose, coagulação sanguínea e isquemia também foram observados (ANDRADE, 1999). No final da fase aguda, o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer e os níveis de imunoglobulinas do tipo IgM decrescem enquanto as do tipo IgG sobem dando início à fase crônica (DIAS, 2000). O paciente normalmente apresenta imunidade contra o *T. cruzi*, mas permanece infectado. Alguns parasitas escapam do sistema imune do hospedeiro e lesões inflamatórias focais podem ser vistas em vários órgãos (ANDRADE, 1999).

A evolução da fase crônica é lenta e pode durar um período de anos ou décadas. Cerca de 60 – 70% dos casos agudos da doença de Chagas evoluem para a chamada forma crônica indeterminada, na qual os pacientes não apresentam sintomas ou exames clínicos alterados (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010). Por outro lado, os 30% dos pacientes remanescentes desenvolvem a forma crônica determinada, os quais podem apresentar uma variedade de estados clínicos, incluindo distúrbios cardíacos (megacárdio), digestivos (megaesôfago e megacólon) ou neurológicos. A forma cardíaca apresenta arritmias cardíacas, cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, enquanto na forma digestiva são observadas desordens gastrointestinais, que se manifestam como disfagia, quando há megaesôfago, e como constipação intestinal, quando há megacólon (DIAS, 2000).

As principais e mais efetivas formas de controle da doença ocorrem através de combate químico aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue e educação em saúde (DIAS, 2009). Os fármacos benzonidazol e o nifurtimox são utilizadas no tratamento da doença de Chagas, no entanto, o tratamento é complexo e difícil na fase crônica, apresentando melhores resultados na fase aguda da doença, em pacientes com infecção recente (CANÇADO, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2006; DIAS, 2007). Nenhum desses medicamentos atende aos critérios da Organização Mundial da Saúde para o tratamento da doença de Chagas, dentre eles a promoção da cura parasitológica nas fases aguda e crônica, acessibilidade aos pacientes e ausência de efeitos colaterais. Ambos os medicamentos apresentam cura em cerca de 80% dos casos na fase aguda e 20% na fase crônica. No Brasil, o nifurtimox está indisponível ao paciente e o

benzonidazol é restrito a clínicas especializadas. Além disso, ambos os medicamentos causam várias reações colaterais devido à sua toxicidade que afeta tanto o parasita quanto as células do paciente (COURA *et al.*, 2009).

## 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* alterna entre diferentes formas evolutivas, as quais podem ser classificadas de acordo com a morfologia geral da célula: posição do cinetoplasto, região especializada da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial; posição da bolsa flagelar em relação ao núcleo e localização nos hospedeiros. Segundo estes critérios, há três formas evolutivas do *T. cruzi* bem definidas (figura 1.1): epimastigota, tripomastigota e amastigota. Os epimastigotas (figura 1.1 B), formas replicativas, são encontrados no intestino do hospedeiro invertebrado, podendo também ser facilmente cultivados em meios axênicos. Têm como características o corpo celular alongado, 20-40 µm de comprimento, flagelo anterior e cinetoplasto em forma de bastão anterior ao núcleo. Já os tripomastigotas (figura 1.1 C) apresentam o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, com o flagelo emergindo lateralmente à bolsa flagelar e aderindo ao longo do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior. Possuem cerca de 25 µm de comprimento e são encontrados na região posterior do intestino e nas fezes do hospedeiro invertebrado bem como no sangue do hospedeiro vertebrado. Essa forma se caracteriza por ser infectiva e não replicativa (DE SOUZA, 2002). Os amastigotas (figura 1.1 A), por sua vez, são encontrados no interior das células de mamíferos onde se replicam, apresentam morfologia arredondada com 3-5 µm de diâmetro (TYLER e ENGMAN, 2001), flagelo curto e cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo. Os amastigotas, além de serem formas replicativas, têm a capacidade de infectar os tecidos no hospedeiro vertebrado (VICTORIA *et al.*, 1988).

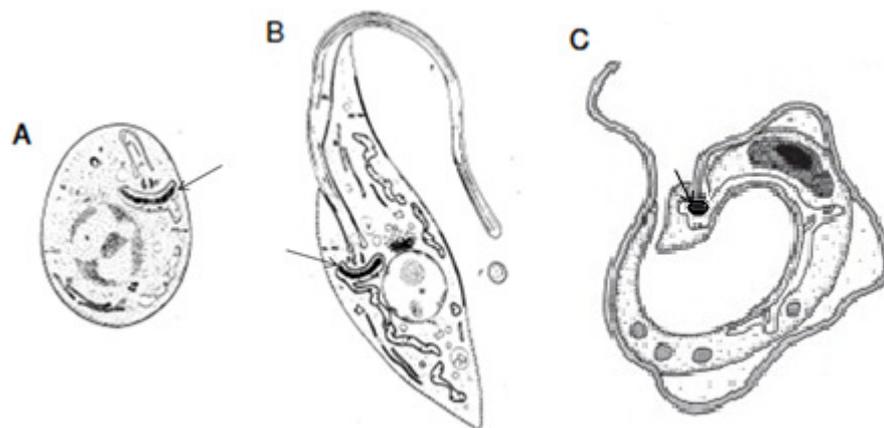


Figura 1. 1 As três principais formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Representação esquemática das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C). O cinetoplasto está indicado pela seta. (modificado de <http://lineu.icb.usp.br/~gwunder/3tripanosomiaseAmericana.ppt>).

Durante seu ciclo de vida (figura 1.2), o *T. cruzi* alterna entre o hospedeiro intermediário (inseto vetor) e o hospedeiro definitivo (mamífero) (CHAGAS, 1909). Essa interação parasita – hospedeiro é bastante dinâmica, dependendo de diversos fatores ligados ao *T. cruzi*, como cepa, virulência e inóculo, e a espécie de mamífero (DIAS, 2000).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo de vida do *T. cruzi* é iniciado quando o inseto vetor se alimenta de sangue de um vertebrado infectado com as formas tripomastigotas sanguíneas presentes na circulação. Uma vez ingeridos, a maioria dos parasitas são lisados no tubo digestório do inseto e os tripomastigotas sobreviventes diferenciam-se na forma replicativa epimastigota. Estes migram para o intestino onde sofrem sucessivas divisões, fenômeno observado cerca de 25 horas após o repasto sanguíneo. Em seguida, migram para a região mais posterior, atingindo o reto e aderem à membrana perimicrovilar. A adesão ocorre predominantemente pelo flagelo. Os parasitas aderidos sofrem alongamento e torção e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, processo este conhecido como metaciclogênese (revisto por DE SOUZA, 2000). Esse processo de adesão parece ser importante para o processo de diferenciação (BONALDO *et al.*, 1988; ALVES *et al.*, 2007). Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas excretas dos triatomíneos durante a hematofagia e podem atingir um hospedeiro vertebrado através da mucosa, lesão ou até mesmo pelo local da picada.

A forma tripomastigota pode potencialmente penetrar em qualquer tipo de célula. Após a penetração celular, o parasita pode ser encontrado no vacúolo parasitóforo. Imediatamente, inicia-se um processo de transformação para a forma amastigota e de rompimento da membrana do vacúolo parasitóforo. Livre no citoplasma, a forma amastigota inicia o processo de divisão celular aproximadamente 24 horas após a infecção. O processo de

divisão contínua, em média, a cada 12 horas e se estende por 4 a 5 dias, dependendo da cepa. Neste momento, ocorre o processo de transformação das formas amastigotas para tripomastigotas sanguíneas. Logo que as formas adquirem um flagelo longo, inicia-se um movimento intenso que, aparentemente, é responsável pela ruptura da célula hospedeira. Uma vez que as formas tripomastigotas são liberadas da célula hospedeira, alcançam a corrente sanguínea e podem, por sua vez, infectar novas células ou serem ingeridas por um novo inseto vetor (TYLER e ENGMAN, 2001; DE SOUZA, DE CARVALHO e BARRIAS, 2010).

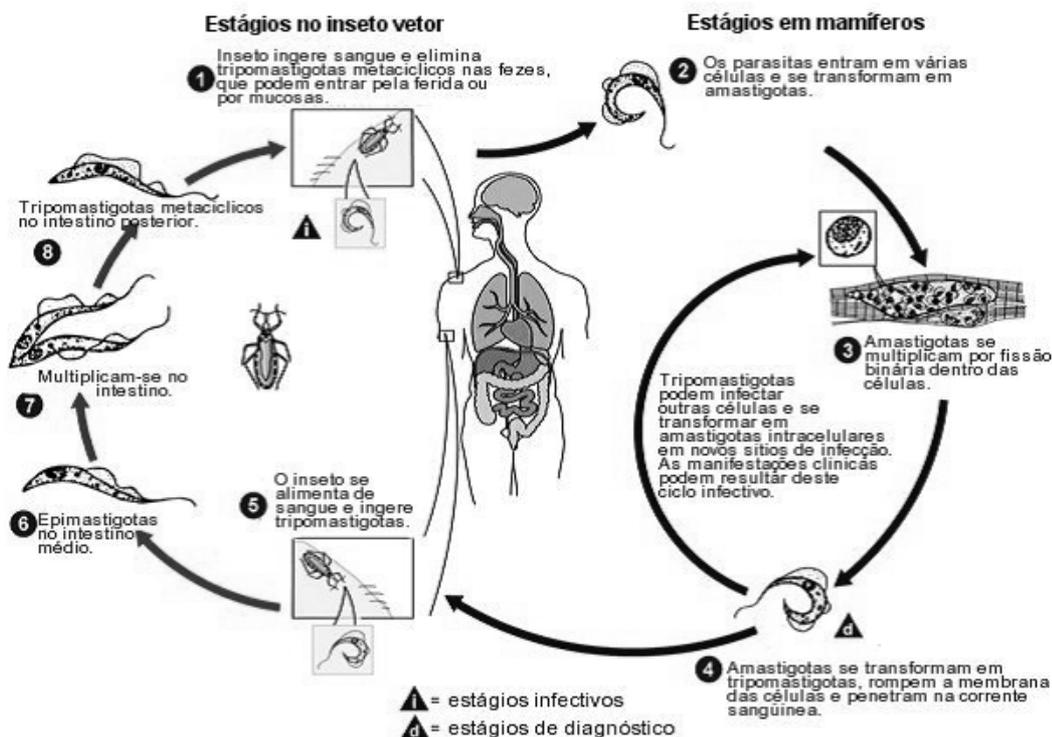


Figura 1. 2 Ciclo de vida do *T. cruzi*. (Modificado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

### 1.3 Genoma e expressão gênica do *T. cruzi*

O genoma do *T. cruzi* foi sequenciado em 2005 através de um consórcio internacional sendo o clone CL Brener selecionado como cepa referência por ser bem caracterizado experimentalmente. O sequenciamento foi obtido através da estratégia WGS (*whole genome shotgun*) e os resultados indicaram a existência de 22570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12570 representam pares de alelos. Foi possível atribuir função a 50,8% dos genes codificadores de proteínas preditos com base em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas ou na presença de domínios funcionais característicos. Mais de 50% do genoma é repetitivo, sendo constituído principalmente por famílias gênicas de proteínas de

superfície, retrotransposons e sequências teloméricas. As maiores famílias gênicas codificam proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), membros da superfamília de transsialidases, mucinas e a glicoproteína de superfície gp63, as quais são frequentemente *T. cruzi*-específicas e somam cerca de 18% dos genes codificadores de proteínas (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Os cromossomos do *T. cruzi* não se condensam durante a divisão celular, o que torna difícil a determinação do número exato de cromossomos pelos métodos convencionais. Através da análise densitométrica da separação por PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*), estimava-se que a cepa CL Brener continha aproximadamente 64 cromossomos (CANO *et al.*, 1995). Recentemente, os fragmentos genômicos (*contigs* e *scaffolds*) gerados pelo sequenciamento foram montados em cromossomos baseados em mapas de sintenia de TriTryps (*T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major*) e no sequenciamento de bibliotecas de cromossomos artificiais de bactérias (BAC) de *T. cruzi* resultando em 41 pares cromossômicos, variando de 78 kb a 2,4 Mb (WEATHERLY, BOEHLKE e TARLETON, 2009).

Além do genoma nuclear, todos apresentam um genoma extranuclear localizado no cinetoplasto, uma estrutura localizada em sua mitocôndria única. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa cerca de 20-25% do conteúdo total de DNA e é constituído por moléculas circulares, maxicírculos e minicírculos, que se encontram interligadas formando uma extensa rede. Os maxicírculos apresentam tamanho de 22 a 37 kb e são considerados análogos ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos. Os minicírculos possuem tamanho de 0,5 a 2,5 kb com sequências altamente variáveis (SHAPIRO e ENGLUND, 1995; SILVEIRA, 2000). Os maxicírculos contêm genes codificadores de RNA ribossomal e de proteínas mitocondriais, enquanto os minicírculos geram os pequenos RNAs guias que participam na edição do RNA, que consiste na inserção e deleção de uridinas dos mRNA transcritos a partir dos maxicírculos. Esse processo regula pós-transcricionalmente a expressão de genes mitocondriais nas diferentes formas evolutivas do parasita (SCHNAUFER *et al.*, 2001; SIMPSON *et al.*, 2000).

Outra característica peculiar do genoma dos tripanossomatídeos é o fato dos mRNAs serem transcritos de forma policistrônica, que inclui vários genes organizados em tandem e na maioria dos casos não apresentam interrupções por introns, com exceção do gene que codifica a enzima poli-A polimerase e para uma RNA helicase (GÜNZL, 2010). Em geral, os genes do transcrito policistrônico não estão relacionados com a mesma via metabólica e podem apresentar diferenças nos níveis de expressão, demonstrando a importância de mecanismos pós-transcricionais de controle da expressão gênica (VANHAMME e PAYS, 1995).

Como nos demais eucariotos, em *T. cruzi* apenas RNAs monocistrônicos são traduzidos. Dessa forma, os transcritos policistrônicos são processados para gerar mRNAs maduros através de *trans-splicing* e poliadenilação. O processamento por *trans-splicing* ocorre com a finalidade de inserir na extremidade 5' de moléculas de RNA codificadoras de proteína uma sequência de RNA de 39-41 nucleotídeos conhecida como miniéxon ou *spliced leader RNA* (VANHAMME e PAYS, 1995; TEIXEIRA, 1998). O miniéxon é extremamente conservado e provém da região 5' de um precursor de aproximadamente 110 nucleotídeos (ZWIERZYNSKI e BUCK, 1991). Este RNA precursor possui em sua extremidade 5' um cap modificado, conhecido como cap 4 devido a modificações químicas dos primeiros 4 nucleotídeos após a 7-metilguanósina. O *trans-splicing* ocorre através de duas reações de transesterificação, análogo ao *cis-splicing*, e consiste na junção de duas sequências com a formação de uma estrutura intermediária em forma de “Y” (LIANG *et al.*, 2003).

Em tripanossomatídeos, não há um sinal específico para a poliadenilação, sendo que tal sítio é determinado pelo *trans-splicing* do mRNA à jusante no RNA policistrônico. Regiões ricas em resíduos de pirimidinas, a distâncias determinadas dos sítios de poliadenilação e *trans-splicing*, regulam a adição da cauda poli-A e do miniéxon, respectivamente (CAMPOS *et al.*, 2008).

Os genes que codificam as três RNA polimerases clássicas de eucariotos foram descritos nos tripanossomatídeos de acordo com similaridades estruturais às RNA polimerases de eucariotos superiores (VANHAMME e PAYS, 1995), mas diferem quanto à susceptibilidade a inibidores como alfa-amanitina (LAUFER *et al.*, 1999). Todavia não foram identificadas as regiões promotoras para os genes que são transcritos pela RNA polimerase II, com exceção do promotor associado ao gene do miniéxon (CAMPBELL, THOMAS e STURN, 2003).

As características peculiares que o *T. cruzi* apresenta evidenciam que a regulação da expressão gênica acontece principalmente em nível pós-transcricional neste organismo. Sendo assim, acredita-se que os genes de *T. cruzi* são continuamente transcritos, e a regulação deve ocorrer no processamento dos transcritos policistrônicos, transporte seletivo de mRNA para o citoplasma, no controle da estabilidade do mRNA e nas etapas de tradução selecionando os mRNA que devem ser transcritos em momentos específicos do ciclo.

#### 1.4 Interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira

O estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* depende de uma série de eventos nos quais uma variedade de receptores celulares de superfície, segundos mensageiros e fatores

transcricionais de diferentes processos parecem ser explorados pelo parasita para mediar sua invasão e sobrevivência (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002). O contato inicial ocorre através de diversas moléculas tanto do parasita quanto da célula hospedeira que leva à interiorização do parasita, escape do vacúolo parasitóforo, sua diferenciação seguida de multiplicação e novamente de transformação para tripomastigota, que será liberado com o rompimento da célula. Todo esse processo de interação envolve uma série de alterações na expressão gênica tanto da célula hospedeira, quanto do *T. cruzi*, levando a alterações na fisiologia e estrutura de ambas as células.

#### 1.4.1 Adesão celular e reconhecimento

A interação *T. cruzi*-célula hospedeira inicia-se com a adesão do parasita à superfície celular. Este processo envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície de ambas as células, portanto, é mediado por receptores. O grau de adesão varia de acordo com a cepa do parasita, com a forma e com o tipo celular hospedeiro.

Diversas moléculas presentes na célula hospedeira envolvidas no processo de reconhecimento dos parasitas têm sido estudadas, incluindo glicoconjugados, tais como resíduos de manose, galactose, N-acetilgalactosamina e ácido siálico (MEIRELLES *et al.*, 1983; ARAÚJO-JORGE, BARBOSA e MEIRELLES, 1992) e componentes de matriz extracelular, como proteoglicanos de heparan sulfato, fibronectina e laminina (ARAÚJO-JORGE, BARBOSA e MEIRELLES, 1992; CALVET *et al.*, 2003; CALVET *et al.*, 2004).

Diferentes cepas do parasita, bem como suas diferentes formas evolutivas, expressam diferentes moléculas na superfície (DE SOUZA, DE CARVALHO e BARRIAS, 2010). Dentre essas moléculas que estão envolvidas no processo de invasão destacam-se as mucinas e trans-sialidases. Mucinas são as glicoproteínas mais presentes na superfície do *T. cruzi* e são ancoradas na membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esses polipeptídeos apresentam entre 50 e 200 aminoácidos e são ricos em resíduos de serina e treonina (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). As mucinas são representadas pela gp30, gp35/50 e gp82 em tripomastigotas metacíclicos e gp60/70 – 200 kDa em tripomastigotas sanguíneos (ALMEIDA *et al.*, 1994; SCHENKMAN *et al.*, 1991)

A gp82 é específica da forma tripomastigota metacíclica e promove a invasão do parasita através de uma cascata de sinalização e mobilização de cálcio em ambas as células. A ligação da gp82 à célula hospedeira leva à ativação de uma proteína tirosina quinase e à fosforilação da p175 no parasita (FAVORETO, DORTA e NOBUKO, 1998). Essa sinalização envolve a ativação de fosfolipase C gerando inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que, por sua vez, induz a

mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo, possivelmente, do retículo endoplasmático (YOSHIDA *et al.*, 2000; YOSHIDA, 2006). Estudos têm mostrado que a gp82 também participa da infecção do *T. cruzi* via oral promovendo a adesão na mucosa gástrica, além de apresentar resistência às condições do meio gástrico (NEIRA *et al.*, 2003).

As gp35/50 são expressas nas formas tripomastigota metacíclica e epimastigota apresentando resistência a proteases (SCHENKMAN *et al.*, 1993). Essas moléculas não são tão efetivas como as gp82 em promover a invasão, provavelmente devido à sua pobre indução de  $\text{Ca}^{2+}$  (DORTA *et al.*, 1995). A cascata de sinalização desencadeada por gp35/50 é distinta da induzida por gp82, pois depende de uma adenil ciclase que gera AMP cíclico, sendo o  $\text{Ca}^{2+}$  requerido para a invasão, liberado dos acidocalcisomas do parasita (NEIRA, FERREIRA e YOSHIDA, 2002; YOSHIDA, 2006).

A molécula gp90 é específica de tripomastigota metacíclico e a sua ligação ao receptor na célula alvo não causa a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando negativamente a infecção. Dessa forma, tripomastigotas metacíclicos com alta expressão de gp90 têm baixos níveis de infecção, por exemplo, a cepa G de *T. cruzi* (YOSHIDA, 2006).

As trans-sialidases são enzimas de superfície expressas em tripomastigota as quais possuem a capacidade de transferir ácido siálico de sialoglicoconjugados da célula hospedeira para um aceptor apropriado na superfície do parasita, como uma mucina (SCHENKMAN e EICHINGER, 1993). Essas enzimas estão envolvidas na infecção (PEREIRA *et al.*, 1996) e facilitam a ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo, permitindo o escape do parasita para o citoplasma (ANDREWS *et al.*, 1990). Essas proteínas fazem parte da superfamília gp85/trans-sialidases, a qual possui diversas glicoproteínas implicadas no processo de adesão à célula hospedeira e à matriz extracelular (ALVES e COLLI, 2007), como a Tc85.

Algumas proteases do *T. cruzi* também têm sido implicadas no processo de infecção como cruzipaina e oligopeptidase B. Oligopeptidase B é uma serina peptidase citosólica de 80 kDa. Estudos demonstram que esta molécula, gerada por um precursor presente somente nas formas tripomastigotas (BURLEIGH *et al.*, 1997), é capaz de gerar o agonista de  $\text{Ca}^{+2}$  que ativa a fosfolipase C do hospedeiro gerando  $\text{IP}_3$  e mobilização de cálcio de estoques intracelulares tapsigargina-sensíveis (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995).

A cruzipaina é uma cisteína proteinase expressa em todas as formas de vida do *T. cruzi*. Esta enzima cliva o cininogênio gerando a bradicinina, a qual é reconhecida por receptores na célula hospedeira. Esses receptores, por sua vez, promovem um aumento transiente de cálcio intracelular, culminando nos eventos de invasão (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado o papel da cruzipaina na invasão dos tripomastigotas na célula hospedeira, sendo que altos níveis de expressão de cruzipaina podem contribuir com a

alta infectividade do parasita (APARICIO, SCHARFSTEIN e LIMA, 2004). Além disso, a invasão da célula hospedeira é reduzida por inibidores de cisteína proteinase (MEIRELLES *et al.*, 1992).

#### 1.4.2 Invasão do *Trypanosoma cruzi* na célula hospedeira

Após a ligação e o reconhecimento do parasita pela superfície da célula hospedeira, vários processos de sinalização celular culminam com a invasão do parasita na célula. Estudos indicam que a forma tripomastigota do *T. cruzi* utiliza diferentes mecanismos para sinalizar e invadir a célula (YOSHIDA *et al.*, 2000; BURLEIGH, 2005). Os mecanismos de entrada são a fagocitose, na qual as células emitem pseudópodos, e a endocitose, ambas com a participação de filamentos de actina, e a invaginação da membrana, sem participação de filamentos de actina, cujo processo tem sido considerado como um mecanismo ativo de entrada do parasita, com gasto de energia (DE SOUZA, DE CARVALHO e BARRIAS, 2010).

O reconhecimento do *T. cruzi* pela célula hospedeira através de diversas moléculas de superfície como a gp82, gp35/50 e a oligopeptidase B, descritas anteriormente, leva a um rápido aumento dos níveis citoplasmático de  $Ca^{2+}$  em ambas as células. A ativação da sinalização de cálcio, gerada apenas pelas formas infectivas, promove uma reorganização no citoesqueleto de actina na célula hospedeira, facilitando a invasão do parasita (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995). Além disso, o bloqueio de cálcio intracelular da célula hospedeira reduziu a invasão do parasita (TARDIEUX, NATHANSON e ANDREWS, 1994; DORTA *et al.*, 1995). Esses dados sugerem que a sinalização de cálcio é importante para uma eficiente invasão do parasita.

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e Akt (serina/treonina quinase) também são importantes reguladores do processo de invasão do *T. cruzi* em células não fagocíticas e em macrófagos. A invasão do parasita promoveu a ativação de diferentes isoformas de PI3K na célula hospedeira e a inibição dessa enzima reduziu o número de parasitas internalizados (TODOROV *et al.*, 2000, WILKOWSKY, *et al.*, 2001) e, além disso, reprimiu drasticamente a associação inicial com os lisossomos (WOOLSEY *et al.*, 2003). É possível que a sinalização de PI3K participe na reorganização dos filamentos de actina na célula hospedeira durante o processo de invasão celular e inicie uma cascata de sinalização anti-apoptose em certos tipos celulares (MOTT e BURLEIGH, 2008).

Tem sido descrito na literatura dois mecanismos distintos para a internalização do parasita e o tráfico de lisossomos em células fagocíticas não profissionais. Um dos caminhos é a via lisossomo-dependente, na qual ocorre um recrutamento de lisossomos na face citoplasmática da membrana celular no local de ligação ao parasita, o qual contribuiu para a formação do vacúolo parasitóforo. O influxo de cálcio é crucial para o recrutamento e fusão dos lisossomos à membrana plasmática (TARDIEUX *et al.*, 1992). Esse mecanismo ocorre em cerca de 20% dos parasitas que estão entrando na célula (DE SOUZA, DE CARVALHO e BARRIAS, 2010; BURLEIGH, 2005; WOOLSEY *et al.*, 2003).

Outra via de internalização utilizada pelo parasita é a lisossomo-independente. Neste modelo, o parasita entra na célula por invaginação da membrana na qual ocorre acúmulo de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP<sub>3</sub>), maior produto da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) da classe I. Neste modo de entrada, cerca de 50% dos parasitas internalizados estão contidos em vacúolos enriquecidos com marcadores de membrana e aproximadamente 20% são encontrados em endossomos iniciais, após 10 minutos de infecção. Neste modelo, o vacúolo parasitóforo é formado por um processo de maturação no qual adquire marcadores de lisossomo e endossomo inicial (WOOLSEY *et al.*, 2003).

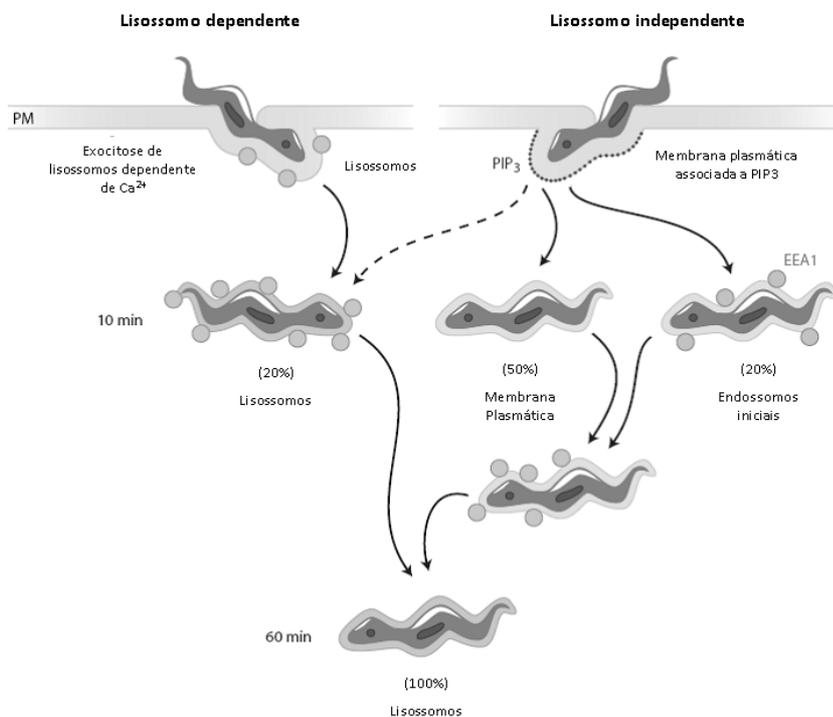


Figura 1. 3 Modelo dos mecanismos de invasão, dependente e independente de lisossomos, do *Trypanosoma cruzi*. A via dependente de lisossomos é dependente de cálcio e se inicia com a exocitose de lisossomos com a membrana plasmática (PM), que leva à formação do vacúolo parasitóforo. Na via lisossomo independente, os parasitas entram através da invaginação da membrana plasmática, onde se acumula  $PIP_3$ . Modificado de Burleigh, 2005.

Independente do mecanismo de invasão, o *T. cruzi* vai se localizar em um vacúolo parasitóforo. Através da via lisossomo independente, a maioria dos tripomastigotas utilizam a membrana plasmática da célula hospedeira durante o processo de formação do vacúolo. Este processo é facilitado pela despolimerização dos microfilamentos de actina e são ricos em produtos do PI3K. Aproximadamente 20% dos vacúolos contendo tripomastigota foram associados com EEA1, marcação para endossomo inicial, e Rab5. E outros 20% foram marcados com Lamp-1, proteína lisossomal (Figura 1.3) (WOOLSEY *et al.*, 2003; MOTT e BURLEIGH, 2008).

Uma vez internalizado no vacúolo parasitóforo, o parasita secreta transialidase/neuraminidase, que retirará resíduos de ácido siálico da membrana deste vacúolo, tornando-a mais exposta à ação da proteína TcTox do parasita. O meio ácido do vacúolo é requerido para a atividade da TcTox, a qual possui capacidade de incorporar-se na membrana do vacúolo levando a formação de pequenos poros que resultam na ruptura do vacúolo (ANDREWS *et al.*, 1990). Diferentemente de outros patógenos, o *T. cruzi* requer o meio ácido encontrado no compartimento lisossomal para garantir sua sobrevivência (LEY *et al.*, 1990). O meio ácido apresenta um papel importante para o início da diferenciação das formas tripomastigotas para amastigota, a qual é completada no citoplasma (TOMLINSON *et al.*, 1995).

Após escapar do vacúolo, o parasita finaliza sua diferenciação para a forma amastigota e permanece livre no citoplasma da célula hospedeira, onde inicia seu processo de divisão cerca de 24 horas após a invasão (MOTT e BURLEIGH, 2008). Em seguida, diferencia-se na forma tripomastigota. É possível que essa transformação seja disparada pela carência de nutrientes no citoplasma na célula altamente infectada. A intensa movimentação gerada pelos parasitas no interior da célula hospedeira promove sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação dos tripomastigotas no meio extracelular, tornando-os capazes de infectar novas células (BRENER, 1973; DE SOUZA, 2000).

### 1.5 Avaliação da interação patógeno-hospedeiro em larga escala

As células eucarióticas são suscetíveis à infecção causada por agentes com complexidade variável, desde vírus e bactérias até parasitas eucarióticos. Essa interação patógeno-hospedeiro envolve uma série de adaptações que estão relacionadas com um dinâmico sistema de sinalização e modulação da expressão gênica em ambas as células, garantindo o sucesso no estabelecimento da infecção. Esse processo depende da habilidade do

patógeno manipular a célula hospedeira em favor da sua sobrevivência e escapar dos mecanismos de defesa. A identificação dessas mudanças globais no transcrito de ambas as células pode fornecer uma nova visão sobre o processo de infecção pela identificação dos mecanismos requeridos tanto para a sobrevivência do patógeno intracelular quanto os da célula hospedeira em resposta a exposição ao patógeno.

Como ferramenta para o estudo da expressão gênica, a tecnologia de microarranjo de DNA proporcionou um grande avanço em diversas áreas da biologia. Ao permitir o monitoramento dos níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente, o microarranjo de DNA expandiu grandemente a análise dos processos moleculares em nível de alteração transcricional e acelerou rapidamente o entendimento dos processos de infecção (DIEHN e RELMAN, 2001).

O primeiro estudo descrevendo globalmente a modulação da expressão gênica de células mamíferas durante o processo de infecção do *T. cruzi* foi realizado em 2002. Vaena de Avalos e colaboradores investigaram a interação do parasita, cepa Y, com fibroblasto nos pontos de 2 h, 4 h, 6 h e 24 h pós infecção utilizando um microarranjo de cDNA com 27000 sondas. Nos tempos iniciais (2-6 h) não houve indução de nenhum gene. No entanto, seis genes foram reprimidos, os quais foram relacionados com associação à matriz extracelular e fatores de crescimento. Por outro lado, uma maior modulação foi verificada no ponto de 24 h no qual 106 genes apresentaram significativo aumento da expressão. A família mais amplamente representada nesta indução foi a de genes estimulados por interferon. Além disso, houve uma modulação de genes relacionados com receptores e transdução de sinal, metabolismo, transcrição e matriz extracelular.

Em seguida a esse trabalho pioneiro, diversos estudos foram realizados para elucidar o perfil transcricional da resposta da célula hospedeira à infecção do *T. cruzi*, utilizando diferentes modelos biológicos. Em 2003, Garg e colaboradores isolaram coração de camundongos infectados por *T. cruzi* (cepa Sylvio) e verificaram modulação gênica ao longo do desenvolvimento da doença. Ao todo, foram avaliados 1176 genes dentre os quais 31, 89 e 66 genes foram modulados no 3º, 37º e 110º dias após a infecção, respectivamente. Os genes regulados foram relacionados com resposta imune ou proteínas de defesa/estresse do hospedeiro, metabolismo energético mitocondrial, manutenção da estrutura e função do citoesqueleto e da matriz extracelular.

No mesmo ano, Mukherjee e colaboradores (2003) investigaram mudanças na expressão gênica usando o modelo de cardiopatia chagásica crônica em camundongos infectados com a cepa Brasil, após 100 dias de infecção. Das aproximadamente 27000 sondas de cDNA avaliadas, 455 genes foram ativados e 575 reprimidos. Tais genes foram agrupados

de acordo com sua relação à transcrição, transporte intracelular, transporte através da membrana plasmática, junção, adesão, matriz extracelular, sinalização, metabolismo energético, forma e morte celular.

O perfil de expressão em pacientes humanos infectados com *T. cruzi* foi avaliado em 2005 por Cunha-Neto e colaboradores. Neste estudo foram utilizadas amostras de coração de pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica submetidos a transplantes cardíacos as quais foram submetidas a um microarranjo construído a partir de bibliotecas de cDNA cardiovascular (10000 sondas). Os genes identificados como modulados positivamente relacionavam-se à resposta imune, ao metabolismo de lipídios e à fosforilação oxidativa mitocondrial. Genes associados ao interferon gama foram os mais representados, indicando ser um processo importante na infecção.

Imai e colaboradores (2005), utilizando microarranjos de cDNA (1700 sondas), verificaram a modulação gênica em fibroblastos murinos com a cepa Tulahuen. O estudo foi realizado após 8 dias de infecção no qual numerosos amastigotas se encontravam em proliferação no citoplasma. Foram identificados 16 genes diferencialmente expressos relacionados com sinalização por GTPase, metabolismo do colesterol, regulação transcricional, processamento de RNA, manutenção do envelope nuclear e sinalização mediada por integrina. Os genes identificados parecem ser importantes para a persistência e replicação intracelular do parasita. Uma via em destaque modula o remodelamento do citoesqueleto, facilitando a proliferação dessas formas no interior da célula hospedeira. Outros genes importantes relacionados à proliferação intracelular do parasita foram identificados em célula HeLa em um estudo que utilizou microarranjos de oligonucleotídeos com sondas para pelo menos 47000 transcritos gênicos. Dentre os genes modulados, a maior parte relaciona-se à inibição da proliferação celular, sugerindo que essa inibição na célula infectada fornece mais tempo para que o parasita se replique (SHIGIHARA *et al.*, 2008).

Um estudo comparativo utilizando três linhagens celulares infectadas com a cepa Y foi realizado por Costales e colaboradores (2009). O grupo avaliou células humanas de musculatura lisa vascular, endotélio microvascular e fibroblasto após 24 horas de infecção e identificaram um grande número de transcritos modulados: 531, 2852 e 2155, respectivamente, sendo 299 genes induzidos e 25 genes reprimidos em ambas as linhagens. Os genes estimulados por interferon apresentaram maior modulação dentre as três linhagens celulares. Além disso, houve indução de genes relacionados com metabolismo, sinalização e catabolismo de aminoácidos. Por outro lado, os genes reprimidos estavam envolvidos com ciclo celular mitótico e divisão celular, corroborando os dados de Shigihara (2008) indicando, mais uma vez, que a infecção impede a proliferação celular.

Recentemente, uma nova metodologia foi utilizada pela primeira vez para identificar fatores do hospedeiro que apresentem um importante papel durante a infecção pelo *T. cruzi*. Essa metodologia é baseada em microarranjo celular utilizando RNA de interferência que permite a automatização da distribuição de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) em culturas de células vivas. Neste estudo de Genovesio e colaboradores (2011), 14 genes foram selecionados, dos 3880 spots iniciais, apresentando um efeito inibitório no processo de infecção do *T. cruzi*. A análise desses genes revelou que muitos deles eram codificadores de proteínas de membrana, dentre os quais 4 eram proteínas ligadoras de cálcio. Alguns genes foram relacionados com receptor de TGF- $\beta$  e proteínas secretadas como quimiocina e colágeno.

Nosso grupo vem desenvolvendo estudos nesta linha de análise global da interação *T. cruzi*-célula hospedeira. Em 2011, o primeiro estudo foi finalizado onde uma cinética de infecção mais detalhada foi avaliada através da interação entre a cepa Dm28c e cardiomiócitos. Os pontos analisados foram delimitados em três fases do processo de infecção: inicial (1, 2, 4 e 6 h), intermediária (12 h) e tardia (24 e 48 h). Essas fases são biologicamente relevantes para o ciclo intracelular do parasita. Na fase inicial os parasitas se encontram nas etapas de adesão, interiorização, escape do vacúolo parasitóforo e início de diferenciação. Na fase intermediária o parasita já se encontra na forma amastigota e na fase tardia inicia o processo de intensa replicação intracelular. Os microarranjos utilizados neste estudo apresentavam cobertura para 30% do genoma murino e os resultados demonstram uma intensa modulação na expressão gênica. Ao todo foram identificados 353 genes diferencialmente expressos em pelo menos uma das três fases avaliadas, sendo que a maioria dos genes teve sua expressão modulada na fase tardia. Dentre os genes modulados, 111 tiveram sua expressão aumentada e 242 foram reprimidos. Uma variedade de importantes processos celulares foi identificada como alterada. O grupo com maior modulação está relacionado à inflamação e à resposta imune, o qual foi identificado em todas as fases avaliadas. Também foram identificados genes de apoptose, sobrevivência e estresse oxidativo. O grupo de genes associado ao citoesqueleto e ao tráfego intracelular foi diferencialmente expresso durante a fase tardia (24 e 48 h após infecção), dentre os quais os associados à dinâmica do citoesqueleto, à organização da citoarquitetura e ao tráfego vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi tiveram sua expressão fortemente diminuída (MANQUE *et al.*, 2011).

A introdução da tecnologia de microarranjo possibilitou o estudo global das alterações causadas por patógenos durante a infecção através da análise dos níveis de expressão de milhares de genes ao mesmo instante. No entanto, as dificuldades técnicas incluindo questões

como a seleção da sonda baseada em sequências conhecidas, hibridação cruzada e o alto custo tornam os estudos baseados em microarranjo desafiantes. Além disso, o microarranjo apresenta pouca sensibilidade para identificar RNAs pouco expressos, como os de um patógeno durante o processo infeccioso. Desse modo, a maioria dos estudos tem se focado em avaliar apenas um dos organismos (WESTERMANN, GORSKI e VOGEL, 2012).

O recente desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento do RNA, denominado RNA-Seq, fornece uma nova abordagem para o estudo de transcritomas ao permitir o sequenciamento e a quantificação dos transcritos com grande resolução. Essa tecnologia é baseada na plataforma de sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* NGS), cuja maior vantagem é a capacidade de produzir um enorme volume de dados e com baixo custo. Dessa forma, sua alta sensibilidade promove a identificação e quantificação de transcritos raros, a detecção de mutações, deleções e inserções, edição de RNA e *splicings* alternativos (METZKER, 2010).

Na metodologia do RNA-Seq, a população de RNA isolada da célula é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA ligado a adaptadores em uma ou ambas as extremidades. Cada molécula é sequenciada utilizando uma das técnicas de sequenciamento em larga escala gerando *reads* curtos na ordem de 30 – 400 pares de base, dependendo da tecnologia usada. Seguido ao sequenciamento, os *reads* resultantes são alinhados a um genoma referência, resultando em um mapa transcricional em escala genômica que contém informação tanto da estrutura física dos transcritos quanto do nível de expressão para cada gene (WANG, GERSTEIN e SNYDER, 2009).

Ao contrário das tecnologias baseada em hibridização, RNA-Seq não se limita a detectar transcritos com sequências genômicas conhecidas. Além disso, é capaz de fornecer a precisa localização dos limites de um transcrito revelando como dois éxons são conectados, por exemplo (WANG, GERSTEIN e SNYDER, 2009).

O RNA-Seq não possui um limite máximo de detecção, o qual se correlaciona com o número de sequências obtidas. Dessa forma, os limites do alcance dinâmico são determinados apenas pela quantidade de leituras obtidas. Isso significa que através do contínuo sequenciamento de uma determinada biblioteca, seria possível quantificar qualquer transcrito presente e, portanto, o alcance dinâmico só representaria a diversidade biológica do transcrito analisado (WILHELM e LANDRY, 2009). Em contraste, os microarranjos de DNA perdem sensibilidade para genes expressos em baixos níveis ou em altos níveis, tendo um alcance dinâmico muito menor (WANG, GERSTEIN e SNYDER, 2009). Dada a sensibilidade desta abordagem, o RNA-Seq pode ser potencialmente utilizado para monitorar

a expressão de genes em dois organismos com elevado nível de precisão e profundidade, mesmo com um reduzido número de células.

O primeiro trabalho avaliando a modulação gênica, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, através da tecnologia de RNA-Seq, foi publicado recentemente. Yang e colaboradores (2010) avaliaram a interação de células HeLa com o vírus da vaccínia utilizando o equipamento SOLiD (Applied Biosystems). Com os dados obtidos, puderam ser construídos mapas temporais do transcrito viral conforme a replicação do vírus, além da identificação da alteração do transcrito celular, indicando a modulação da resposta em decorrência da infecção. A proporção de RNA viral foi aumentada entre 25-55 % em 4 horas. Os genes regulados positivamente da célula hospedeira foram relacionados com cascata de NF-κB, apoptose e transdução de sinal.

Mandlik e colaboradores (2011) estudaram através de RNA-Seq a modulação gênica na bactéria *Vibrio cholerae*, agente causador da cólera, durante o processo infeccioso em dois modelos animais, camundongo e coelho. Ao todo foram identificados 373 genes de *Vibrio cholerae* diferencialmente expressos, dos quais 39 foram encontrados nos dois modelos animais. Os resultados obtidos revelam que a bactéria utiliza um complexo programa transcricional, que inclui dois principais grupos de genes. O primeiro grupo de genes está relacionado com a colonização e virulência do patógeno. O segundo grupo de genes está envolvido com metabolismo adaptativo, os quais são específicos para cada ambiente ou hospedeiro. Neste trabalho a tecnologia de RNA-Seq demonstrou alta precisão e sensibilidade ao identificar pequenos RNAs, além de RNA raros. O mesmo foi comprovado no trabalho de Stark e colaboradores (2012), no qual foram identificadas modulação em micro RNAs (miRNAs) tanto em fibroblasto humano quanto no patógeno citomegalovírus. Foram avaliados 24 miRNAs do vírus importantes para a replicação viral.

O estudo de Tierney e colaboradores (2012) é mais um exemplo de como o RNA-Seq pode ser utilizado para elucidar os mecanismos de interação patógeno/hospedeiro. Neste estudo, células dendríticas murinas foram infectadas com *Candida albicans*. Através do sequenciamento foram identificados 545 genes diferencialmente expressos para *C. albicans* e 240 para o hospedeiro. Com os dados do sequenciamento, foram montadas redes inter-espécie de inferência gênica no qual foi possível verificar que o fator de transcrição Hap3 de *C. albicans* é regulado pela Ptx3 murino, um receptor de reconhecimento padrão envolvido na defesa da célula. Os dados indicam que as redes de interação inter-espécie podem ser utilizadas para investigar e identificar potenciais alvos terapêuticos. Este foi o primeiro trabalho a introduzir redes de inferência gênica para o estudo da interação patógeno/célula

hospedeira. Este mecanismo pode revelar como algumas interações são reguladas durante o processo de infecção.

Em 2011, nosso grupo finalizou um trabalho investigando as modulações gênicas no hospedeiro utilizando o modelo de interação *T. cruzi*-cardiomiócito através de sequenciamento de RNA (RAMPAZZO, 2011). Neste estudo, a cinética de infecção dos cardiomiócitos por *T. cruzi* pôde ser avaliada em todo o genoma murino nos pontos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h pós-infecção. Ao todo, foram identificados 572 genes modulados, dos quais 371 se apresentaram com expressão aumentada e 201 reprimida. O número de genes modulados identificados foi maior do que no primeiro trabalho realizado pelo grupo, utilizando microarranjo (MANQUE *et al.*, 2011).

Nas primeiras horas (1 a 4 h), um número expressivo de genes do hospedeiro apresentou alteração na expressão, alcançando um total de 117 genes, sendo 18 genes modulados já na primeira hora. No estágio inicial tardio (5 a 6 h) e intermediário (24 h), 178 e 305 genes foram modulados, respectivamente. Esta cinética revelou um aumento na expressão de genes proporcional ao índice de infecção das culturas. As análises de funções biológicas dos genes diferencialmente expressos demonstraram modulação de genes relacionados principalmente à resposta imune, citoesqueleto, metabolismo mitocondrial, apoptose, hipertrofia e matriz extracelular (RAMPAZZO, 2011).

Grande parte dos genes modulados no estágio inicial da infecção foi associada à resposta imune, os quais permaneceram induzidos, em sua grande maioria, durante toda a cinética de infecção. No estágio inicial, houve uma modulação positiva de genes que codificam para quimiocinas e citocinas, mediadores da imunidade, além de genes que codificam para moléculas de adesão. A modulação de genes para apoptose foi bastante heterogênea, indução e repressão desses genes foram evidenciados nos diferentes estágios de infecção. Poucos genes relacionados ao citoesqueleto foram diferencialmente expressos nos momentos iniciais da infecção (1-2 h). Ainda, genes associados com a conservação da citoarquitetura foram modulados negativamente desde o estágio inicial tardio (5-6 h) até a fase intermediária de infecção (24 h) onde predomina a multiplicação intracelular do parasita (RAMPAZZO, 2011).

Neste trabalho, ao utilizarmos a técnica de RNA-Seq, também foi possível identificamos os transcritos do parasita. Como mostra a figura 1.4, já na primeira hora de infecção (V1), é possível identificar os transcritos do parasita por meio dos *reads* totais que mapearam no genoma do parasita. Há um crescente aumento desse valor chegando a atingir, no ponto de 24 horas, 14% dos *reads* totais.

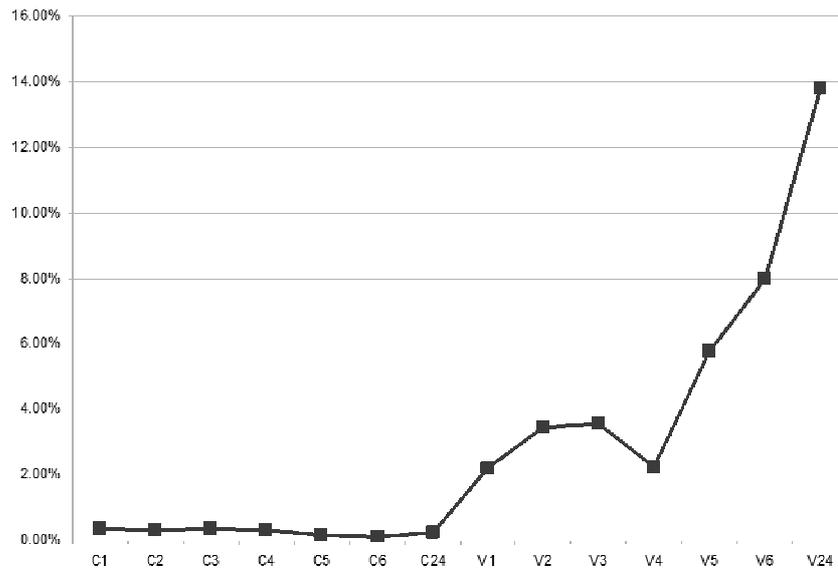


Figura 1. 4 Porcentagem de *reads* que mapearam no genoma do *T. cruzi*. Legenda: C = controle (apenas cardiomiócito); V = cardiomiócito infectado pelo *T. cruzi*. Os números representam os pontos de análise (1-6 h e 24 h). Fonte: RAMPAZZO, 2011.

## 1.6 Plataforma SOLiD

A plataforma SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) é baseada no sequenciamento de nova geração, cuja maior vantagem é o volume de dados gerados com baixo custo e alta acurácia. Diferentemente da maioria das outras tecnologias, ao invés de utilizar uma DNA polimerase e detectar a incorporação de cada uma das bases, a plataforma SOLiD é baseada na hibridação e ligação de sondas com a sequência alvo através da enzima ligase.

Na plataforma SOLiD o material a ser sequenciado, DNA ou RNA, é preparado para entrar no sistema através de construção de bibliotecas. Primeiramente, o material é fragmentado por um processo químico, mecânico ou enzimático. Após a fragmentação, adaptadores são incorporados em ambas as extremidades de cada amostra. O adaptador P1, ligado à extremidade 5', é utilizado no anelamento do iniciador da PCR de emulsão. Na extremidade 3' há o adaptador P2, requerido na captura da amostra após a PCR de emulsão. Nesta etapa é possível inserir uma sequência, denominada *barcode* (figura 1.5). Esta sequência difere para cada amostra que atua como um sistema de marcação permitindo o sequenciamento de diversas amostras em uma mesma corrida. Nesse sistema há um adaptador interno utilizado para o sequenciamento do *barcode*.

Outro tipo de biblioteca é a *Mate-Paired*, a qual é montada com fragmentos maiores de 600 pb até 6 kb. Os adaptadores são ligados nas extremidades do DNA e ele é

circularizado. Em seguida é feita uma digestão enzimática separando o fragmento de DNA por um adaptador interno.

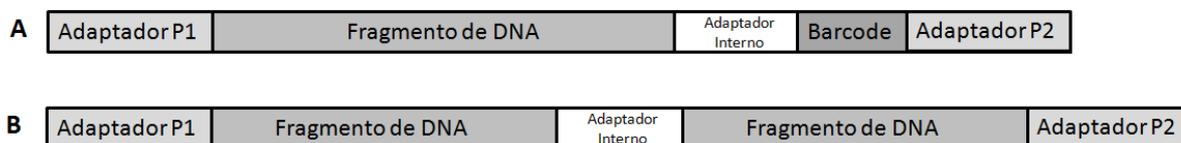


Figura 1. 5 Fragmento de DNA após o preparo das bibliotecas. A: biblioteca com *barcode*. B: biblioteca *Mate-Paired*.

Após a ligação dos adaptadores, as amostras são amplificadas por PCR de emulsão (ePCR) a qual combina uma fase aquosa com uma fase oleosa (figura 1.6). Nessa emulsão, são criados microrreatores que englobam os reagentes e componentes necessários para a amplificação do DNA molde, além de pequenas esferas magnéticas (P1 DNA *Bead*) cobertas com iniciadores complementares ao adaptador P1 de cada amostra.

O esperado é que um microrreator contenha apenas uma esfera e um único DNA molde a ser amplificado, chamado microrreator monoclonal (figura 3.2). No entanto, podem ocorrer: a ligação de múltiplos fragmentos de DNA em uma única esfera (microrreator policlonal); ausência de fragmentos ligados à esfera ou, ainda, a presença de mais de uma esfera num microrreator. Esse processo é controlado pelo tamanho do reator, de maneira que caiba somente uma única esfera, e pela adição de uma grande quantidade de esferas para diminuir a probabilidade de ocorrer reatores policlonais.

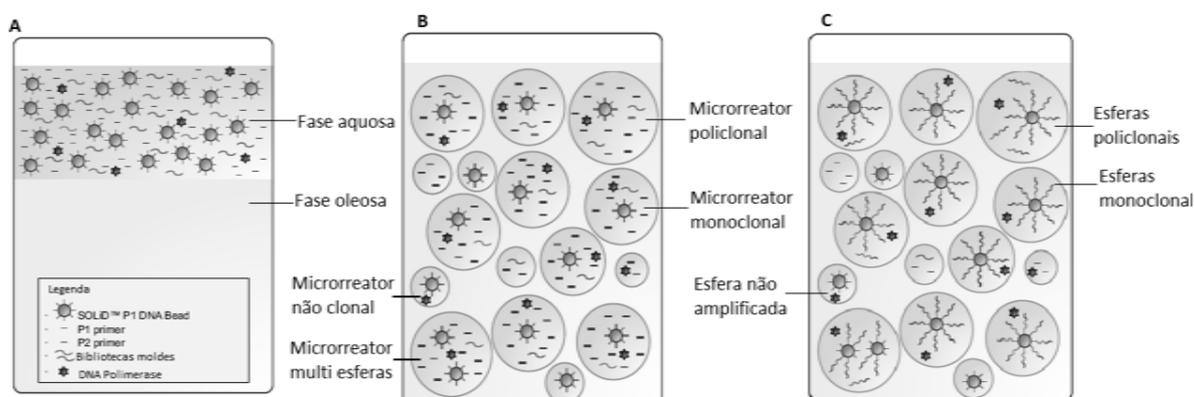


Figura 1. 6 PCR em emulsão. A: fase aquosa e oleosa antes da emulsificação; B: emulsão antes da amplificação; C: emulsão após amplificação (ePCR). FONTE: modificado do manual *SOLiD™ 3 System Template Bead Preparation Guide*.

Após a ePCR, uma etapa de enriquecimento é realizada com a finalidade de lavar e isolar as esferas contendo DNA amplificado. Neste processo, são utilizadas esferas de poliestireno com uma sequência complementar ao adaptador P2 do DNA amplificado, permitindo a sua captura. As esferas contendo o DNA são depositadas em lâminas e sequenciadas.

Na reação de sequenciamento, iniciadores universais (denominados  $n$  na figura 1.7) se acoplam à cadeia de DNA, a partir do adaptador P1. É adicionado um conjunto de sondas, as quais possuem uma sequência de 8 nucleotídeos dado que as 5 primeiras bases garantem a especificidade da ligação com a amostra, enquanto que as 3 últimas são inosinas na qual se liga o fluoróforo. Após o anelamento, é adicionada uma enzima ligase, que fixa a sonda ligada à extremidade 5' e, então, é feita a leitura do fluoróforo que identifica duas bases.

A incorporação de sondas é repetida diversas vezes até a fita recém sintetizada ser removida e, em seguida, o iniciador universal de tamanho  $n - 1$  é anelado, com o deslocamento de uma base. Tal etapa ocorre 5 vezes até que o iniciador de tamanho  $n - 4$  se anele a sequência. Ao final cada base é lida duas vezes, por duas sondas diferentes, sendo que cada sonda lê duas bases por vez, resultando na codificação di-base *color space* que garante alta especificidade ao sistema.

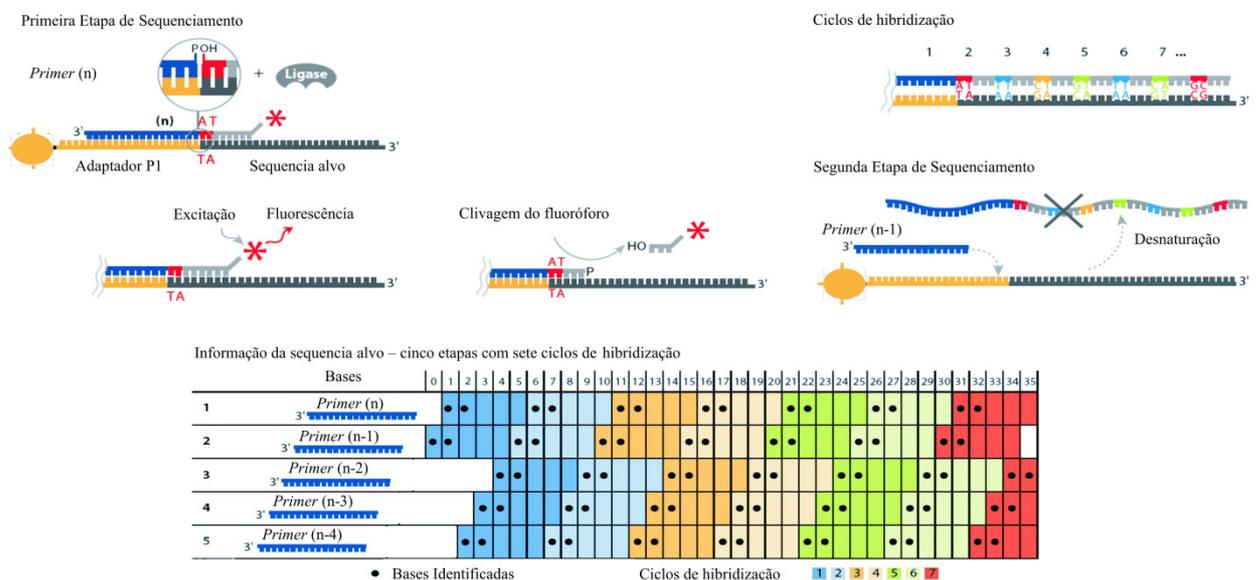


Figura 1. 7 Sequenciamento plataforma SOLiD. O sequenciamento ocorre por hibridização de sondas fluorescentes com o alvo em cinco etapas distintas. Na primeira etapa, o *primer* ( $n$ ) anela ao adaptador P1 que está ligada ao fragmento de DNA. Uma das sondas do *pool* encontrará similaridade a sequência de DNA alvo ligando-se a ele. O sinal de fluorescência é lido, e as três últimas bases da sonda, incluindo o fluoróforo, são removidas. Inicia-se o segundo ciclo de hibridização e assim sucessivamente, até que o alvo seja todo coberto. A sequência dupla fita é desnaturada, e uma nova etapa de sequenciamento é iniciada com o *primer* ( $n-1$ ). Os ciclos de hibridização são repetidos, fornecendo informação de outras bases da sequência alvo. Novas etapas de sequenciamento são realizadas com os *primers* ( $n-2$ ), ( $n-3$ ), e ( $n-4$ ) para que toda a sequência alvo seja determinada.

O resultado do sequenciamento é codificado em cores o qual representa 2 bases. O sistema de *color space* possui 16 combinações de nucleotídeos que apresentam quatro fluoróforos. Para que se possa decodificar uma sequência utiliza-se uma matriz como a apresentada na figura 1.8. Nesse sistema cada cor representa 4 possibilidades de combinação entre 2 bases.

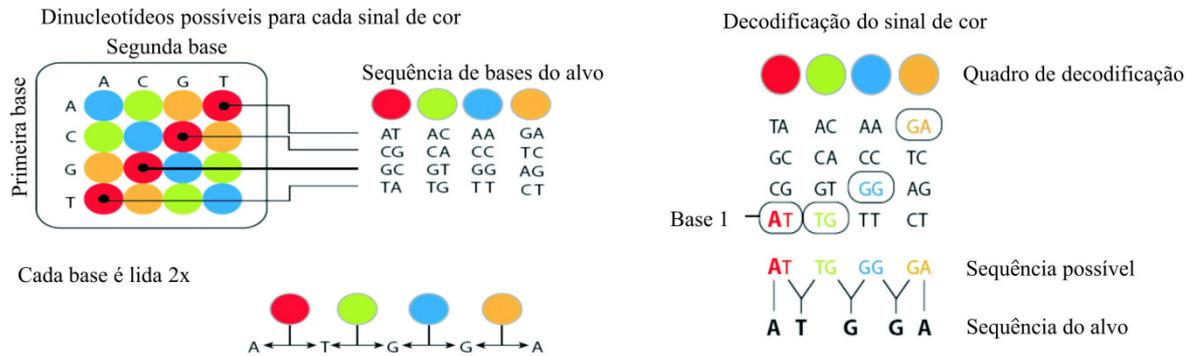


Figura 1. 8 Sistema *color space* utilizado na plataforma SOLiD. Cada cor representa duas bases e todas as 16 combinações possíveis de dinucleotídeos são marcadas nas sondas com apenas quatro fluoróforos. Assim, duas leituras são necessárias de cada base para que a sequência do dinucleotídeo da sonda seja identificado. Esse processo inicia-se com a identificação da primeira base do alvo na segunda etapa de sequenciamento (*primer n-1*), que libera para hibridização com a sonda uma base já conhecida, a última base do adaptador P1.

A sequência do adaptador P1 é conhecida, o que permite a identificação correta da primeira base do fragmento durante o sequenciamento. Além disso, no código de cores a primeira base é sempre diferente entre a mesma cor. Dessa maneira, uma vez conhecida a primeira base os demais sinais de fluorescência são especificados pela única combinação possível de cores que inclui a base conhecida. Esse sistema de leitura é muito eficiente na detecção de polimorfismos, os quais são facilmente confundidos com erros de sequenciamento em outras plataformas. As leituras produzidas com o SOLiD apresentam acurácia muito superior às demais técnicas (DE CARVALHO E DA SILVA, 2010).

## 2 OBJETIVO

O objetivo principal deste projeto é a avaliação do perfil de expressão gênica tanto do *T. cruzi* (Dm28c e Y) como da célula hospedeira (Vero) através da tecnologia de sequenciamento em larga escala.

### 2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer os pontos de análise;
- Desenvolver uma metodologia de enriquecimento do RNA do parasita;
- Avaliar as alterações no transcrito da célula Vero após a infecção *in vitro* por *T. cruzi*.
- Avaliar as alterações no transcrito do parasita após a infecção *in vitro* na célula Vero.
- Comparar as duas cepas do *T. cruzi* durante o processo de infecção.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem de célula Vero (rim de macaco verde africano) foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0,02 mg/ml de ciprofloxacina. As células foram cultivadas em temperatura de 37°C e atmosfera úmida de 5% CO<sub>2</sub>.

A propagação celular foi realizada por tripsinização removendo o meio de cultura e lavando as células com PBS (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O 4,3 mM, NaCl 137 mM) estéril e, em seguida, foi adicionado solução de tripsinização (0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS) nas culturas, as quais foram incubadas na câmara de cultura por cerca de 5 min. Após o desprendimento das células, estas foram submetidas à centrifugação por 5 min a 1000 x g, ressuspensas com novo meio de cultura e diluídas para novos frascos de cultura. Para o processo de infecção, após a centrifugação a quantidade de célula por garrafa foi definido através da contagem em câmara de Neubauer.

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS PARASITAS

Neste trabalho, foram utilizadas as cepas Dm28c (TcI) e Y (TcII) (Zingales *et al.*, 2009), as quais foram obtidas através da infecção em células Vero.

Culturas de células Vero semi-confluentes foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e os parasitas livres no sobrenadante foram removidos pela troca do meio. Após completo desenvolvimento do ciclo intracelular, formas tripomastigotas liberadas pela ruptura de células infectadas foram coletadas do sobrenadante das culturas e submetidas à centrifugação de 5 min a 3000 x g. Após a centrifugação, os parasitas foram ressuspensos em meio RPMI e o número total de parasitas por ml foi determinado em câmara de Neubauer.

#### 3.3 INTERAÇÃO *T. CRUZI*-CÉLULA HOSPEDEIRA

As células Vero (10<sup>6</sup> células) foram adicionadas à placas de cultura de 60 mm e mantidas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as culturas foram lavadas 2 vezes com PBS e, em seguida, infectadas com tripomastigota na proporção de 10:1 parasitas-célula. Após 4 horas de interação, as culturas de célula foram lavadas para retirar os parasitas que não

aderiram à célula hospedeira. A cinética de infecção foi interrompida nos pontos de 2 (antes da lavagem dos parasitas), 6, 24 e 48 horas pós-infecção para a extração do RNA total. As amostras de cultura controle (célula Vero e parasita) foram coletadas no ponto 0, ou seja, antes do processo de infecção.

Para observação microscópica, o procedimento de infecção descrito acima foi realizado, em paralelo, em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro. As lamínulas com as células infectadas foram lavadas com PBS e fixadas em Bouin por 5 min a temperatura ambiente. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes em etanol 70% e, em seguida, lavadas com água destilada. A coloração das lamínulas foi realizada com Giemsa na diluição de 1:10 em água destilada durante 30 a 40 min. Após coloração, as lamínulas foram desidratadas em série com acetona-xilol (acetona 100% (2x), acetona 70%/xilol 30%, acetona 50%/Xilol 50%, acetona 30%/xilol 70% e xilol 100% (2x)) e, por último, montadas em permount.

As lamínulas foram analisadas por microscopia ótica quanto aos seguintes parâmetros: a) número de células infectadas em 100 células e b) número de parasitas por células infectadas (taxa de replicação intracelular). As contagens foram realizadas através do programa ImageJ, no qual 400 células de cada momento de coleta foram contadas para as análises quantitativas.

### 3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total das culturas controle e infectada pelo *T. cruzi* foi extraído de acordo com o kit RNeasy (Qiagen) conforme orientações do fabricante. Inicialmente, as culturas foram lavadas em PBS e 600 µl de tampão RLT suplementado com β-mercaptoetanol (1:1000) foram adicionados às placas de cultura. Após completa lise celular, o extrato total foi transferido para tubos de 2 ml e, em seguida, adicionado 600 µl de etanol 70%. As amostras foram transferidas para coluna apropriada e centrifugada a 8000 x g por 15 s. Após a passagem do extrato total, a coluna foi lavada com 350 µl de RW1 e centrifugada a 8000 x g por 15 s. Em seguida, foram adicionados 80 µl do mix de DNase, contendo 10 µl de solução estoque de DNase e 70 µl de tampão RDD, e a coluna foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, foram adicionados 350 µl de RW1 e a coluna foi centrifugada por 15 s por 8000 x g. Em seguida, 500 µl de RPE foram adicionados a coluna e centrifugada a 8000 x g por 15 s, sendo esta etapa repetida e a coluna centrifugada a 8000 x g por 2 min. O RNA da coluna foi eluído duas vezes em 30 µl de água.

A concentração de RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). A qualidade dos ácidos nucleicos foi determinada pela

absorbância em 260 e 280 nm. Além disso, as amostras de RNA foram analisadas pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), com o kit RNA 6000 Nano LabChip®, segundo especificações do fabricante. A matriz de gel aplicada nos capilares do chip utilizado no Bioanalyzer contém uma mistura de fluoróforos que ao se ligar ao RNA emite fluorescência. Esta é quantificada e permite a verificação da integridade do RNA total através do índice de integridade do RNA (RIN) que varia de 0-10 em ordem crescente de integridade.

### 3.5 ISOLAMENTO DO RNA MENSAGEIRO

A partir de 500 ng de RNA total, em volume final de 125 µl, foi realizado o isolamento do mRNA através do PolyATtract® mRNA Isolation Systems (Promega). As amostras foram incubadas a 65°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 0,75 µl de sonda oligo(dT) biotinizada, e 3,25 µl de SSC 20X para a reação de anelamento. O material permaneceu em temperatura ambiente por cerca de 30 min. Neste período, as partículas magnéticas ligadas à streptavidina (SA-PMPs) foram lavadas três vezes com 300 µl de tampão SSC 0,5X. Para as lavagens, as SA-PMPs foram ressuspensas no tampão e capturadas na estante magnética na qual é removido o sobrenadante. Após as três lavagens, as SA-PMPs foram ressuspensas em 100 µl de tampão 0.5X SSC e distribuídos num volume de 25 µl para cada reação de anelamento. O material foi incubado a temperatura ambiente por 15 min, invertendo-se o tubo constantemente.

Após a incubação, as SA-PMPs foram colocadas na estante magnética e o sobrenadante (fração não ligada) foi removido e guardado a -70°C. As partículas foram lavadas 4 vezes com tampão SSC 0,1X em quantidades decrescentes (300 µl, 250 µl, 200 µl e 150 µl). Após as lavagens, as SA-PMP foram ressuspensas em 75 µl de água livre de nucleases e capturadas na estante magnética, o mRNA eluído foi transferido para um novo tubo. Uma nova eluição foi realizada com 50 µl de água livre de nuclease.

### 3.6 PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR em tempo real foi empregada para investigar a captura do RNA mensageiro isolado conforme descrito no item 3.5. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada através do kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Para a reação de síntese, 180 ng de mRNA foram incubados com 1 µL de iniciador randômico (500ng) à

72°C por 10 min. Após a incubação, foram acrescentados 1 µL de dNTPs (10 mM), 4 µL de tampão 5X, 2,4 µL de cloreto de magnésio, 0,125 µL de RNase OUT, 1 µL da enzima RT ImProm-II™ e quantidade suficiente de água livre de nucleases para um volume final de 10,4 µL. A reação permaneceu por 1 h a 42°C e, em seguida, foram adicionados 400 µL de água livre de nucleases. Toda a solução foi concentrada em filtro de centrifuga Amicon® Ultra. O volume foi reconstituído com água livre de nucleases para concentração 2 ng/µL.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas no equipamento Real-Time PCR System 7300 Applied Biosystems e consistiram em 10 ng de cDNA, 10 µL de SYBR® Green, 4 pmol de iniciador (actina ou 18S) e água em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL. O protocolo de amplificação consistiu em: 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 45 s. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada.

Quadro 3.1 Sequência nucleotídica dos pares de *primers* utilizados na reação PCR em tempo real.

Gene	Sequência (5' - 3')
Actina	F: GGCTCCATCCTTTCATCC
	R: GCCTGCCTGGTCATACTC
18S	F: GTGACCAAAGCAGTCATTTCG
	R: AGTACGTTCTCCCCGAACT

### 3.7 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO

Para a amplificação do RNA foi utilizado o Kit MessageAmp™ II aRNA Amplification (Life Technologies). O procedimento de amplificação consistiu na transcrição reversa do RNA utilizando um iniciador acoplado com um promotor T7 seguido da transcrição *in vitro* com T7 polimerase.

#### 3.7.1 Síntese do cDNA fita dupla com oligo(dT)

A partir de 250 ng de RNA total, volume final de 2,5 µl, foi realizada a transcrição reversa adicionando 2,5 µl de master mix contendo 0,25 µl de água livre de nuclease, 0,25 µl de iniciador oligo(dT) acoplado com um promotor T7, 0,5 µl de tampão primeira fita, 1 µl de dNTP, 0,25 µl de inibidor de RNase e 0,25 µl de transcriptase reversa (ArrayScript). A reação foi incubada a 42°C por 2 h e, em seguida, colocada no gelo.

Para a síntese da segunda fita do cDNA, foram adicionados a primeira reação 2,5 µl da tampão para segunda fita, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de DNA polimerase, 0,25 µl de RNase H e 15,75 µl de água livre de nuclease. A reação foi incubada a 16°C por 2 h e, em seguida, colocada no gelo prosseguindo para a purificação. Na etapa de purificação foram adicionados 250 µl de tampão de ligação ao cDNA de cada amostra. O material foi transferido para uma coluna de purificação e centrifugado a 10000 x g por 60 s. Em seguida as colunas foram lavadas com 500 µl de tampão de lavagem e centrifugadas novamente a 10000 x g por 60 s. As amostras de cDNA foram eluídas em 18 µl de água pré aquecida a 55°C e centrifugadas a 10000 x g por 90 s. Após a eluição, as amostras foram concentradas á vácuo no equipamento *Speed Vac* (Thermo Fisher Scientific) até 4 µl.

### 3.7.2 Síntese do cDNA fita dupla com miniéxon

A partir de 10ng de mRNA isolado no item 3.5, foram adicionados 0,5 µl de iniciador randômico e água para volume final de 3 µl. A reação foi incubada a 70°C por 10 min e em seguida transferida para o gelo. Posteriormente, procedeu-se para a transcrição reversa adicionando 2 µl de master mix contendo 0,5 µl de tampão primeira fita, 1 µl de dNTP, 0,25 µl de inibidor de RNase e 0,25 µl de transcriptase reversa (ArrayScript). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas e em seguida colocada no gelo. Após a transcrição reversa, foi adicionada 0,25 µl de RNase H que degrada todo o RNA deixando apenas o cDNA como molde para a síntese da segunda fita. A reação foi incubada a 37°C por 30 min.

Para a síntese da segunda fita do cDNA, acrescentou-se 1,25 µl do iniciador miniéxon, acoplado com um promotor T7, em cada tubo o qual foi incubado por 10 min a 70°C e, após esse período, colocado no gelo. Em seguida, adicionou-se 18,5 µl de mix da segunda fita em cada amostra contendo 0,25 µl de AccuPrime™ Pfx DNA Polimerase, 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de sulfato de magnésio e 15,25 µl de água. A reação foi incubada por 5 min a 95°C, 10 min a 45°C e 20 min a 68°C.

Após síntese da segunda fita, as amostras foram purificadas pelo kit PureLink® PCR micro (Invitrogen). Em cada amostra, foram adicionados 4 volumes do tampão de ligação com 45% de isopropanol. Após a mistura dos componentes, estes foram transferidos para uma coluna de purificação e centrifugados a 10000 x g por 1 min. As colunas foram lavadas com 650 µl de tampão de lavagem contendo etanol. Novamente, as colunas foram centrifugadas a 10000 x g por 1 min e descartou-se o *flow-through*. Imediatamente, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 14000 x g por 1 min para retirar todo o etanol. As colunas foram transferidas para um tubo de coleta e as amostras foram eluídas em 10 µl de

tampão de eluição. A reação permaneceu em temperatura ambiente por 1 min e em seguida foi centrifugada 14000 x g por 1 min para coletar o RNA eluído.

### 3.7.3 Transcrição *in vitro*

A transcrição *in vitro* das amostras foi realizada a partir do cDNA dupla fita. Em cada amostra foram adicionados 1 µl de ATP, 1 µl de CTP, 1 µl de GTP, 1 µl de UTP, 1 µl de T7 tampão de reação 10X e 1 µl de T7 RNA polimerase. Toda a reação foi incubada a 37°C por 14 h, ao final deste período, foi adicionada água até o volume de 100 µl a fim de parar a reação. Em seguida, procedeu-se para a purificação do RNA amplificado. Para tanto, foram adicionados 350 µl de tampão de ligação ao RNA amplificado e 250 µl de etanol 100% nas amostras os quais foram transferidos para uma coluna de purificação e centrifugados a 10000 x g por 60 s. As colunas foram lavadas com 650 µl de tampão de lavagem e centrifugadas novamente a 10000 x g por 60 s. Para a eluição das amostras, foram adicionados 200 µl de água na temperatura de 55°C nas colunas as quais foram incubadas por 10 min a 55°C seguidas de centrifugação a 10000 x g por 90 s. Após a purificação, a concentração dos aRNAs foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

## 3.8 RNA-SEQ

### 3.8.1 Preparo das bibliotecas

Após a amplificação, as amostras foram preparadas para entrar na plataforma SOLiD, segundo o protocolo *Whole Transcriptome Library Preparation for SOLiD™ Sequencing*. O fluxograma de trabalho para a preparação das bibliotecas contendo SOLiD™ System Barcode está representado na figura 3.1.

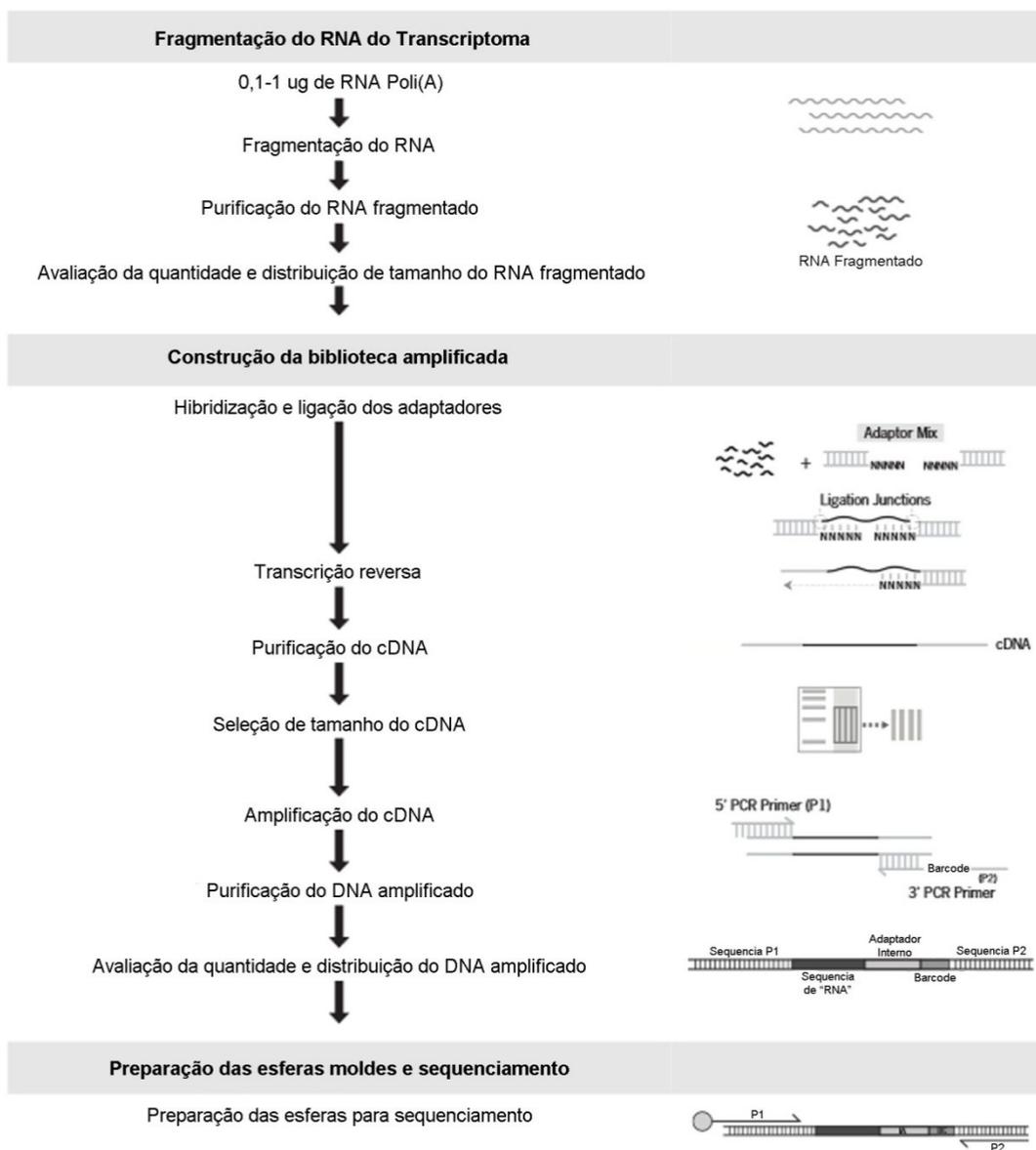


Figura 3. 1 Preparo das bibliotecas de RNA-Seq (SOLiD). Os passos presentes na figura resumem o protocolo apresentado no tópico 3.7.1. ( modificado do manual *Whole Transcriptome Library Preparation for SOLiD™ Sequencing*.)

Após a amplificação das amostras de RNA (item 3.7), 500 ng de cada mRNA foram fragmentados por RNase III, utilizando-se 0,4 µl de RNase III e 0,4 µl de tampão em um volume final de 4 µl usando componentes do kit *SOLiD Small RNA Expression*. A reação foi incubada a 37°C por 10 min e interrompida pela adição de 96 µl de água livre de nuclease. O RNA foi purificado através do kit *RiboMinus Concentration Module* (Invitrogen). Com o RNA fragmentado, foi feita a hibridização e ligação dos adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos de RNA utilizando componentes do kit *SOLiD Small RNA Expression*. Para tal, foram utilizados 0,8 µl de solução contendo adaptadores, 1,2 µl de solução de hibridização e todo o RNA fragmentado em 1,2 µl. O material foi incubado a 65°C

por 10 min e, em seguida, a 16°C, por 5 min. Imediatamente, foram adicionados 4 µl de tampão de ligação 2X e 0,8 µl da mistura da enzima ligase e a reação foi incubada a 16°C por 16 h.

Após a ligação dos adaptadores, foi realizada a transcrição reversa, com os componentes do kit *SOLiD Small RNA Expression*. Aos 8 µl da reação de ligação, foram adicionados 4,4 µl de água livre de nuclease, 1,6 µl de tampão RT 10X, 0,8 µl de dNTP 2,5 mM e a reação foi incubada a 70°C por 5 min. Após a incubação, foi adicionado 0,4 µl de transcriptase reversa e a reação permaneceu a 42°C, por 30 min. Após o término da reação de transcrição reversa, o material foi purificado com o kit *MinElute PCR Purification* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

O material resultante da transcrição reversa foi separado em gel de poliacrilamida 6% desnaturante, usando o sistema Novex de gel com uréia e TBE (Invitrogen). Após a corrida das amostras em uma cuba XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen), o gel foi corado com SYBR Gold (Invitrogen) e a seleção dos fragmentos de 150-250 bases foi realizada através da excisão da banda do gel com o tamanho adequado. O fragmento de gel selecionado foi subdividido em 4 partes longitudinais, sendo 2 partes guardadas a -20°C e outras 2 utilizadas para a amplificação do cDNA. Estas foram colocadas em um tubo de 0,2 ml e adicionados 0,8 µl da solução de iniciadores (contendo SOLiD™ System Barcode) e 99,2 µl do mix para PCR utilizando reagentes do kit *SOLiD Small RNA Expression*. A amplificação foi realizada através de 15 ciclos de 95°C por 30 s, 62°C por 30 s e 72°C por 30 s, sucedidos por incubação a 72°C por 7 min. Finalmente, o material amplificado foi purificado com o kit *Pure Link™ PCR Micro* (Invitrogen) e sua concentração final foi verificada através do equipamento Qubit (Invitrogen).

### 3.8.2 Preparo das esferas magnéticas para sequenciamento

O preparo das esferas magnéticas para o sequenciamento foi realizado através do sistema SOLiD™ EZ Bead™. Este novo sistema simplifica o fluxo de trabalho ao automatizar diversas etapas do procedimento, aumentando a produtividade do experimento, além de possuir pontos de checagem para um melhor controle experimental.

As PCRs em emulsão (ePCR) foram realizadas com objetivo de amplificar as bibliotecas de interesse, segundo protocolo *SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier Getting Started Guide*, mais especificamente para E80 (produção de 1 bilhão de beads). Durante a ePCR, cerca de 30 mil cópias clonais do DNA molde, ligados a esfera através do adaptador P1, foram geradas em cada esfera magnética. Após a ePCR, uma etapa de enriquecimento foi

realizada com a finalidade de lavar e isolar as esferas contendo DNA amplificado através de esferas de poliestireno com uma sequência complementar ao adaptador P2.

A fim de preparar o DNA molde para deposição na lâmina, um nucleotídeo dUTP modificado foi adicionado a sua extremidade através de uma reação com terminal transferase. Este nucleotídeo possui modificações que permitem a ligação na sílica da lâmina de sequenciamento.

### 3.8.3 Deposição das esferas e sequenciamento

O preparo das lâminas e sequenciamento foi realizado segundo o protocolo *SOLiD™ 4 System Instrument Operation Guide*. O volume foi ajustado para cerca de 600 milhões de esferas com DNA molde, as quais foram lavadas com tampão de deposição e colocadas em um único poço de uma câmara de deposição e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente para aderir. Por fim, a lâmina foi instalada no aparelho SOLiD™ 4 System.

Os sequenciamentos foram realizados segundo o protocolo SOLiD Multiplex no qual primeiramente foi realizado o sequenciamento dos *barcodes* através de iniciadores complementar ao adaptador interno. A seguir foi realizado o sequenciamento dos fragmentos através de ciclos de ligação para cada um dos iniciadores de sequenciamento, resultando em leituras de 50 bases para cada esfera molde. O lançamento das corridas, bem como o processamento dos sequenciamentos para geração, obtenção e controle dos dados foi realizado através do programa *SOLiD™ Instrument Control Software*.

## 3.9 ANÁLISES DOS DADOS

Após o sequenciamento das amostras na plataforma SOLiD, as leituras geradas foram alinhadas nos genomas de referência do parasita e da célula hospedeira. O mapeamento no genoma do *Trypanosoma cruzi* foi realizado através do programa *Applied Biosystem Whole Transcriptome Pipeline (ab\_wtp)*. As leituras foram alinhadas com os dois haplótipos da cepa usada para o sequenciamento do genoma (CL-Brener), denominadas de Esmeraldo e não-Esmeraldo. Foram levadas em conta sequências com alinhamento de 30 a 40 nucleotídeos. Para o alinhamento das leituras gerados no genoma da célula hospedeiro foi utilizado o programa *LifeScope* e o genoma de referência foi o *Homo sapiens* pelo fato do genoma de *C. aethiops*, espécie referente a célula Vero, não estar sequenciado e os genomas de outras primatas disponíveis não estarem bem anotados.

As leituras alinhadas nos genomas de referência foram normalizados e analisados para expressão diferencial no pacote edgeR (Robinson *et al.*, 2010) do programa R, considerando diferentes níveis de confiabilidade estatística (*false discovery rate*, FDR).

Para análise do enriquecimento de termos de ontologia gênica (*gene ontology*, GO), foi retirada a redundância dos dados de expressão gênica pelo teste ANOVA. O pacote Expander (Shamir *et al.*, 2005) foi usado para o agrupamento através do método de *self organizing map* (SOM), para análise de enriquecimento de categorias funcionais do GO (*Gene Ontology*), utilizando  $FDR \leq 0,05$ , e para as análises de vias enriquecidas no bancos de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Além disso, foram construídos gráficos com padrão de modulação de cada gene. Para calcular a média entre as réplicas de cada ponto analisado foi utilizado a função Lowess (*Locally-Weighted Regression Scatter plot Smoothing*) do software R que realiza uma regressão polinomial localmente ponderada (CLEVELANT, 1979).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil de infecção com parasitas cepa Dm28c e Y

Para ampliar os estudos da interação *T. cruzi*-célula hospedeira, utilizamos neste trabalho a linhagem celular Vero e as cepas Dm28c e Y do *Trypanosoma cruzi* e avaliamos o transcrito de ambas as células, através da tecnologia de RNA-Seq. A cepa Dm28c, isolada de *Didelphis marsupialis*, pertence ao grupo *T. cruzi* I, o qual é associado com o ciclo selvagem de transmissão e mamíferos arbóreos (ZINGALES *et al.*, 2009). Por outro lado, a cepa Y, isolada do homem, pertence ao grupo *T. cruzi* II, o qual está relacionado com o ciclo doméstico de transmissão e nichos terrestres.

Para determinar o tempo de interação entre o parasita e a célula visando uma maior homogeneidade entre as infecções e quantidade adequada de parasita para os experimentos de RNA-Seq, foram realizados testes de infecção em diferentes condições. Neste teste foram avaliados: quantidade de parasita por célula (10:1; 100:1), tempo de interação (1, 2, 3 e 4 h) e os pontos a serem avaliados (2, 4, 6, 12, 24, 48 h). Após análise dos resultados, verificamos que a quantidade de 10 parasitas por célula seria ideal por apresentar quantidade de infecção suficiente para as análises posteriores. Enquanto a taxa de 100 parasitas por célula seria inviável devido à grande demanda de parasitas necessários. O tempo de interação foi definido em 4 horas por apresentar uma homogeneidade entre os experimentos e quantidade de infecção adequada para as próximas etapas, enquanto para os demais tempos de interação a quantidade de infecção foi mais baixa. Os pontos foram definidos de acordo com a cinética de infecção representando etapas importantes desse processo. O ponto de 2 horas caracteriza-se por apresentar as etapas de adesão, invasão e permanência no vacúolo parasitóforo, seguido do escape do vacúolo para o citoplasma e início da diferenciação em amastigotas no período de 6 horas. Nos pontos mais tardios, no período de 24 horas ocorre a diferenciação em amastigotas e início de intensa proliferação do parasita no seu ciclo intracelular que se intensifica em 48 horas. Portanto, os parâmetros ideais para o experimento foram definidos em 10 parasitas por célula, 4 horas de interação e os pontos de 2, 6, 24 e 48 horas.

A cinética de infecção foi analisada em microscopia ótica e o perfil de infecção pode ser visualizado nas figuras de 4.1 a 4.6. Para o modelo de infecção Vero/Dm28c houve uma porcentagem de infecção maior do que 60 % desde os pontos iniciais (2 h – 6 h) e a quantidade de parasitas no interior da célula aumentou ao longo da cinética de infecção. Nos pontos de 2 e 6 h a quantidade de parasita intracelular foi de 2 a 3 por célula. No ponto de 24 h,

caracterizado pelo início da multiplicação intracelular, houve um aumento para mais de 7 parasitas interiorizadas por célula culminando com mais de 25 em 48 horas (Figura 4.3 e 4.4).

Um perfil diferente de infecção foi encontrado para a cepa Y (figura 4.5 e 4.6), no qual todos os pontos da cinética apresentaram uma porcentagem de infecção inferior a 40 % e a quantidade de parasitas no interior das células se mantém baixa, menos de 2 por célula, até o ponto de 24 horas aumentando para aproximadamente 6 no ponto de 48 h. Através desta análise por microscopia, verificamos que em ambas as infecções a porcentagem de células infectadas foi homogênea logo, a partir de 6 horas o que mudou na cinética de infecção foi a quantidade de parasitas no interior da célula. Além disso, a infecção pela cepa Dm28c foi mais infectiva que a cepa Y pelo fato de invadir um maior número de células e por apresentar mais parasitas no interior da célula.

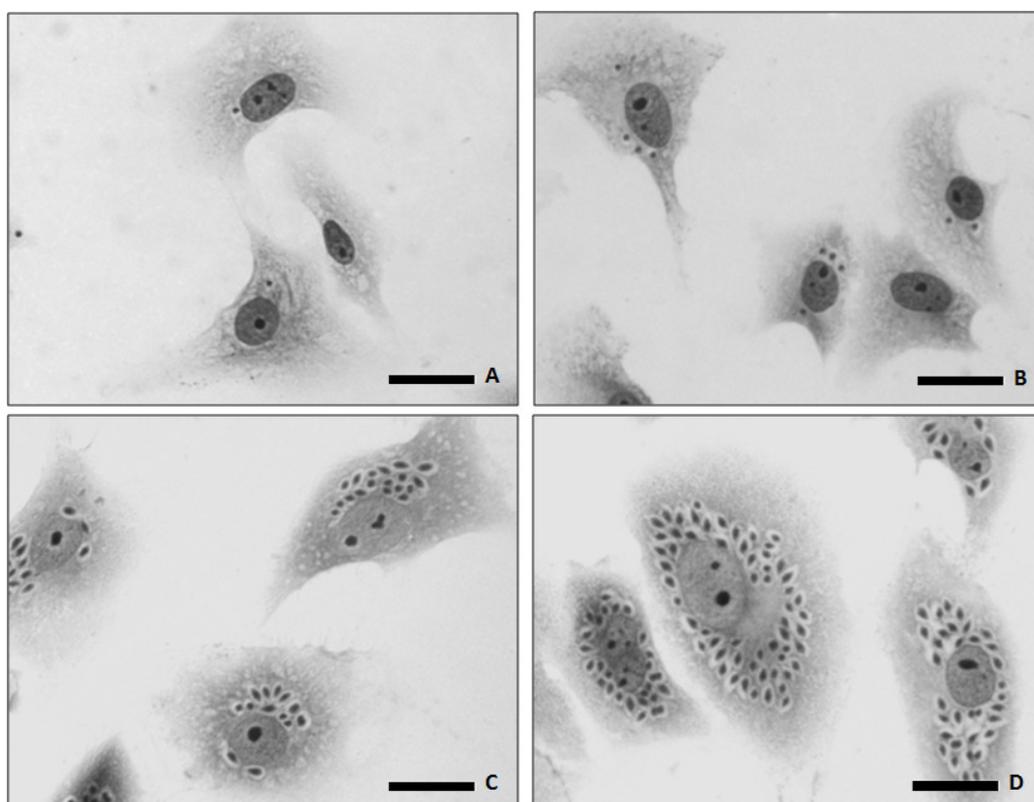


Figura 4.1 Perfil de infecção das células Vero durante cinética de interação com *T. cruzi* Dm28c coradas com Giemsa. A: 2 h após infecção. B: 6 h após infecção. C: 24 h após infecção. D: 48 h após infecção Barra: 20  $\mu$ m.

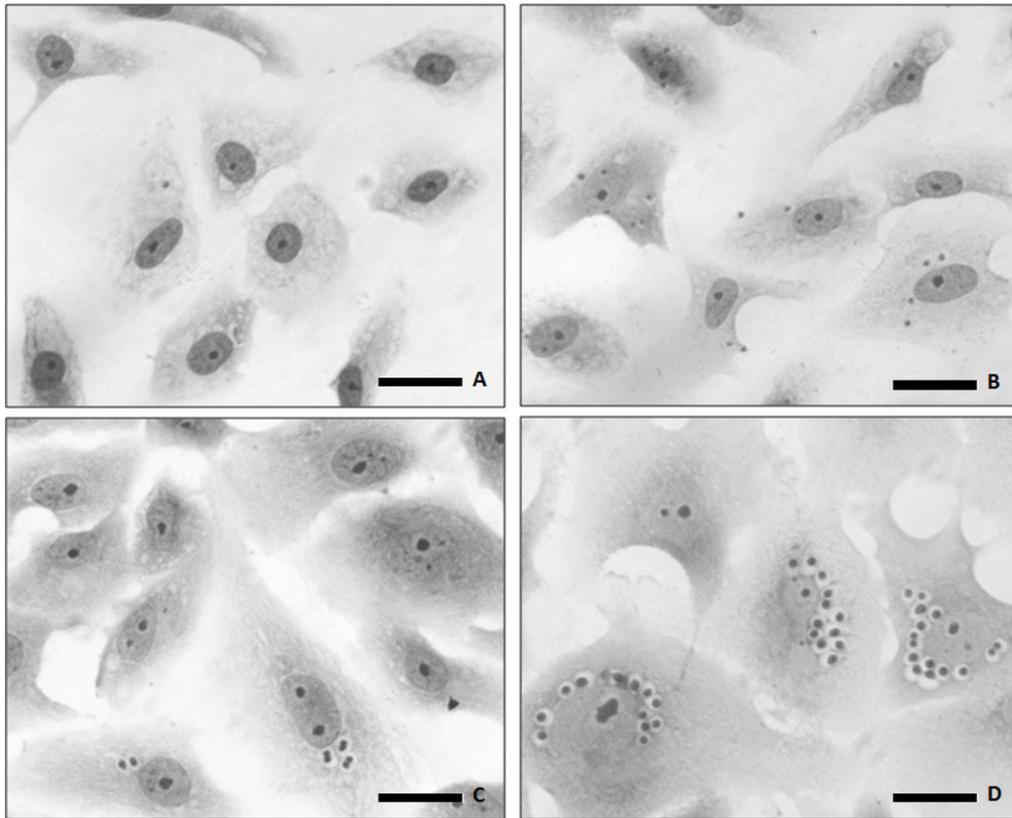


Figura 4.2 Perfil de infecção das células Vero durante cinética de interação com *T. cruzi* Y coradas com Giemsa. A: 2 h após infecção. B: 6 h após infecção. C: 24 h após infecção. D: 48 h após infecção Barra: 20  $\mu$ m.

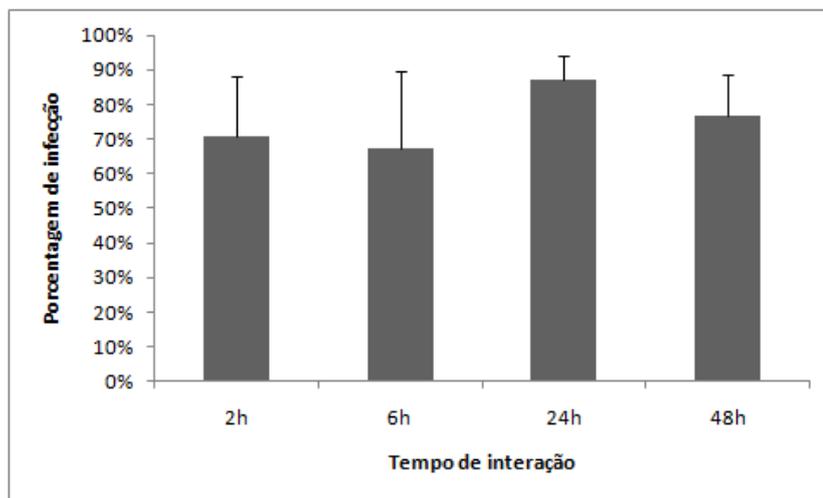


Figura 4.3 Porcentagem de células Vero infectadas com *T. cruzi* Dm28c durante a cinética de infecção. Os valores apresentados correspondem às médias de quatro réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão.

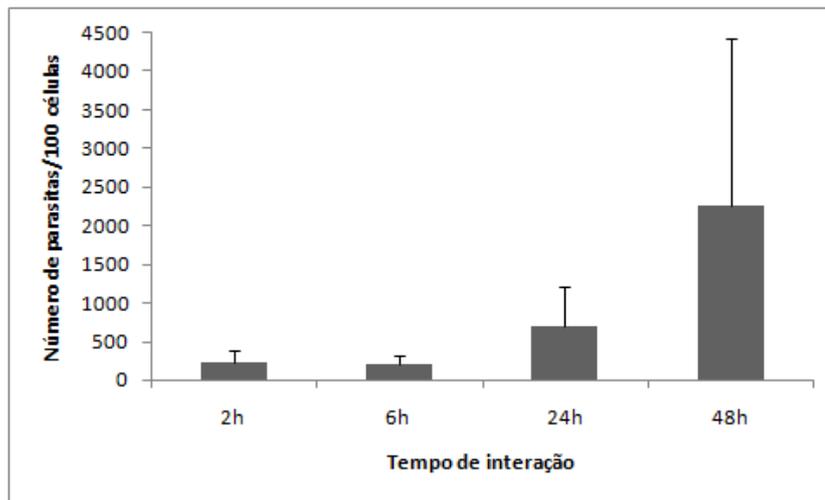


Figura 4.4 Relação de parasitas intracelulares/100 células Vero durante cinética de interação com *T. cruzi* Dm28c. Os valores apresentados correspondem às médias de quatro réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão.

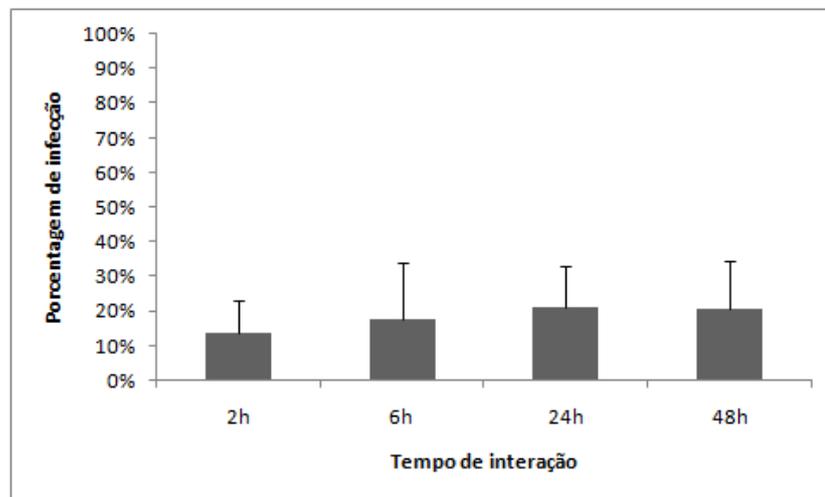


Figura 4.5 Porcentagem de células Vero infectadas com *T. cruzi* Y durante a cinética de infecção. Os valores apresentados correspondem às médias de quatro réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão.

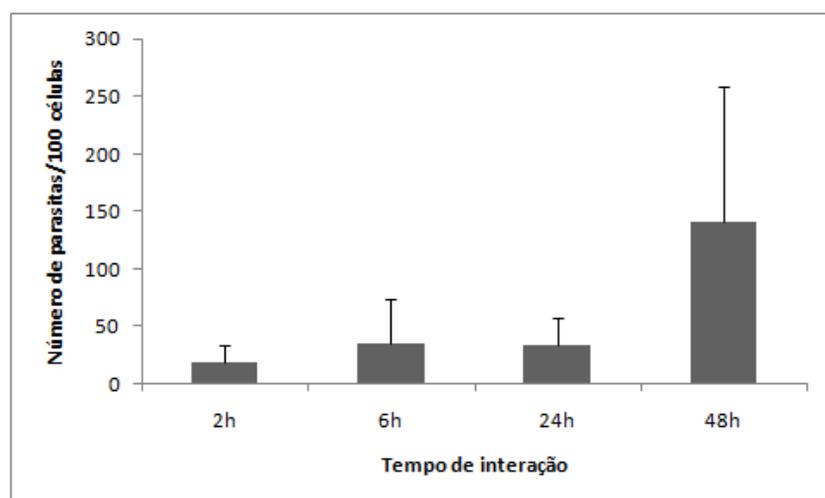


Figura 4.6 Relação de parasitas intracelulares/100 células Vero durante cinética de interação com *T. cruzi* Y. Os valores apresentados correspondem às médias de quatro réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão.

#### 4.2 Extração do RNA e captura do *mRNA do Trypanosoma cruzi*

Os experimentos foram realizados em quatro réplicas para cada modelo (Vero/Y e Vero/Dm28c), totalizando 6 amostras por réplica: um controle da célula Vero, um controle do parasita, e os 4 pontos de infecção. Após a extração do RNA total, as amostras foram avaliadas quanto à integridade e qualidade através de eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). O valor de RIN (que varia de 0-10) expressa a integridade do RNA de modo que valores igual ou inferior a 5 representam moderada degradação da amostra. Os valores de RIN de cada amostra estão representados na tabela 4.1, na qual é possível verificar que a maioria das amostras possui valores acima de 7, demonstrando boa integridade. Apenas algumas amostras apresentaram valores próximos de 5.

Tabela 4. 1 Número de integridade do RNA total.

Amostra	RIN	Amostra	RIN
C0A	7.60	Y48B	7.70
Dm0A	5.60	C0C	7.80
Y0A	5.90	Dm0C	5.50
Dm2A	7.30	Y0C	5.20
Y2A	7.20	Dm2C	7.50
Dm6A	6.80	Y2C	7.40
Y6A	7.10	Dm6C	7.50
Dm24A	7.20	Y6C	7.10
Y24A	7.40	Dm24C	7.60
Dm48A	7.80	Y24C	7.10
Y48A	7.40	Dm48C	7.60
C0B	6.50	Y48C	7.30
Dm0B	5.30	C0D	6.90
Y0B	5.20	Dm0D	5.30
Dm2B	6.50	Y0D	5.10
Y2B	7.80	Dm2D	8.30
Dm6B	7.70	Y2D	8.70
Y6B	8.30	Dm6D	8.80
Dm24B	7.60	Y6D	7.90
Y6B	8.30	Dm24D	8.40
Dm24B	7.60	Y24D	8.20
Y24B	9.20	Dm48D	8.20
Dm48B	6.50	Y48D	8.30

Legenda: As amostras estão descritas seguindo a nomenclatura: modelo de infecção (Dm ou Y), seguido do ponto de infecção (0, 2, 6, 24 ou 48 horas) e da réplica (A, B, C ou D). Os pontos 0 são os controles da célula Vero (C0), Dm28c (Dm0) e Y (Y0).

A figura 4.7 representa eletroferogramas, gráficos criados pela detecção de sinal em função do tempo decorrido da amostra, gerado pelo software do aparelho (Agilent 2100 Bioanalyzer) no qual se observam dois perfis de RNA total. O primeiro quadro exemplifica

uma amostra íntegra com ótimo valor de RIN (9.2), no qual podemos observar um perfil adequado para RNA total devido à presença de uma linha contínua, seguida por dois picos do RNA ribossomal da célula hospedeira (18S e 28S). Por outro lado, o segundo quadro exemplifica uma amostra com pequena degradação (valor de RIN 6.5), verificada pela presença de alguns picos e a elevação da linha que antecede os dois picos do RNA ribossomal.

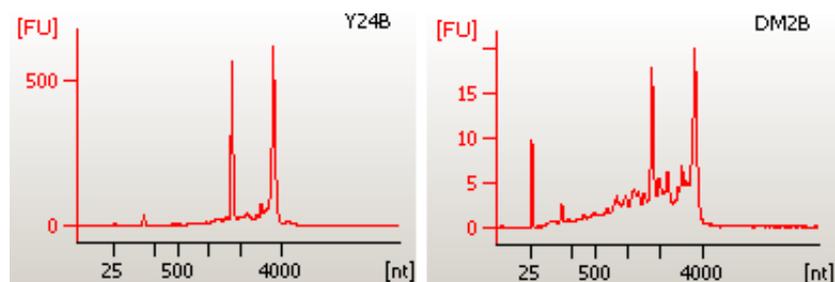


Figura 4. 7 Eletroferograma do RNA total obtido pelo Agilent 2100 Bioanalyzer das amostras infectadas Y24B e Dm2B.

Após a análise dos valores de RIN e dos eletroferogramas escolhemos proceder os experimentos com as réplicas A, B e D.

Considerando que a maior parte do RNA extraído é proveniente da célula hospedeira, apenas uma pequena parcela das sequências geradas será mapeada no genoma do parasita. Dessa forma, um dos objetivos deste projeto era desenvolver uma metodologia de enriquecimento do RNA do parasita, para melhorar as análises de modulação gênica no *T. cruzi* durante o processo de infecção. Esse sistema de enriquecimento foi baseado no Kit *PolyAtract® mRNA Isolation Systems* da Promega (item 3.5 de materiais e métodos), no qual uma sequência de oligo dT acoplada a uma biotina se liga à cauda poli-A do RNA mensageiro. O mRNA ligado ao oligo dT-biotina, por sua vez, se liga a uma partícula magnética ligada a uma estreptavidina. Através de uma estante magnética, todo o sistema mRNA/oligo dT-biotina/estreptavidina é capturado e, por fim, o mRNA pode ser eluído. Para o nosso sistema, substituímos a sequência de oligo dT por uma sequência complementar ao miniéxon (ME). Todos os RNA mensageiros maduros do *T. cruzi* possuem uma sequência conhecida como miniéxon na extremidade 5', a qual é inserida no processo de *trans-splicing*. Para isso, foram desenhadas 3 sequências diferentes ao longo do miniéxon, como esquematizado na figura 4.8.

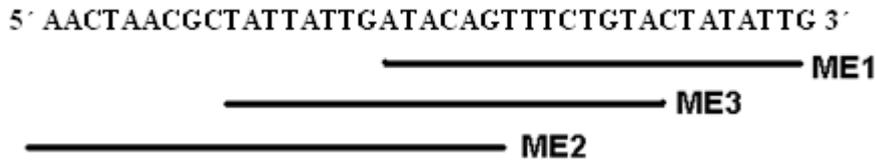


Figura 4. 8 Sequência do miniéxon de *T. cruzi* e o esquema das 3 sondas complementares ao miniéxon (ME).

Foram testados diversas condições no protocolo com as três sondas para o miniéxon e, em paralelo, a sequência de oligo dT, a fim de otimizar a purificação dos mRNA. Foram avaliados: a quantidade inicial de RNA total, a temperatura e o tempo de anelamento e tempo de incubação com as esferas. A purificação foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando um iniciador para verificar a amplificação dos mRNAs e um iniciador para verificar a amplificação dos RNAs ribossomais. Na figura 4.9, a qual apresenta um gráfico de amplificação dos genes actina e 18S por PCR em tempo real, foi possível verificar uma diminuição da quantidade de RNA ribossomal e um enriquecimento dos mRNAs. No entanto, o enriquecimento com as sequências de miniéxon foi menor do que com a sequência oligo dT. Considerando a quantidade inicial (nanogramas) de RNA total e a obtida no final, a porcentagem de captura de cada sistema foi determinada de modo que a sequência oligo dT obteve 2,5 % de captura de RNA, enquanto para a sequência ME2 foi de 0,9 % e apenas 0,25 % para ME1 e ME3, demonstrando que a eficiência de captura pelo miniéxon foi inferior.

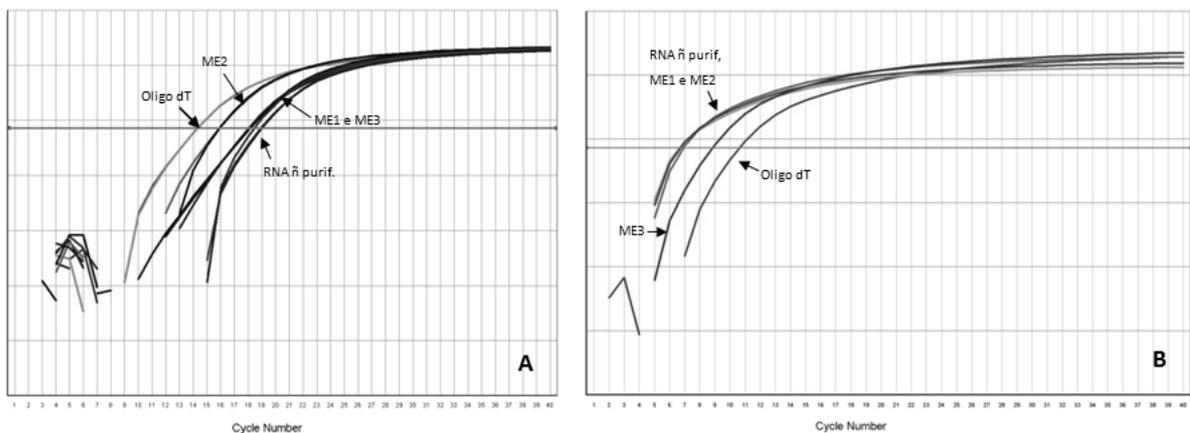


Figura 4. 9 Gráfico de amplificação obtido na PCR em tempo real para os genes actina (A) e 18S (B). Legenda: Oligo dT, amostras isoladas com sonda oligo dT; RNA ã purif, RNA total sem enriquecimento; ME1, ME2, ME3, amostras isoladas com sequência miniéxon 1, 2 e 3, respectivamente.

Diante desse resultado, supomos que o miniéxon presente no mRNA poderia apresentar uma estrutura secundária que estaria dificultando a ligação da sonda. Para isso,

realizamos alguns testes com temperaturas (65 °C, 70 °C e 75 °C) e tempos de incubação (10 min, 30 min e 2 h) da sequência de miniéxon com as amostras de RNA na tentativa de desfazer essa possível conformação, mas os resultados tiveram um perfil semelhante aos exibidos na figura 4.9.

Uma alternativa para melhorar a captura do mRNA seria a purificação das sequências de miniéxon para eliminar qualquer biotina não ligada à sonda que poderia estar competindo pela estreptavidina. Em face ao tempo limitado para darmos andamento ao projeto, optamos por utilizar uma alternativa de enriquecimento do RNA do parasita das amostras deste trabalho.

Outra metodologia utilizada para enriquecer o RNA do parasita utilizando a estratégia de captura pelo miniéxon foi a amplificação do RNA. O procedimento de amplificação consistiu na transcrição reversa do RNA utilizando um iniciador acoplado com um promotor T7 e uma transcriptase reversa com alto rendimento. Em seguida, foi realizada a transcrição *in vitro* com T7 polimerase. Esse procedimento tem sido muito utilizado na literatura para amplificar transcritomas sem perder a proporcionalidade da expressão do gene (WANG, 2005).

Esse procedimento de amplificação foi realizado primeiramente com um iniciador oligo dT (item 3.6.1) com o objetivo de aumentar a quantidade de material para o sequenciamento. Sem essa etapa de amplificação seria necessária maior quantidade de células hospedeiras bem como de parasitas e materiais utilizados para o cultivo e extração do RNA de todas as amostras. Para o enriquecimento do RNA do parasita utilizamos a mesma estratégia de amplificação utilizada com oligo dT com modificações no protocolo. Foram testados a quantidade inicial de RNA, a temperatura de anelamento para síntese da segunda fita do DNA e a quantidade de álcool na purificação da segunda fita. Para a captura do RNA do parasita optamos por realizar uma prévia purificação isolando o mRNA, através de esferas magnéticas acopladas a uma sequência de oligo dT (tópico 3.5), a fim de minimizar ligações inespecíficas de outros RNAs com o iniciador de miniéxon, diminuindo a eficiência do sistema de captura.

Após a amplificação, os RNAs foram dosados no espectrofotômetro NanoDrop e sua integridade foi avaliada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. A tabela 4.2 expõe os valores do RNA total de cada amostra após a amplificação por miniéxon e oligo dT. Através de eletroforese capilar verificamos que as amostras Y2A e Y0B não tiveram seu RNA amplificado ao se utilizar do iniciador miniéxon. A média de amplificação com miniéxon das amostras foi de aproximadamente 160 vezes mais amostra em relação à quantidade inicial de 10 ng, variando de 17 vezes (Y6B) até 1360 vezes (Dm0D). Um perfil diferente foi verificado na amplificação oligo dT no qual pode-se verificar uma maior homogeneidade entre as

amostras. A média de amplificação foi de aproximadamente 140 vezes mais amostra em relação à quantidade inicial de 250 ng e a variabilidade entre as amostras oscilou de 76 vezes (C0B) até 188 vezes (Y0D). As amostras controles de célula Vero também tiveram amplificação, como verificado na tabela 4.2, indicando que houve ligação inespecífica da sequência de miniéxon mesmo após a otimização do protocolo de amplificação.

Tabela 4. 2 Quantidade de RNA das amostras após a amplificação com sequência de oligo dT e miniéxon

Amostra	RNA total (oligo dT)	RNA total (miniéxon)	Amostra	RNA total (oligo dT)	RNA total (miniéxon)
C0A	36380	540	Y6B	36680	170
Dm0A	39120	4680	Dm24B	40940	1020
Y0A	36280	3000	Y24B	39720	220
Dm2A	27340	320	Dm48B	39640	2380
Y2A	32600		Y48B	41180	670
Dm6A	29340	280	C0D	40280	400
Y6A	31180	610	Dm0D	44760	13600
Dm24A	27040	850	Y0D	47160	9660
Y24A	36740	240	Dm2D	45180	538
Dm48A	42220	1760	Y2D	38420	354
Y48A	34140	620	Dm6D	43680	500
C0B	19200	360	Y6D	42220	428
Dm0B	43400	4880	Dm24D	40920	1310
Y0B	33920		Y24D	44100	584
Dm2B	25520	240	Dm48D	45620	1330
Y2B	22180	1580	Y48D	44600	1880
Dm6B	39560	630			

Legenda: Oligo dT: sequência de oligo dT utilizada na amplificação do mRNA das amostras. Miniéxon: sequência de miniéxon utilizada na amplificação do mRNA das amostras.

A figura 4.10 representa um eletroferograma obtido pelo Agilent 2100 Bioanalyzer no qual compara o perfil de RNA da amostra Y6B amplificada com oligo dT e com miniéxon com o perfil do RNA total. Na figura A vemos um perfil adequado para RNA total no qual há os dois picos do RNA ribossomal da célula hospedeira (18S e 28S). Nas figuras B e C vemos um pico com ampla distribuição no início do gráfico, o qual representa um perfil esperado de amplificação do RNA mensageiro. No entanto, a área sob a curva da figura B é maior do que na figura C demonstrando maior amplificação de mRNAs com a sequência de oligo dT. Isso se deve ao fato de que todos os mRNA estão sendo amplificados, ou seja, do parasita e da célula Vero com a sequência oligo dT. O mesmo não ocorre com a sequência de miniéxon

visto que é complementar a uma sequência presente apenas nos mRNAs do parasita, apesar de ocorrer amplificação espúria nas amostras controles (tabela 4.2).

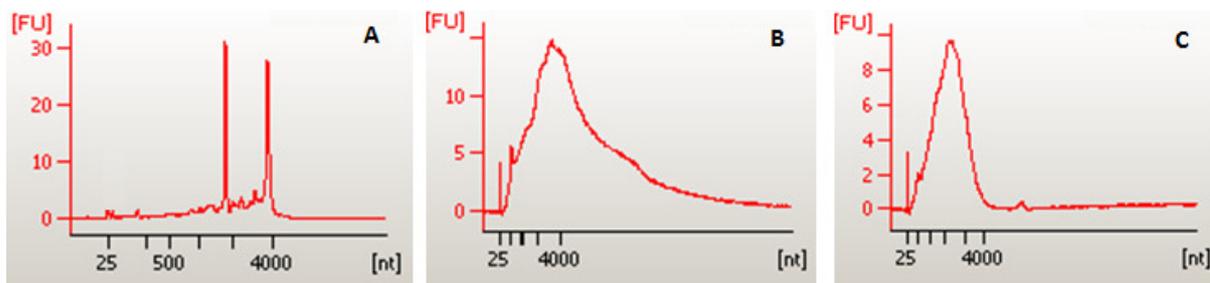


Figura 4. 10 Eletroferograma obtido pelo Agilent 2100 Bioanalyzer da amostra Y6B. A: RNA total. B: RNA amplificada com Oligo dT. C: RNA amplificado com miniéxon.

#### 4.3 Sequenciamento e alinhamento nos genomas de referência.

As 33 amostras amplificadas com oligo dT foram preparadas para entrar na plataforma SOLiD contendo a sequência *barcode* utilizada na identificação das amostras após o sequenciamento. Para que esse sistema de identificação seja eficiente, cada amostra deve conter um *barcode* diferente. No laboratório temos disponível apenas 31 barcodes diferentes, dessa maneira, 2 amostras (Dm2B e Dm6B) foram sequenciadas em um *pool* de amostras diferentes. As amostras amplificadas por miniéxon estão em fase de preparo das bibliotecas para o sequenciamento.

Após o sequenciamento espera-se obter uma quantidade adequada de leituras para as análises posteriores. Essa quantidade está em torno de 50 milhões de *reads* por amostra em organismos eucariotos complexos, como a célula Vero, e cerca de 10 a 15 milhões de *reads* por amostra para o *Trypanosoma cruzi*. Neste contexto, inicialmente 2 corridas foram realizadas com as 31 amostras, gerando em média 17 milhões (corrida 1) e 15 milhões (corrida 2) de leituras para cada amostra (tabela 4.3). Como esse valor está abaixo do ideal foi necessária a realização de uma nova corrida. Além disso, nas primeiras corridas algumas amostras apresentaram quantidade inferior de sequências geradas (abaixo de 13 milhões) quando comparadas às demais amostras. Para melhorar esse perfil um novo conjunto para a PCR de emulsão foi preparado aumentando a quantidade das amostras C0B, Dm0A, Dm0B, Y2B, Dm24D e Y48D. Dentre as amostras que tiveram seu material enriquecido no novo conjunto, apenas as amostras C0B e Y2B obtiveram aumento na quantidade de sequências geradas na terceira corrida. C0B aumentou de aproximadamente 7 milhões para 18 milhões de *reads* e Y2B aumentou de 8 milhões para 34 milhões de *reads*.

Tabela 4. 3 Quantidade de sequências geradas pelo RNA-Seq

Amostra	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5	Total
C0A	14.527.280	13.179.683	5.423.571			33.130.534
C0B	7.731.301	6.823.630	18.204.131			32.759.062
C0D	15.153.086	14.545.818	6.542.784			36.241.688
Dm0A	12.582.648	11.832.928	6.104.544			30.520.120
Dm0B	13.163.641	12.128.901	8.035.110			33.327.652
Dm0D	15.419.071	14.292.377	6.380.053			36.091.501
Dm2A	13.424.729	12.219.608	4.613.947	10.150.107	9.530.446	49.938.837
Dm2B				16.152.645	16.786.809	32.939.454
Dm2D	32.883.927	26.087.157	18.399.656	57.186.031	62.452.900	197.009.671
Dm6A	20.877.758	19.889.740	8.122.674	18.563.597	18.082.292	85.536.061
Dm6B				35.549.560	37.640.006	73.189.566
Dm6D	29.110.089	23.964.509	15.624.288	35.348.056	35.002.006	139.048.948
Dm24A	26.762.385	23.555.539	11.447.116			61.765.040
Dm24B	27.803.826	24.214.592	13.330.984			65.349.402
Dm24D	11.032.041	10.682.895	7.774.069			29.489.005
Dm48A	15.216.614	13.611.563	6.724.941			35.553.118
Dm48B	20.504.104	18.326.927	8.766.616			47.597.647
Dm48D	17.332.081	16.115.198	7.532.430			40.979.709
Y0A	14.678.652	14.379.966	5.322.185			34.380.803
Y0B	13.827.105	12.518.033	5.599.917			31.945.055
Y0D	19.210.231	18.597.322	8.540.039			46.347.592
Y2A	14.233.013	13.335.914	5.105.160	10.353.989	9.789.520	52.817.596
Y2B	8.834.425	7.588.518	34.182.550	16.728.714	16.535.065	83.869.272
Y2D	17.461.792	15.418.135	7.726.341	13.668.040	14.114.944	68.389.252
Y6A	18.748.377	17.362.175	8.902.572	17.698.043	19.698.109	82.409.276
Y6A	15.721.667	14.160.892	7.495.381	16.207.164	17.192.921	70.778.025
Y6D	13.835.463	12.384.670	5.843.976	23.119.014	22.991.974	78.175.097
Y24A	20.835.863	17.990.990	9.567.037			48.393.890
Y24B	14.222.346	12.303.958	6.745.554			33.271.858
Y24D	13.585.383	12.600.478	5.441.291			31.627.152
Y48A	18.927.744	17.183.410	8.621.022			44.732.176
Y48B	17.507.084	17.231.841	6.649.341			41.388.266
Y48D	13.157.731	12.153.414	7.650.385			32.961.530
Média	17.042.305	15.376.799	9.239.344	22.560.413	23.318.083	87.536.944
Total	528.311.457	476.680.781	286.419.665	270.724.960	303.135.075	1.291.411.903

Com o intuito de identificar melhor o transcrito do parasita, foi realizada uma corrida de sequenciamento apenas com as amostras de 2 e 6 h, gerando mais sequências nestes pontos iniciais os quais possuem menor quantidade de parasitas no interior da célula. Nestas corridas (4 e 5) foram sequenciadas as amostras Dm2B e Dm6B que ficaram fora das primeiras corridas devido à falta de *barcodes* diferentes. Em média foram geradas 22,5 e 23 milhões de leituras para cada amostra nas corridas 4 e 5, respectivamente.

Ao todo, foram realizadas 5 corridas de sequenciamento, 3 com 31 amostras e 2 apenas com os pontos iniciais de 2 e 6 h (Tabela 4.3). Combinando os dados dos 5 sequenciamentos realizados, produziu-se mais de 1,8 bilhões de leituras, o que destaca a alta produtividade dos sequenciadores de segunda geração. As corridas 1, 2 e 3 geraram ao todo

cerca de 1,29 bilhões de leituras, com uma média de aproximadamente 42 milhões de sequências para cada amostra. Por sua vez, as corridas 4 e 5, com os pontos de 2 e 6h, produziram 550 milhões de leituras com uma média aproximadamente 46 milhões de sequências para cada amostra. As 10 amostras sequenciadas em todas as corridas tiveram em média um total de mais de 82 milhões de leituras. Algumas amostras tiveram o número de leituras geradas bem acima da média como a Dm2D e Dm6D, ambas com mais de 130 milhões de *reads*. Isso pode ter ocorrido por erro na quantificação da concentração de cDNA amplificado no preparo das bibliotecas gerando a super representação dessas amostras no momento de combinar as amostras para a PCR de emulsão.

Após o sequenciamento, as leituras geradas para cada amostra de RNA foram mapeadas no genoma referência para a identificação dos genes. Neste estudo, utilizamos os organismos *Trypanosoma cruzi* e *Cercopithecus aethiops* (Macaco Verde). As leituras geradas para cada amostra foram alinhadas no genoma de *T. cruzi* usando a ferramenta Applied Biosystem Whole Transcriptome Pipeline (ab\_wtp). As leituras foram alinhadas contra os dois haplótipos da cepa usada para o sequenciamento do genoma (CL-Brener) denominadas de Esmeraldo e não-Esmeraldo. Foram levadas em conta sequências com alinhamento de 30 a 40 nucleotídeos.

No entanto, o genoma de *C. aethiops* não foi sequenciado até o momento. Diante disso, buscamos por outros primatas com o genoma disponível para análise dos transcritos. Até então, apenas o genoma de 3 espécies de primatas estão disponíveis: *Macaca mulatta*, *Nomascus leucogenys* e *Homo sapiens*. Optamos por utilizar o genoma de *H. sapiens* para a anotação das leituras das células Vero geradas, pois a anotação está muito mais completa e, provavelmente, a anotação dos 2 outros primatas foi realizada importando-se a anotação da espécie humana. Para o mapeamento das sequências no genoma humano foi necessário a utilização de uma versão mais atualizada da ferramenta de alinhamento no genoma de referência do SOLiD, o LifeScope, devido ao volume de dados deste genoma.

Após o alinhamento, a normalização dos dados foi realizada através do programa edgeR (*empirical digital gene expression analysis using R*). A tabela 4.4 mostra o resultado do alinhamento com a quantidade de *reads*, por amostra, mapeados em ambos os genomas de referência (humano e *T. cruzi*) utilizando apenas leituras mapeadas uma única vez e com mais de 90 % de probabilidade de estarem corretas. Além disso, foi calculada a porcentagem que os *reads* mapeados representaram em cada genoma.

Tabela 4. 4 Quantidade de *reads* mapeadas e a sua porcentagem em *Homo sapiens* e em *T. cruzi*.

	<i>reads</i> mapeadas em Tc	%Tc	<i>reads</i> mapeadas em Hs	%Hs
C0A	193.823	0,61%	8.766.005	27,38%
C0B	239.421	0,75%	5.913.340	18,64%
C0D	1.531.824	4,36%	8.340.130	23,75%
Dm0A	7.863.339	27,06%	364.389	1,25%
Dm0B	11.241.541	35,06%	136.509	0,43%
Dm0D	15.374.231	44,26%	317.289	0,91%
Dm2A	1.208.884	2,91%	8.615.080	20,74%
Dm2B	556.914	1,97%	3.078.716	10,90%
Dm2D	1.953.189	1,21%	13.144.725	8,13%
Dm6A	1.098.239	1,55%	14.722.609	20,82%
Dm6B	1.789.695	2,82%	5.206.767	8,21%
Dm6D	2.376.244	2,11%	14.207.202	12,62%
Dm24A	6.993.771	11,70%	10.018.924	16,76%
Dm24B	2.751.422	4,35%	11.987.968	18,93%
Dm24D	2.191.525	7,17%	6.806.057	22,27%
Dm48A	4.783.350	13,94%	6.205.971	18,08%
Dm48B	9.933.053	21,62%	5.550.397	12,08%
Dm48D	5.001.350	12,67%	6.127.313	15,52%
Y0A	13.580.308	41,23%	172.646	0,52%
Y0B	10.772.635	35,10%	132.606	0,43%
Y0D	19.560.130	43,94%	185.419	0,42%
Y2A	421.403	0,96%	10.068.178	22,97%
Y2B	208.626	0,47%	5.080.474	11,39%
Y2D	627.407	1,13%	12.246.780	21,97%
Y6A	797.178	1,19%	11.800.489	17,55%
Y6B	689.741	1,20%	10.056.981	17,49%
Y6D	813.432	1,25%	9.136.755	14,00%
Y24A	496.656	1,06%	9.901.648	21,14%
Y24B	139.936	0,43%	7.441.120	23,05%
Y48A	5.767.516	13,34%	6.806.098	15,74%
Y48B	1.550.336	3,88%	7.881.913	19,73%
Y48D	4.068.900	12,72%	5.619.842	17,57%

Legenda: Hs: genoma *Homo sapiens*; Tc: genoma *T. cruzi*. A porcentagem das amostras representa a quantidade de *reads* que mapearam em cada genoma em relação à quantidade de *reads* totais geradas.

Mesmo nas amostras controle de célula Vero (células sem infecção), houve mapeamento no genoma de *T. cruzi* entre 0,61 % e 4,36 % do total de leituras, enquanto que a taxa de mapeamento no genoma de *H. sapiens* variou entre 18,64 % e 27,38 %, com média de 23 %. Nas amostras controle de *T. cruzi*, a taxa de mapeamento em *T. cruzi* variou entre 27 % e 44 % para Dm28c (35,50 % em média) e entre 35 % e 43 % para Y (40,10 % em média). O mapeamento no genoma humano dessas amostras variou entre 0,43 % e 1,25 % para Dm28c (0,86 % em média) e 0,42 % e 0,52 % para Y. O mapeamento de amostras provenientes de um único organismo (ou *T. cruzi* ou mamífero) no genoma do outro reflete a presença de sequências conservadas entre as duas espécies.

Um valor de mapeamento de 27,4 % do total de leituras da célula Vero no genoma humano é um valor muito baixo comparado a outros trabalhos nos quais, utilizando a plataforma SOLiD, foram mapeados cerca de 50 % dos *reads* no genoma de *H. sapiens* (YANG *et al.*, 2010). Essa baixa taxa de mapeamento no nosso estudo pode ser explicado pelo fato de utilizarmos um genoma de referência de outro espécie.

Da mesma forma, não se mapeou mais que 50 % dos *reads* no genoma de *T. cruzi* para as amostras controle dos parasitas. Como o sequenciamento do *T. cruzi* foi realizado com a cepa CL Brener e há diferenças entre as cepas, pode ocorrer uma menor quantidade de *reads* mapeadas. No entanto esse valor foi inferior ao encontrado em outros trabalhos do nosso grupo. Isso pode ter sido consequência da falha no equipamento que ocorreu durante a terceira corrida do sequenciamento, como mostra a tabela 4.3, no qual a quantidade de *reads* geradas foi inferior as duas primeiras corridas e, ainda, pode demonstrar a baixa qualidade das amostras.

Com exceção da amostra Dm48B, a maior parte do mRNA das amostras de células Vero infectadas com *T. cruzi* pertencem ao hospedeiro, incluindo os pontos mais tardios da infecção (48 h), como mostra a porcentagem de *reads* que foram mapeadas (tabela 4.4). Isso era esperado uma vez que a maior parte dos mRNA pertencem a célula hospedeira, principalmente nos momentos iniciais da infecção no qual poucos parasitas ainda se encontram no interior da célula.

Em média, houve um aumento na quantidade de *reads* mapeadas no genoma do parasita ao longo da infecção com um salto no ponto de 48 horas, como pode ser visualizado na figura 4.11. Comparando-se a quantidade de *reads* mapeados no genoma de *T. cruzi* entre as células infectadas com a cepa Y e as infectadas com Dm28c, percebe-se que a quantidade de mapeamento das amostras infectadas com a cepa Y é bastante inferior. Na infecção por Dm28c o aumento (média das 3 réplicas) foi de 2 % no ponto inicial de 2 h para 16 % no tempo tardio de 48 h, enquanto para a cepa Y houve um aumento de 0,85 % em 2 h para 10 % em 48 h. Essa diferença no mapeamento entre as cepas é um reflexo natural da quantidade de parasitas no interior das células, que foi bem menor na infecção com a cepa Y, em comparação com a infecção por Dm28c.

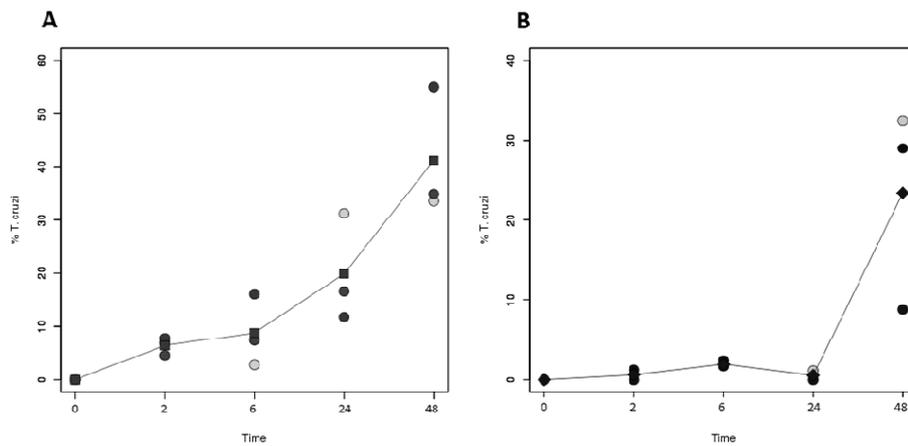


Figura 4. 11 Porcentagem de *reads* que mapearam no genoma de *T. cruzi*. Legenda: A: *reads* da cepa Dm28c; B: *reads* da cepa Y. Os círculos em preto e cinza representam as réplicas A, B e D, enquanto o quadrado representa a média localmente ponderada.

Curiosamente, o ponto de 24 horas de infecção com a cepa Y possui uma quantidade de *reads* mapeados muito pequena, a princípio não condizente com o aumento esperado de 6 h para 24 h, que é observado na infecção com a cepa Dm28c. Entretanto, como podemos observar na figura 4.6, a quantidade de parasitas no interior das células não aumenta de 6 h para 24 h.

#### 4.4 Genes Diferencialmente Expressos (DEG) na célula Vero

A análise dos genes diferencialmente expressos da célula hospedeira bem como do parasita em resposta à infecção foi realizado no pacote edgeR (ROBINSON *et al.*, 2010) do programa R, considerando diferentes níveis de confiabilidade estatística (*false discovery rate*, FDR). A quantidade de genes modulados na célula hospedeira nos diferentes pontos da cinética de infecção comparado com o controle (ponto 0) é apresentada na tabela 4.5, no qual foram avaliados diferentes níveis de confiabilidade estatística FDR (10 %, 5 % e 1 %). Além disso, foram construídos gráficos com o padrão de modulação de cada gene diferencialmente expresso na célula hospedeira durante a infecção com cada parasita (ANEXO I em CD).

Tabela 4. 5 Quantidade de genes diferencialmente expressos na célula hospedeira.

<b>Comparação</b>	<b>FDR 10 %</b>	<b>FDR 5 %</b>	<b>FDR 1 %</b>
Dm 2h – 0h	1 (0;1)	0	0
Dm 6h – 0h	19 (18;1)	15 (14;1)	10 (10;0)
Dm 24h – 0h	33 (9;24)	14 (4;10)	2 (0;2)
Dm 48h – 0h	1752 (875;877)	1014 (496;518)	356 (154;202)
Y 2h – 0h	1 (0;1)	1 (0;1)	0
Y 6h – 0h	56 (24;32)	14 (9;5)	7 (6;1)
Y 24h – 0h	7 (6;1)	7 (6;1)	3 (2;1)
Y 48h – 0h	1264 (649;615)	727 (342;385)	259 (136;123)
Dm 6h - 2h	23 (21;2)	19 (18;1)	12 (11;1)
Dm 24h - 2h	86 (22;64)	68(18;50)	12 (4;8)
Dm 48h - 2h	1045 (413;632)	615 (229;386)	250 (103;147)
Dm 24h - 6h	48 (6;42)	22 (3;19)	9 (0;9)
Dm 48h - 6h	308 (123;185)	203 (73;130)	119 (42;77)
Dm 48h - 24h	143 (80;63)	89 (54;35)	39 (30;9)
Y 6h - 2h	58 (39;19)	28 (23;5)	10 (9;1)
Y 24h - 2h	32 (30;2)	29 (28;1)	17 (16;1)
Y 48h - 2h	1005 (521,484)	621 (331;290)	275 (153;122)
Y 24h - 6h	0	0	0
Y 48h - 6h	31 (28;3)	27 (25;2)	21 (19;2)
Y 48h - 24h	213 (100;113)	125 (61;64)	58 (32;26)

Legenda: o valor total de genes é seguido por números entre parênteses (x, y) os quais representam a quantidade de genes com expressão aumentada, x, e diminuída, y, em relação ao controle.

No teste ANOVA com todos os pontos, foram modulados 1061 genes no modelo de infecção com Dm28c e 831 com Y (considerando FDR 10 %, mais de 90 % de probabilidade de estarem corretas). Comparando-se dois a dois os pontos da infecção, a tabela 4.5 mostra que a quantidade de DEG aumentou ao longo da infecção iniciando com poucos genes modulados nas primeiras horas de infecção até 24 horas variando de 1 a 33 na infecção com Dm28c e de 1 a 56 com Y. Comparando com o tempo zero, um aumento acentuado ocorreu no ponto de 48 horas, período de intensa multiplicação intracelular dos parasitas, com 1752 genes modulados na infecção com Dm28c e 1264 em Y. O ponto de 24 horas na infecção com Y apresentou uma quantidade bem inferior de genes quando comparado ao ponto de 6 horas, reflexo do baixo número de genes mapeados neste ponto da infecção.

A comparação dos DEG entre os pontos de infecção está apresentada na tabela 4.5 e revela mais genes modulados. Na infecção com parasitas Y, os pontos de 6 e 24 horas comparados entre si não apresentaram nenhum gene diferencialmente expressos. Esse dado corrobora com os dados da análise da cinética de infecção através das lamínulas, nas quais a

porcentagem de infecção e quantidade de parasitas interiorizados foi muito semelhante nestes dois pontos (figuras 4.5 e 4.6).

A fim de verificar quão semelhante ou diferente são as modulações geradas na célula hospedeira por cada uma das cepas utilizadas, comparamos os genes diferencialmente expressos de cada ponto de cada modelo *T. cruzi*/Vero entre si. As diferenças de modulação entre as infecções, com Dm28c e Y, foram muito baixas. Nos pontos 2 h e 48 h não houve seleção de nenhum gene modulado, FDR 10 %, comparando Dm28c e Y. Uma pequena diferença ocorreu em 6 e 24 horas no qual apenas 1 e 6 genes foram diferencialmente modulados, respectivamente. Para FDR 5 % e 1 % apenas 4 e 2 genes foram modulados em 24 h na cepa Y. Esse dado é surpreendente uma vez que nos resultados anteriores a cepa Dm28c apresentou maior taxa de infecção bem como maior quantidade de parasita no interior da célula em todos os pontos.

#### 4.5 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos na célula Vero

Em um trabalho em larga escala, no qual uma miríade de genes é analisada simultaneamente, a análise individual de genes torna-se uma tarefa bastante laboriosa e muitas vezes contraproducente. Em um primeiro momento, analisa-se grupos de genes com padrão de expressão semelhante para se ter uma visão global do processo. A partir disto, a análise individual dos genes pode fornecer informações mais úteis. Neste sentido, os genes são agrupados em *clusters* satisfazendo dois critérios: homogeneidade, segundo o qual os elementos dos grupos devem ter alta similaridade entre si; e separação, no qual os elementos dos diferentes grupos devem apresentar baixa semelhança uns com os outros (SHARAN, MARON-KATZ e SHAMIR, 2003). Neste trabalho, realizamos o agrupamento dos padrões de expressão usando a ferramenta SOM (*Self organizing map*).

Em uma primeira tentativa de agrupamento, na qual os critérios usados foram bastante relaxados para se tentar gerar um grande número de *clusters* e tentar individualizar todos os diferentes padrões, 1684 genes diferencialmente expressos na célula Vero foram agrupados em 77 *clusters* de acordo com o padrão de expressão. Como é possível verificar na figura 4.12, diversos grupos apresentaram um pequeno número de genes, como os *clusters* 21, 26, 55, 56, 69-77 os quais apresentam menos de 10 genes. Além disso, vários grupos apresentaram padrão de expressão muito semelhante, como mostra as linhas A e B da figura 4.13.

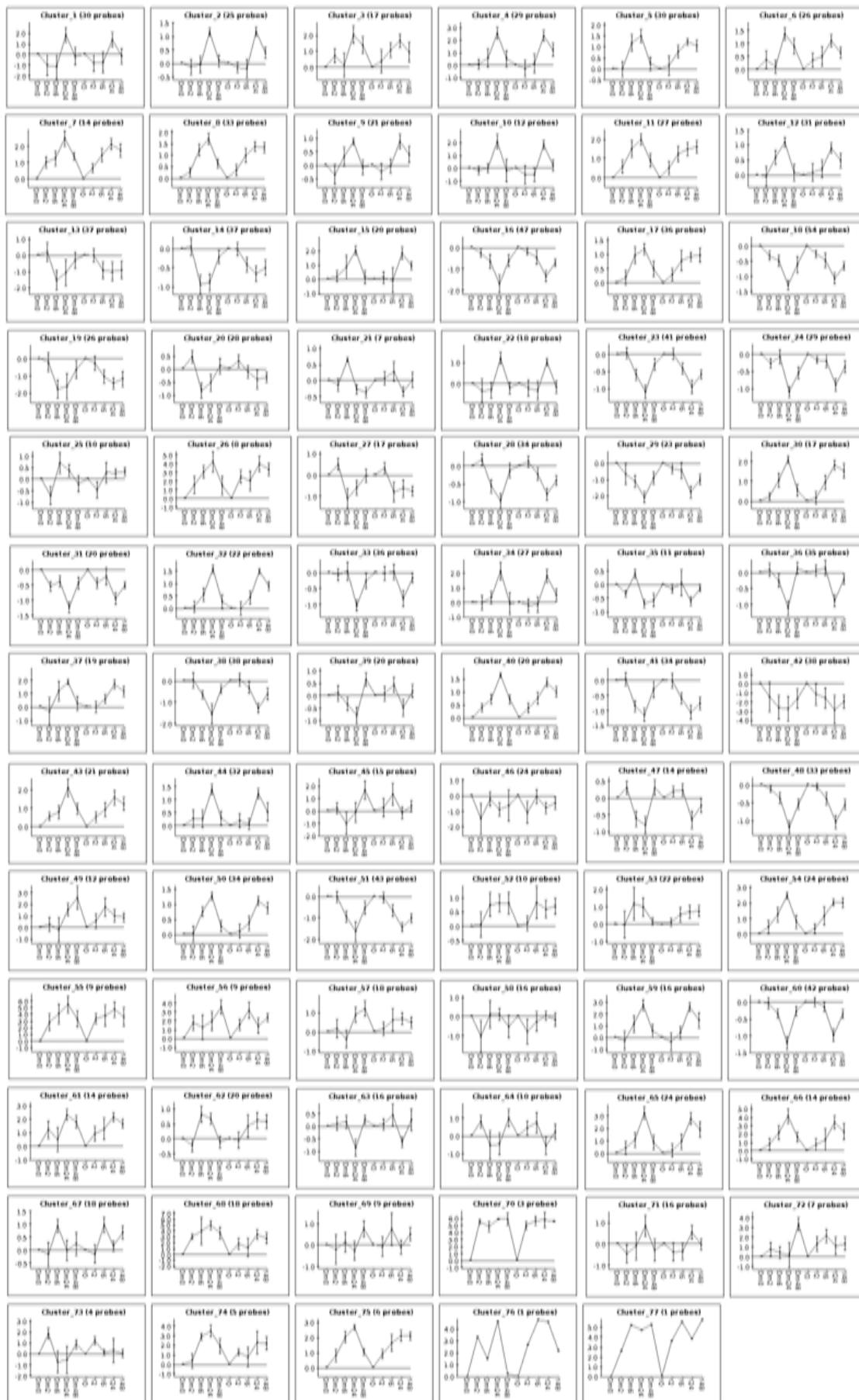


Figura 4. 12 Clusters de genes diferentemente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y. O eixo X representa os pontos de infecção e o eixo Y o nível de expressão em log<sub>2</sub>.

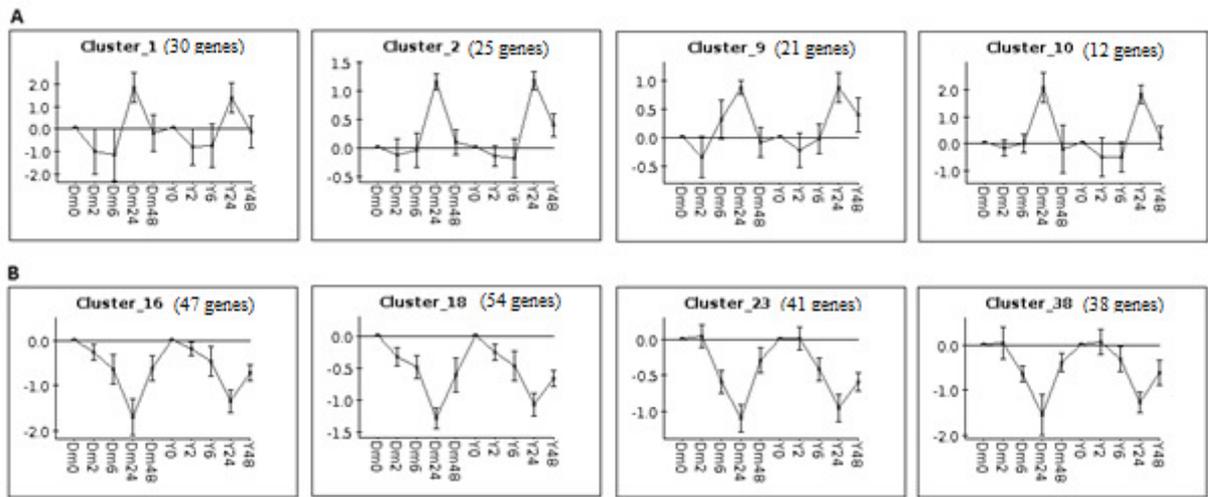


Figura 4.13 *Clusters* de genes diferencialmente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y. O eixo X representa os pontos de infecção e o eixo Y o nível de expressão em log<sub>2</sub>.

Diante disso, os genes foram novamente agrupados diminuindo a quantidade de *clusters* com a finalidade de juntar os padrões muito similares mantendo a homogeneidade entre os grupos. Os 16 *clusters* estão representados na figura 4.14.

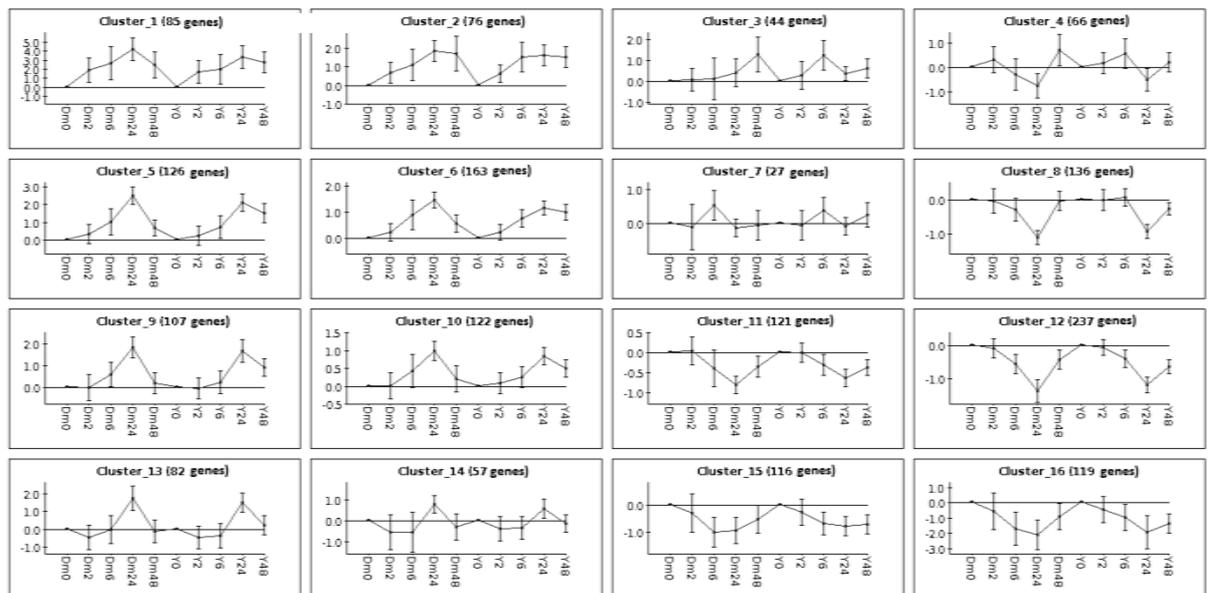


Figura 4.14 Clusterização dos genes diferencialmente expressos na célula Vero durante a infecção de parasitas Dm28c e Y. O eixo X representa os pontos de infecção e o eixo Y o nível de expressão em log<sub>2</sub>.

A média da homogeneidade dos grupos foi de 83,3 %. O *cluster* 7 apresentou o menor número de genes, 27, e a porcentagem mais baixa de homogeneidade (53,5 %). Em contra partida, no *cluster* 12 foram agrupados 237 genes com 92,6 % de homogeneidade. De maneira geral, as infecções com as cepas Dm28c e Y causaram padrões de modulação muito semelhantes na célula hospedeira, mesmo as infecções diferindo entre a quantidade de

parasitas por ponto. Por exemplo, no *cluster* 1, ambas as infecções têm modulação positiva dos genes iniciando 2 horas após a infecção e atinge um pico em 24 h, sendo que após esse período há uma queda na modulação.

Apenas 2 grupos apresentaram diferenças no padrão de expressão entre as cepas. No *cluster* 3 a modulação gênica aumentou ao longo de infecção atingindo o ponto máximo em 48 horas para Dm28c. Por outro lado, a modulação dos genes na infecção com Y oscilou ao longo da cinética, iniciando com um aumento gradual até 6 h, depois diminuindo a expressão em 24 h e voltando a subir em 48 h. No *cluster* 4, a infecção com Dm28c aumentou a modulação dos genes 2 h após a infecção, em seguida, ocorreu uma modulação negativa após 24 h e um aumento acentuado foi verificado em 48 h. Para a cepa Y, há uma modulação positiva dos genes 6 h após a infecção, passando para uma acentuada diminuição em 24 h, seguida por um aumento após 48 h.

Com o intuito de identificar mecanismos celulares alterados durante o processo de infecção pelo *T. cruzi*, foram utilizadas análises de enriquecimento das categorias de Ontologia Gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos de cada *cluster*. O Consórcio de Ontologia Gênica (ASHBURNER *et al.*, 2000) foi criado com o objetivo de produzir um vocabulário dinâmico, controlado e padronizado para descrever as funções dos genes e seus produtos em uma ampla variedade de organismos. A classificação de GO é estruturada em três níveis de ontologia que descrevem: componente celular, processo biológico e função molecular.

A análise global de enriquecimento funcional revelou que os processos celulares modulados com maior quantidade de genes envolvidos foram relacionados com regulação negativa de processos biológicos, resposta a estímulos, processos metabólicos, ciclo celular, resposta imune e citoesqueleto. A análise GO também foi realizada nos genes agrupados por padrões de similaridade de expressão, os quais serão detalhados a seguir.

#### 4.5.1 *Cluster* 1

A modulação no *cluster* 1 (figura 4.15), no qual foram agrupados 85 genes, é altamente acentuada ao longo de toda a cinética de infecção. Neste *cluster* encontra-se genes relacionados com a resposta imune como quimiocinas (CXCL1 e CXCL10), interleucina IL1A e o receptor de interleucinas IL21R, TNF e TNIP3. Além disso, encontra-se um gene da família Bcl-2, envolvida na apoptose. Não houve nenhum enriquecimento funcional neste grupo.

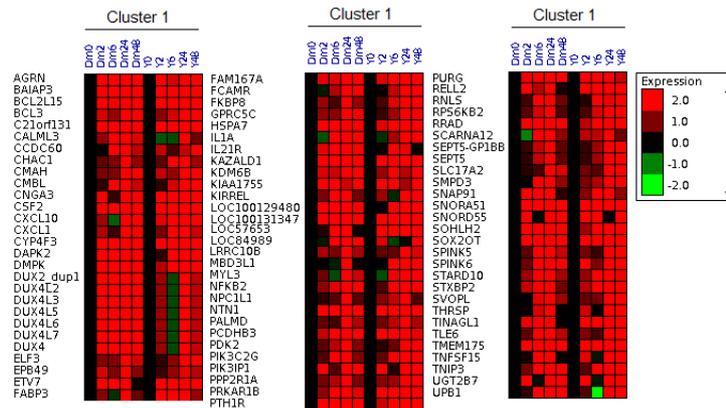


Figura 4.15 Gráfico da expressão gênica do *cluster 1*. Legenda: Cada linha representa um gene agrupado no *cluster* e as colunas representam os pontos analisados de cada infecção, Dm28c e Y. Os níveis de expressão estão representados no quadro a direita no qual a intensidade de cor representa em vermelhos os genes com expressão aumentada e em verde os genes reprimidos em relação ao ponto 0 (preto).

#### 4.5.2 Cluster 2

O *cluster 2* (figura 4.16) possui 76 genes com modulação positiva 2 horas após a infecção. A expressão se tornou mais acentuada após 24 e 48 horas para a maioria dos genes deste grupo. Neste *cluster* foram identificados quimiocinas (CCL2, CCL20, CXCL6) e IL6R, IL8. Esse grupo não apresentou enriquecimento funcional.

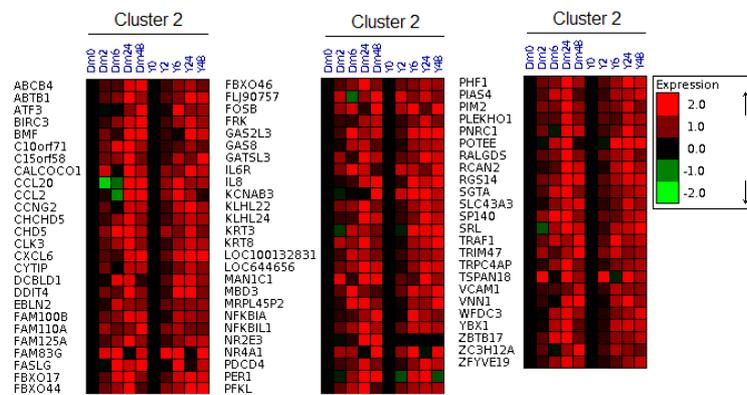


Figura 4. 16 Gráfico da expressão gênica do *cluster 2*. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.3 Cluster 3

No *cluster 3* foram agrupados 44 genes os quais apresentaram enriquecimento gênico para estímulo externo e regulação do metabolismo do RNA. O perfil de modulação gênica entre as cepas foi diferente. Para Dm28c, a modulação gênica aumenta ao longo de infecção atingindo o ponto máximo em 48 horas. Enquanto para a cepa Y, o aumento da expressão gênica parece ser mais acentuado 6 horas após a infecção (figura 4.17).

Neste *cluster* foram identificados genes relacionados com a resposta imune como quimiocinas (CCL7, CXCL2 e CXCL3), interleucina (IL11) e fatores de regulação (IRF1). O *cluster* também apresentou genes reguladores da transcrição como NR4A2 e NR1H4 e reguladores do ciclo celular como CDC25C, CDCA2 e CDKN2C. Ainda, genes relacionados com apoptose foram modulados positivamente como BBC3, membro da família Bcl-2.

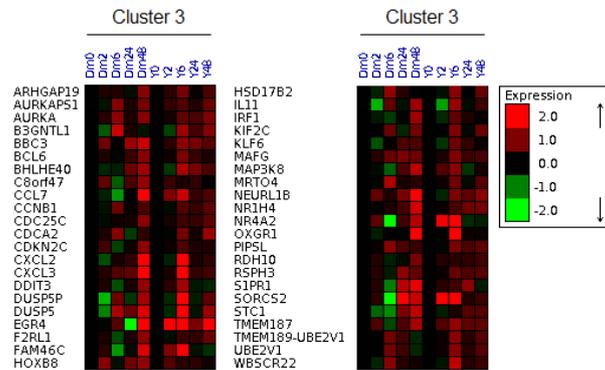


Figura 4.17 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 3. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.4 Cluster 4

A figura 4.18 representa o *cluster* 4 que contém 66 genes os quais apresentaram uma oscilação no perfil de modulação ao longo da infecção. A infecção com Dm28c aumenta a modulação dos genes no ponto de 2 h, em seguida, ocorre uma modulação negativa até 24 h e um aumento acentuado é verificado em 48 h. Para a cepa Y, há uma expressão reprimida dos genes em 24 h.

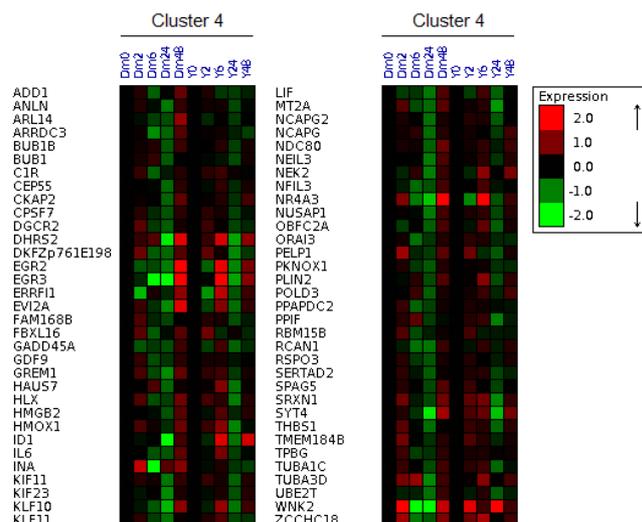


Figura 4.18 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 4. Legenda: ver figura 4.15.

O *cluster* 4 apresentou enriquecimento gênico para diversas funções relacionadas com divisão celular, organização do fuso mitótico, segregação dos cromossomos e organização do citoesqueleto. Alguns genes regulam o processo de divisão celular através de diferentes mecanismos celulares. Por exemplo, o produto do gene GADD45 atua na regulação negativa da divisão em situação de estresse ou de dano ao DNA. Por outro lado, o produto do gene GDF9 regula a divisão positivamente ao estimular algumas ciclinas as quais promovem a passagem para a fase S e G2/M. Além disso, dois genes envolvidos no ponto de checagem da mitose foram identificados, BUB1 e BUB1B, os quais pertencem à família serina/treonina quinase.

Outros genes atuam no centrossomo, na formação de fuso mitótico e na movimentação dos cromossomos como HUAS7, KIF11, KIF23, NCAP, NCAPG2, NDC 80, NUSAP1 e SPAG5. Outros genes foram relacionados com crescimento e diferenciação celular como EGR2, EGR3, ERFFI1, ID1, KLF10 e RCAN1. Os genes relacionados com citoesqueleto foram  $\alpha$ -aducina, anilina, ARL4, INA (filamento intermediário) e tubulinas (TUBA1C e TUBA3D).

#### 4.5.5 *Cluster* 5

O *cluster* 5 (figura 4.19) apresentou 126 genes, cuja modulação aumentou com o desenvolvimento da infecção, atingindo um pico em 24 horas. Neste *cluster*, foram identificados dois genes que codificam fatores reguladores de interferon (IRF3 e 9) além de TGF- $\beta$ . Neste grupo também ocorreu um receptor Toll-like (TLR5) que possui uma função importante no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune. Esse grupo não apresentou enriquecimento funcional.

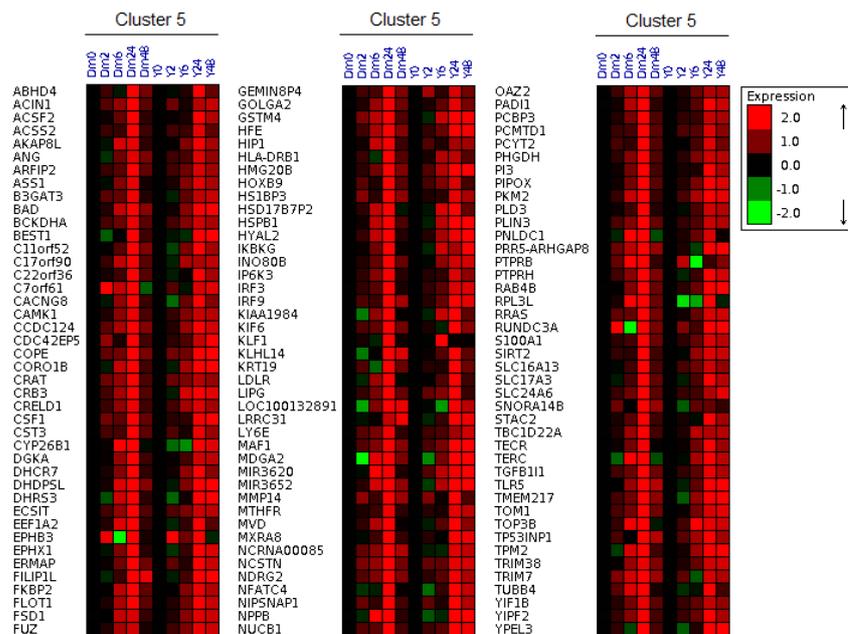


Figura 4.19 Gráfico da expressão gênica do *cluster 5*. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.6 Cluster 6

O *cluster 6* foi composto por 163 genes, cuja expressão aumentou desde 6 h após a infecção (figura 4.20). Para a cepa Dm28c, a maioria dos genes apresentou maior aumento da expressão no ponto de 24 h. Neste agrupamento houve enriquecimento de genes associados a processos metabólicos, atividade oxidoreductase e resposta ao estresse. Diversas enzimas envolvidas em diferentes processos metabólicos foram identificadas neste agrupamento. Por exemplo, no metabolismo de ácido graxo, três genes codificadores das enzimas acil-CoA desidrogenase (ACAD) que atuam na beta-oxidação encontram-se neste grupo. No metabolismo de carboidratos, as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a fosfofrutoquinase foram identificadas. Ainda, outros genes codificadores de enzimas envolvidas na cadeia respiratória, no metabolismo de aminoácidos e esteróides estão presentes neste agrupamento.

Neste *cluster* observou-se a presença de diferentes genes que codificam para proteínas envolvidas na sinalização dependente de cálcio como a calmodulina (CALM3), calcineurina (CALR) e calpaína (CAPNS1). Além de proteínas envolvidas na organização da actina e mobilidade intracelular como a Rho (RHOD), profilina (PFN1) e sinaptopodina (SYNPO). Genes envolvidos na resposta imune relacionados à citocina TNF foram identificados, além do gene que codifica para a quimiocina CXCL5.

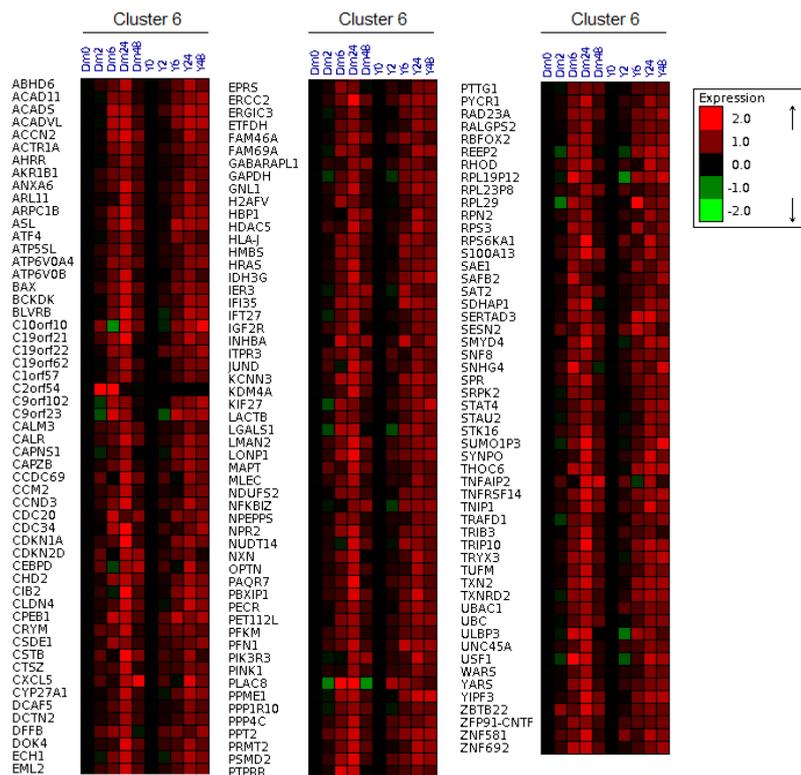


Figura 4.20 Gráfico da expressão gênica do *cluster 6*. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.7 Cluster 7

O *cluster 7* possui somente 27 genes (figura 4.21) dentre os quais não houve nenhum processo celular enriquecido na análise de enriquecimento de GO. Esses genes apresentaram expressão aumentada 6 h após a infecção (melhor visualização na figura 4.14). Neste agrupamento, o gene DAP3 está relacionado com apoptose e o KIN com resposta ao dano no DNA. O gene para a RNA polimerase II (POLR2F) aparece com modulação positiva apenas no ponto 6 horas para a cepa Dm28c.

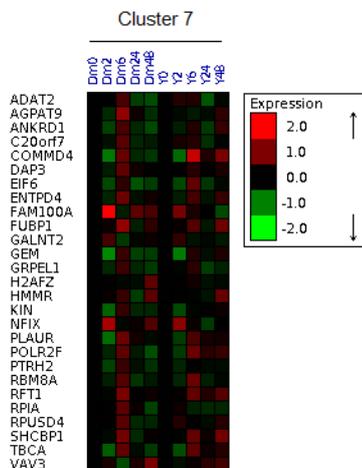


Figura 4. 21 Gráfico da expressão gênica do *cluster 7*. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.8 Cluster 8

A figura 4.22 representa graficamente o *cluster* 8 o qual contém 136 genes acentuadamente reprimidos no ponto de 24 horas. Tal grupo apresentou enriquecimento gênico para a regulação do ciclo celular, replicação e metabolismo do DNA e organização dos cromossomos. Diversos genes codificadores de ciclinas e quinases dependente de ciclina (CDK), as quais possuem importante papel na regulação do ciclo celular, foram agrupadas neste *cluster* como os genes CDC45, CDC6 e CDK1.

Também foram detectados genes ligados ao centrômero, histonas e genes reguladores da segregação dos cromossomos. Além disso, os genes DUT, EXO1, HELLS, MCM, DNA polimerase (POLE3) e ribonucleotídeo redutase (RRM1), estão envolvidos no processo de replicação do DNA.

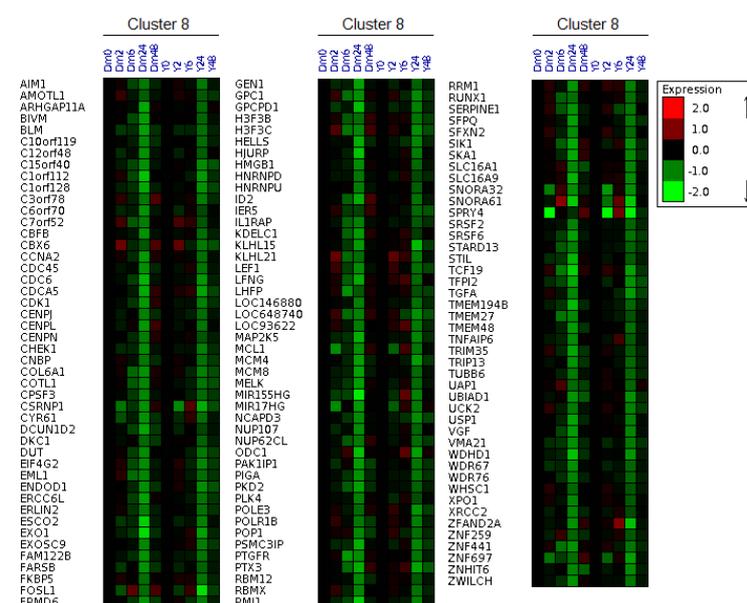


Figura 4. 22 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 8. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.9 Cluster 9

No *cluster* 9 (figura 4.23) foram agrupados 107 genes com uma acentuada expressão no ponto de 24 horas. Para a cepa Y, essa expressão positiva se manteve no ponto 48 horas. Na análise de enriquecimento de GO foram encontrados os processos de metabolismo de lipídeos e esteróides. Neste contexto, foram identificadas genes de enzimas com atividade acil-CoA sintetase envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, enzimas da família citocromo P450 envolvidas na síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos. Além disso, outros genes codificadores de proteínas com função de regulação do colesterol (INSIG1 e STARD4) ocorreram neste *cluster*.

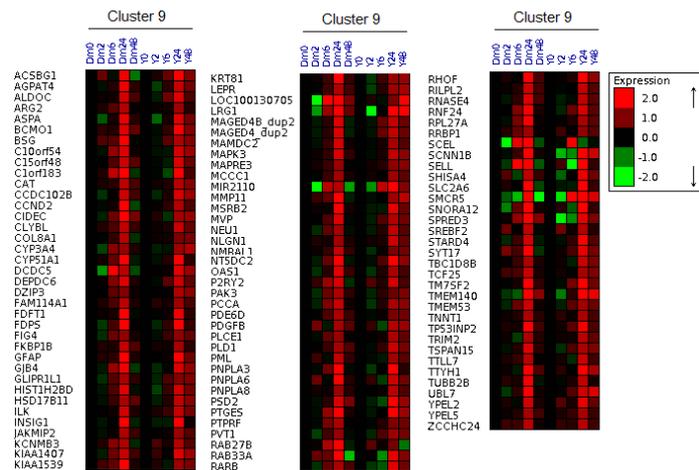


Figura 4.23 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 9. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.10 Cluster 10

O *cluster* 10 apresentou 122 genes com modulação positiva 6 h após a infecção, com acentuada expressão em 24 h, para ambas as cepas do parasita (figura 4.24). Na análise de enriquecimento de GO, foram encontrados genes envolvidos com a mitocôndria, especialmente em diferentes processos metabólicos. Por exemplo, a enzima aconitase (ACO2) atua no ciclo de Krebs enquanto as enzimas acil-CoA sintetase e enoil CoA hidratase, atuam no metabolismo de ácido graxo. Também foram encontrados genes de enzimas com função na cadeia respiratória, como por exemplo, citocromo c oxidase e NDUFB6, uma subunidade do complexo NADH:ubiquinona oxidoreductase. Além dos genes ACAT1, CPT2, HMGCL, LDHC e SUCLG1 que codificam proteínas mitocondriais.

Ainda, neste cluster encontram-se genes relacionados com a resposta imune, como o fator B do sistema complemento (CFB), STAT3, TNFSF4 e IFI30.

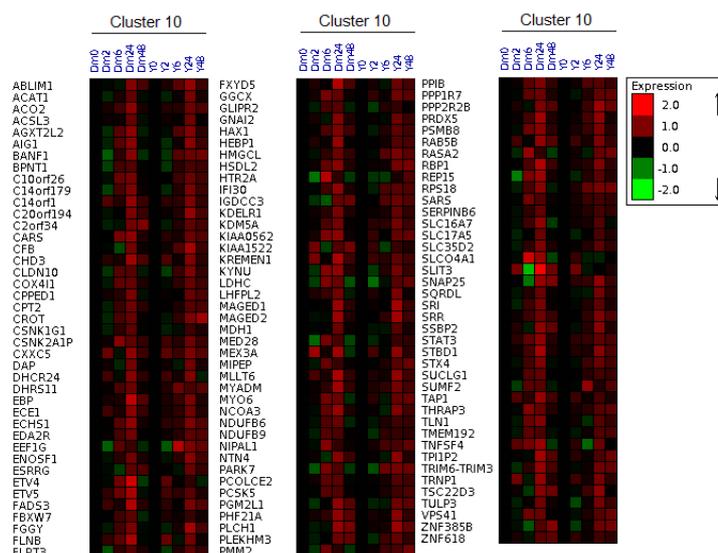


Figura 4.24 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 10. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.11 Cluster 11

Os 121 genes pertencentes ao *cluster* 11 apresentaram modulação negativa 6 h após a infecção (figura 4.25). Neste agrupamento, houve enriquecimento gênico para os processos envolvidos no núcleo da célula. Dentre esses genes destacam-se: ARL4C, membro da família ADP-ribosilação; FMR1, envolvido no transporte do mRNA para o citoplasma; a histona HIRA; ORC5, subunidade do complexo inicial de replicação do DNA; PMS1, envolvido no reparo do DNA e TOPBP1, uma topoisomerase.

O gene ENC1 codifica uma proteína de ligação à actina que desempenha um papel importante em resposta ao estresse oxidativo. A proteína codificada pelo gene PPM1D é membro da família PP2C, conhecida como regulador negativo de resposta ao estresse celular. Além disso, foram identificados neste grupo genes envolvidos na resposta imune como o gene TGFβ e TNF.

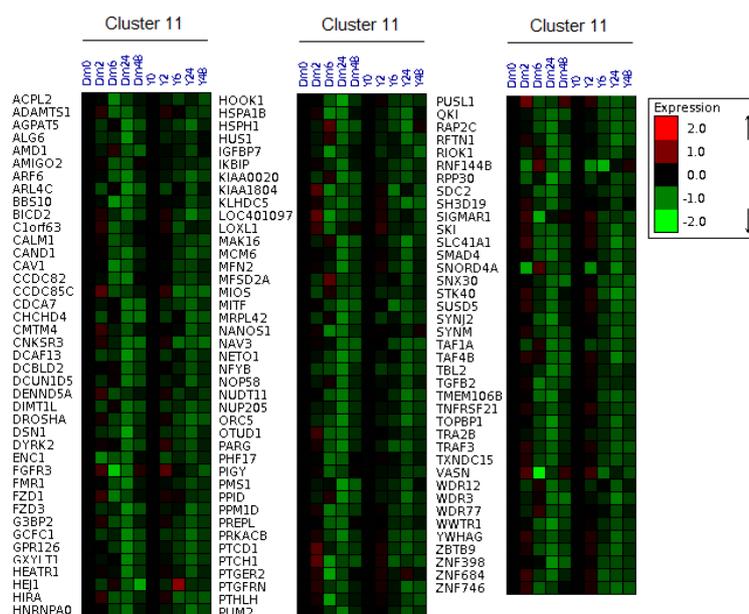


Figura 4.25 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 11. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.12 Cluster 12

O *cluster* 12 agrupou o maior número de genes, 237, os quais foram reprimidos desde o início da infecção, com acentuação da expressão negativa 24 h após a infecção (figura 4.26). Este agrupamento apresentou diversas funções enriquecidas pela análise de ontologia gênica relacionados com o ciclo celular como mitose, regulação do ciclo celular, replicação e metabolismo do DNA, cromossomos e região centromérica e resposta ao dano no DNA.



pele catabolismo do ácido gama-aminobutírico, o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central.

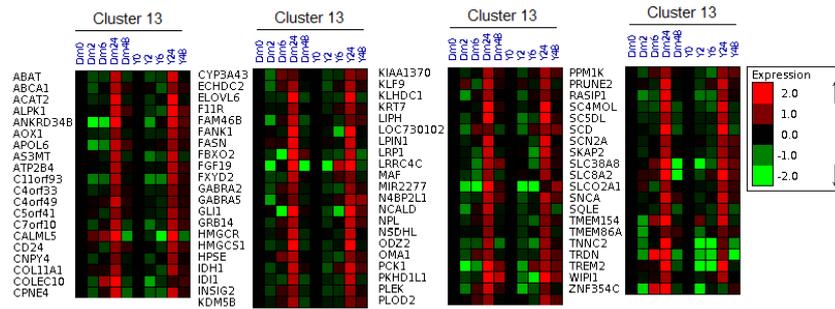


Figura 4.27 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 13. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.14 Cluster 14

No *cluster* 14 (figura 4.28) foram agrupados 57 genes os quais apresentaram, de maneira geral, expressão negativa ao longo da infecção com modulação positiva 24 horas após a infecção. Na análise de enriquecimento GO alguns processos celulares foram identificados como, por exemplo, resposta a estímulo extracelular, resposta a drogas e resposta ao cálcio.

O gene *DUSP1* codifica uma proteína fosfatase que possui importante papel na resposta ao estresse bem como na regulação negativa a proliferação celular. Igualmente, os genes *CCND1*, *FOS* e *SOCS3*, sinalizador de supressão de citocinas, atuam na resposta a estímulos externos e a drogas. Dentre os genes envolvidos na resposta ao cálcio encontra-se o *STC2*, que codifica para a proteína staniocalcina cuja função está relacionada com a regulação da homeostase de cálcio. Neste *cluster* também foram identificados genes envolvidos com a matriz extracelular como fibronectina e metalopeptidase de matriz que possui função na adesão celular e em processos migratórios.

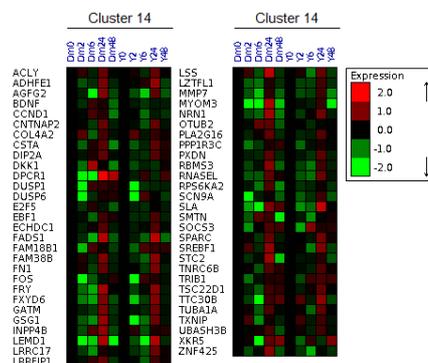


Figura 4.28 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 14. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.15 Cluster 15

O *cluster* 15 apresentou 116 genes com expressão reprimida ao longo de toda a cinética de infecção (figura 4.29). Esse agrupamento apresentou enriquecimento gênico para as funções de desenvolvimento do epitélio, desenvolvimento do sistema circulatório e regulação da proliferação celular. O gene KRT10 codifica uma citoqueratina que compõe os filamentos intermediários em células epiteliais. Juntamente com JUN, FRS2 e outros genes, possuem função no desenvolvimento do epitélio.

O gene ITGB8 codifica a integrina, proteína de membrana que intercepta a interação com outras células e com a matriz extracelular, que possui um papel importante na proliferação de células epiteliais. Outras proteínas deste grupo estão envolvidas neste processo celular como a caveolina, neurofilina e o fator de crescimento vascular.

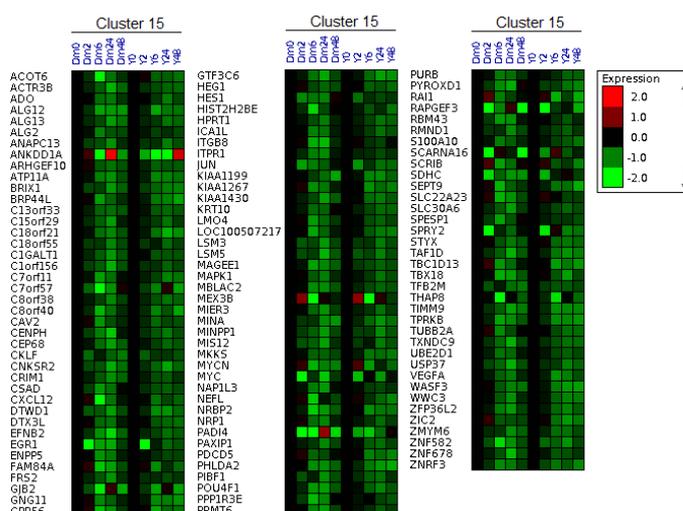


Figura 4.29 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 15. Legenda: ver figura 4.15.

#### 4.5.16 Cluster 16

Com 119 genes reprimidos ao longo da infecção, o *cluster* 16 apresentou enriquecimento gênico para regulação negativa de processos biológicos e resposta a estímulos e regulação de processos multicelular do organismo (figura 4.30).

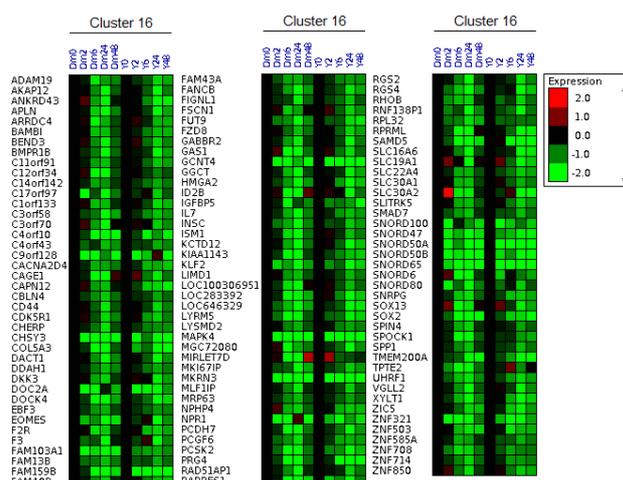


Figura 4.30 Gráfico da expressão gênica do *cluster* 16. Legenda: ver figura 4.15.

O produto do gene *GAS1* possui papel na supressão do crescimento através do bloqueio do ciclo celular na fase S. Outros genes foram identificados com função negativa para diferentes processos biológicos como *SOX1*, *DKK3*, gene supressor, e *RGS*, regulador da sinalização da proteína G. Dentre os genes envolvidos nos processos multicelulares, estão diferentes proteínas receptoras de membrana que atuam em diferentes sinalizações como, por exemplo, *BAMBI*, *CD44* e *F2R*. Além disso, foram identificadas proteínas relacionadas à resposta imune, como a interleucina 7 e o fator Kruppel-like, que regula o tráfego de células T.

#### 4.6 Análises de vias de enriquecimento

A partir dos genes diferencialmente expressos 24 h após a infecção, as análises de vias enriquecidas da célula Vero, em resposta à infecção pelo *T. cruzi*, foram realizadas por busca contra os bancos de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (OGATA *et al.*, 1999). Uma visão geral das vias metabólicas do KEGG moduladas na célula hospedeira mostrou diferentes vias do metabolismo energético, como  $\beta$ -oxidação de ácido graxos, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos.

Diferentes vias de sinalização relacionadas com a resposta imune foram moduladas na infecção da célula Vero pelo *T. cruzi*. Como, por exemplo, a via TGF- $\beta$ , envolvida em diferentes funções na célula como crescimento, diferenciação e apoptose (figura 4.31). A via TNF (figura 4.32) induz uma cascata de mediadores inflamatórios e possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose (TRACEY *et al.*; 2008).

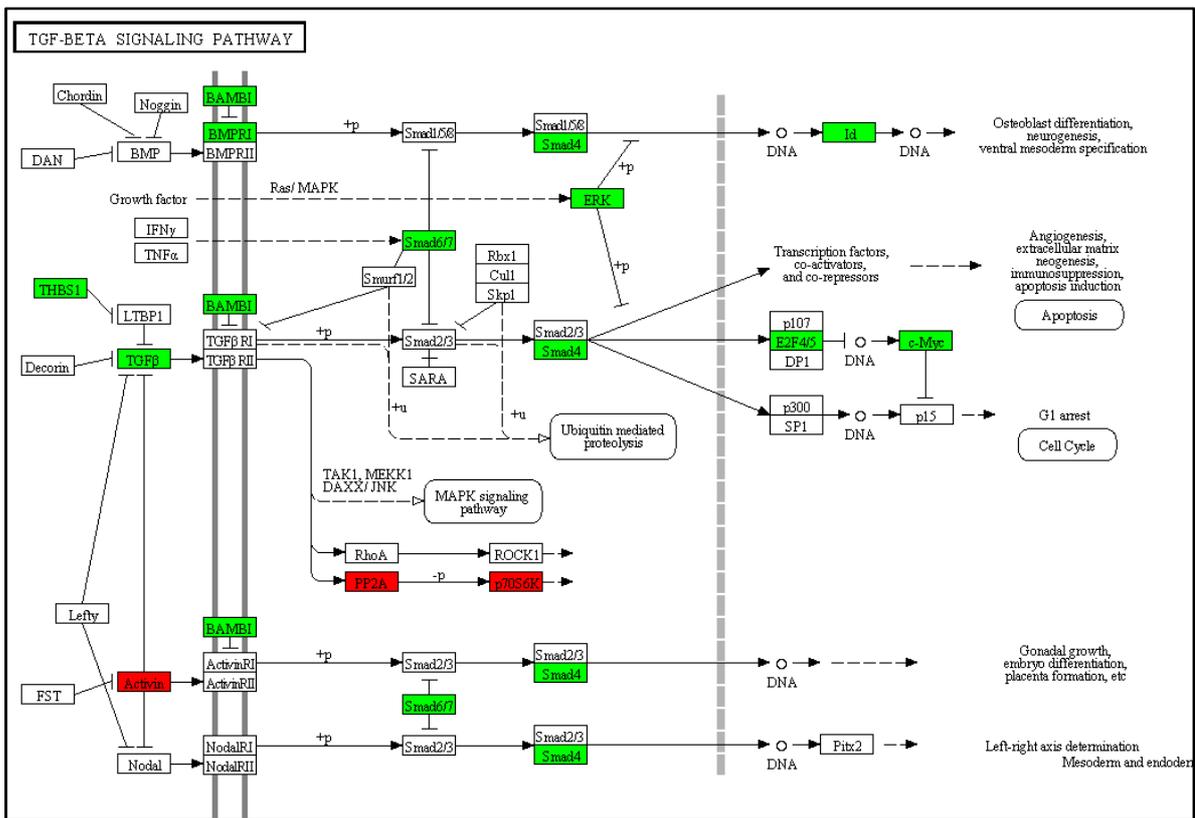


Figura 4. 31 Via de sinalização TGF-β enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo *T. cruzi*. Cada retângulo representa uma enzima que catalisa o passo especificado na imagem. Os retângulos em vermelhos representam os genes modulados positivamente enquanto os retângulos em verde representam os genes reprimidos.

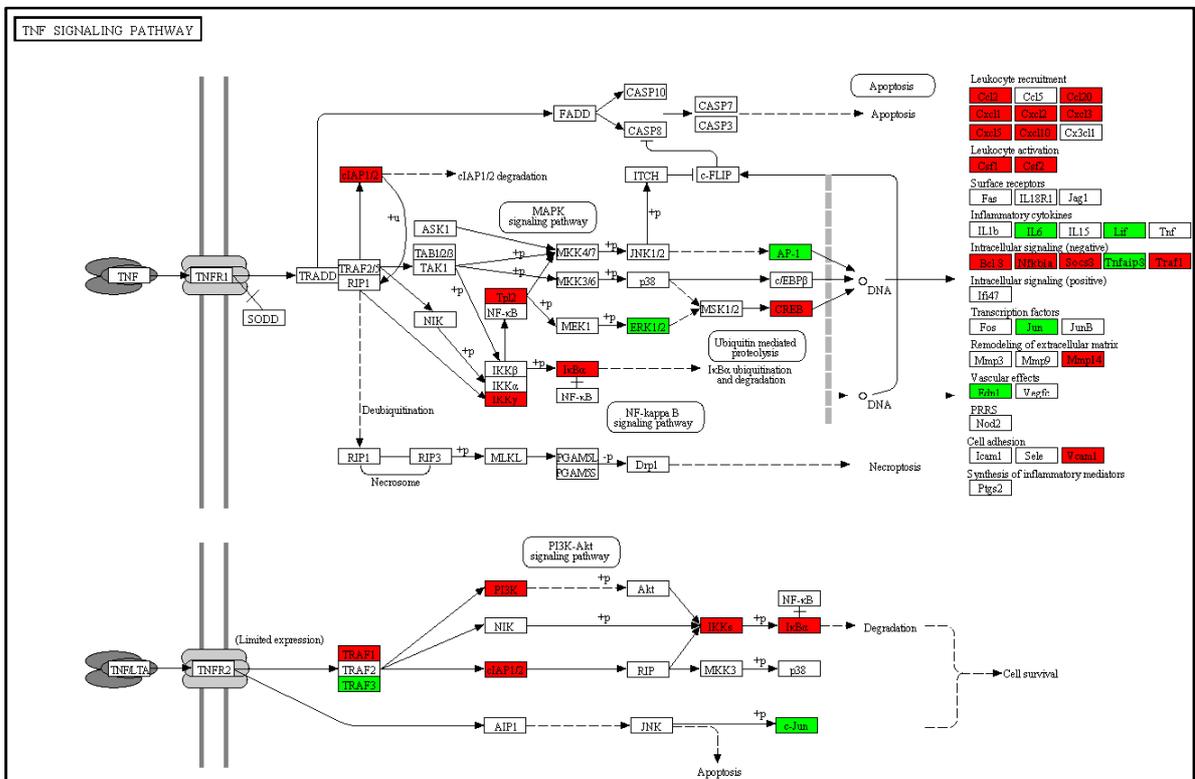


Figura 4. 32 Via de sinalização TNF enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo *T. cruzi*. Legenda: ver figura 4.31.

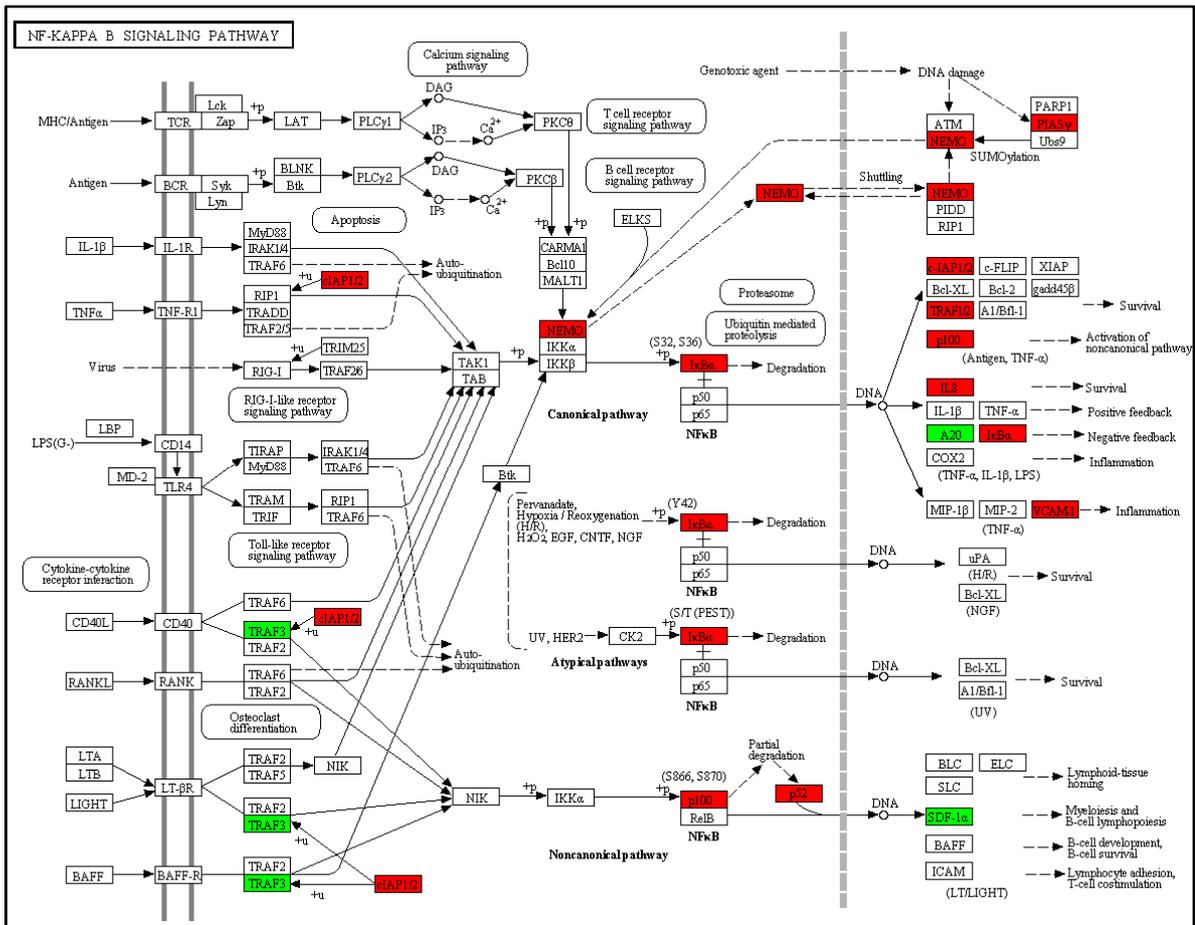


Figura 4. 33 Via de sinalização NF-KappaB enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo *T. cruzi*. Legenda: ver figura 4.31.

A via NF-kb (figura 4.33) está envolvida na regulação da expressão de genes do processo inflamatório e na defesa contra parasitas. Além disso, também atua na sobrevivência e proliferação celular e apoptose (XIAO, 2004).

As vias de sinalização das enzimas fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e Akt (serina/treonina quinase) apresentaram diversos genes modulados na célula Vero (figura 4.34). Essas enzimas são caracterizadas como importantes reguladores do processo de invasão do *T. cruzi* através da participação na reorganização dos filamentos de actina, na célula hospedeira, durante o processo de invasão celular e por desencadear uma cascata de sinalização anti-apoptose em certos tipos celulares (TODOROV *et al.*, 2000, WILKOWSKY, *et al.*, 2001, MOTT e BURLEIGH, 2008).

As MAP quinase (MAPK) estão envolvidas na regulação de diferentes processos celulares. Além disso, a infecção do *T. cruzi* foi capaz de induzir a via de sinalização MAPK que parece ser importante para o estabelecimento da infecção (DAMASCENO, 2007), como no nosso estudo (figura 4.35) no qual essa via de sinalização apresentou diversos genes modulados na célula Vero.

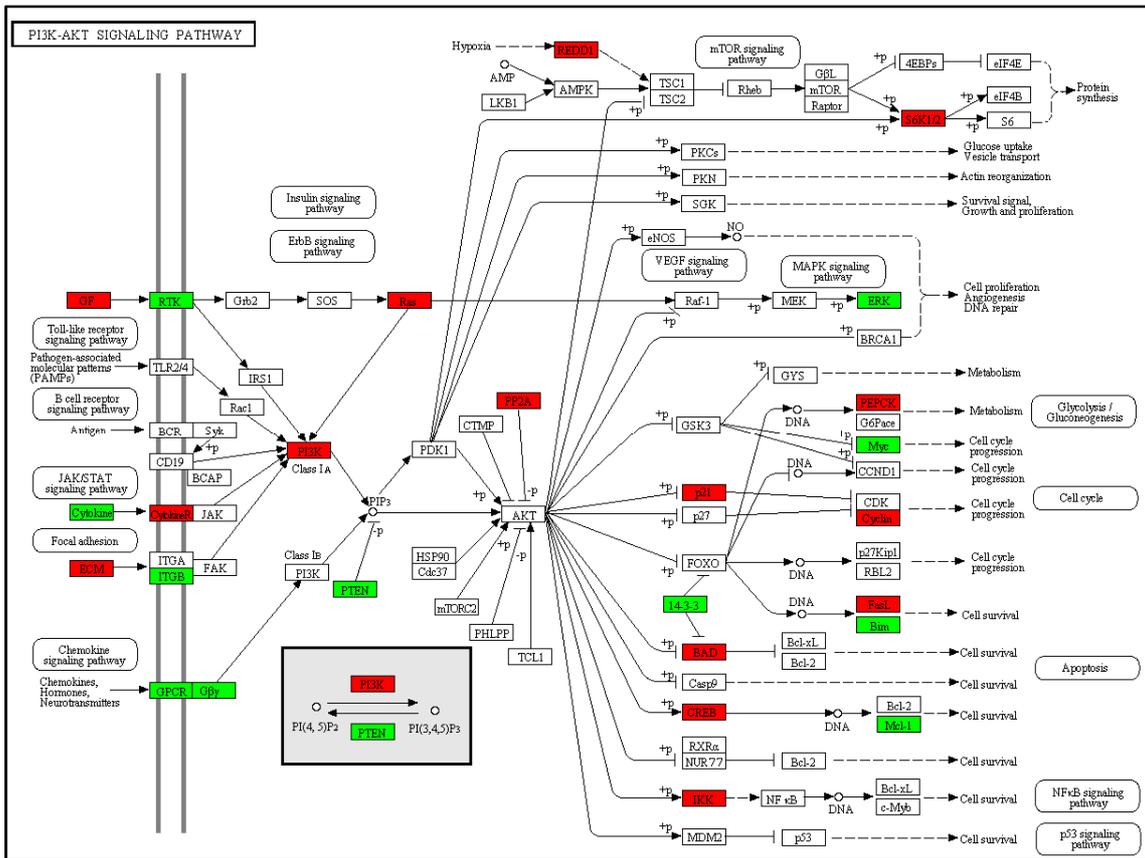


Figura 4. 34 Via de sinalização PI3K-Akt enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo *T. cruzi*. Legenda: ver figura 4.31.

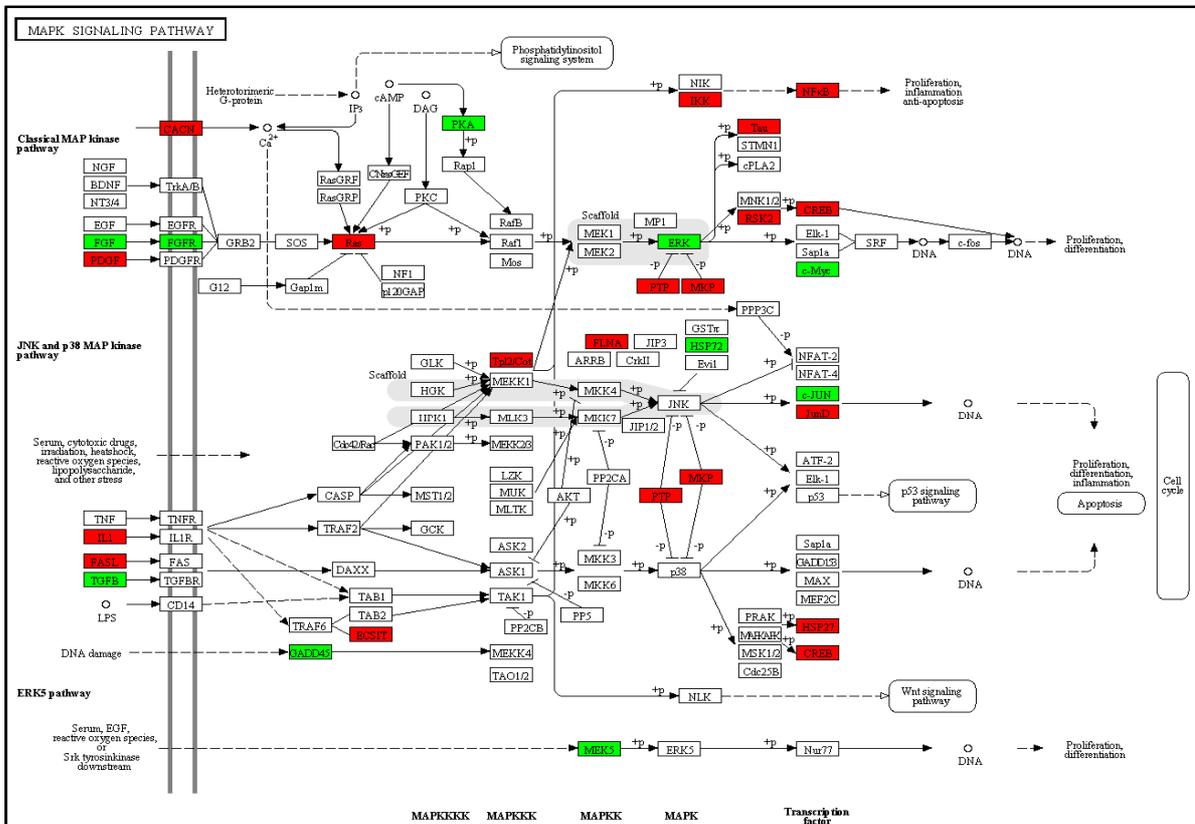


Figura 4. 35 Via de sinalização MAPK enriquecida com genes modulados na célula Vero durante a infecção pelo *T. cruzi*. Legenda: ver figura 4.31.

Outras vias de sinalização do KEGG foram enriquecidas da célula Vero, em resposta à infecção pelo *T. cruzi*, como ciclo celular, sinalização de cálcio, apoptose, endocitose, regulação do citoesqueleto e outras presentes no ANEXO II.

#### 4.6 Genes Diferencialmente Expressos (DEG) em *Trypanosoma cruzi*

Diversos trabalhos descreveram, de maneira global, a modulação gênica na célula hospedeira causada pelo processo de infecção do *T. cruzi*. Esses estudos foram conduzidos com a tecnologia de microarranjo, que possibilita avaliar as alterações através da análise dos níveis de expressão de milhares de genes ao mesmo instante. No entanto, essa metodologia apresenta pouca sensibilidade para identificar RNAs pouco expressos, como os de um patógeno durante o processo infeccioso. Desse modo, os trabalhos que avaliaram a modulação gênica durante o processo de infecção com *T. cruzi* foram focados no organismo hospedeiro.

Através da tecnologia de RNA-Seq, que permitiu o sequenciamento e a quantificação dos transcritos com grande resolução e alta sensibilidade, esse trabalho foi pioneiro ao identificar a modulação gênica do parasita *Trypanosoma cruzi* durante o processo de infecção. O número de genes diferencialmente expressos identificados em *T. cruzi*, Dm28c e Y, durante o processo de infecção estão apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4. 6 Genes diferencialmente expressos em *T. cruzi* durante a infecção na célula Vero

Cepa	FDR 10%	FDR 5%	FDR 1%
Dm28c	2372	1866	1270
Y	1233	877	545

Legenda: FDR: taxa de descoberta falsa.

Um grande número de genes foi modulado em cada cepa durante a infecção, ao todo 2372 genes foram identificados em Dm28c e 1233 em Y (FDR 10%). A cepa Dm28c apresentou aproximadamente o dobro de genes modulados do que a cepa Y. Isso pode ser explicado pela baixa porcentagem de *reads* da cepa Y mapeada no genoma do parasita (figura 4.11) que reflete a baixa taxa de infecção e quantidade de parasitas interiorizados.

Dentre os genes de expressão modulada nos parasitas, cerca de 46% encontra-se anotado como codificadores de proteínas hipotéticas. A denominação “proteína hipotética” é utilizada para genes de função desconhecida e podem ser divididas em hipotéticas conservadas, as quais apresentam ortólogos em outros organismos, ou somente hipotéticas

que, a princípio, seriam restritas a *T. cruzi*. Do total de proteínas hipotéticas identificadas, 87% foram anotadas como conservada.

Outro conjunto bastante representativo de genes modulados apresentou função relacionada com adesão celular, importante processo para o estabelecimento da infecção. Esse conjunto representou 20% dos genes identificados como diferencialmente expressos. Envolvidas no processo de adesão, foram detectados os genes para as proteínas mucinas, trans-sialidasas, glicoproteínas gp63 e principalmente proteínas de superfície associadas à mucina (MASP). Além disso, identificamos oito genes pertencentes a uma família de proteínas de superfície descrita recentemente. A família TASV (Tripomastigota, proteínas ricas em Alanina, Serina e Valina) (GARCIA *et al.*, 2010) é específica de *T. cruzi* e é expressa na forma tripomastigota.

Os genes que apresentaram diferença de expressão em pelo menos uma das cepas, considerando FDR 5%, foram agrupados em 16 *clusters* (figura 4.36) de acordo com o padrão de expressão. É possível distinguir alguns padrões de modulação nos agrupamentos, como mostra a figura 4.36. Os *clusters* 1 e 5 exemplificam a modulação positiva de genes diferencialmente expressos nas duas cepas ao longo da infecção, em contraste, os *clusters* 11 e 12 mostram a expressão diminuída dos genes modulados em ambas as cepas. Esses exemplos mostram que as cepas apresentaram perfil de expressão semelhante para os genes agrupados nesses *clusters*. Por outro lado, as cepas apresentaram alguns padrões de modulação bem diferente entre si como mostra os grupos 3 e 6. Ainda é possível verificar que alguns genes foram modulados para uma das cepas e para outra não, por exemplo, no cluster 2 sugere que os genes são modulados apenas na cepa Y enquanto o cluster 7 mostra o contrário, os genes deste grupo parecem ser modulados apenas para a cepa Dm28c.

A partir dos genes diferencialmente expressos foram construídos gráficos de modulação para cada gene comparando a modulação entre as cepas (em ANEXO III). Alguns exemplos desses gráficos de modulação estão representados nas figuras 4.37, 4.38, 4.40 e 4.41.

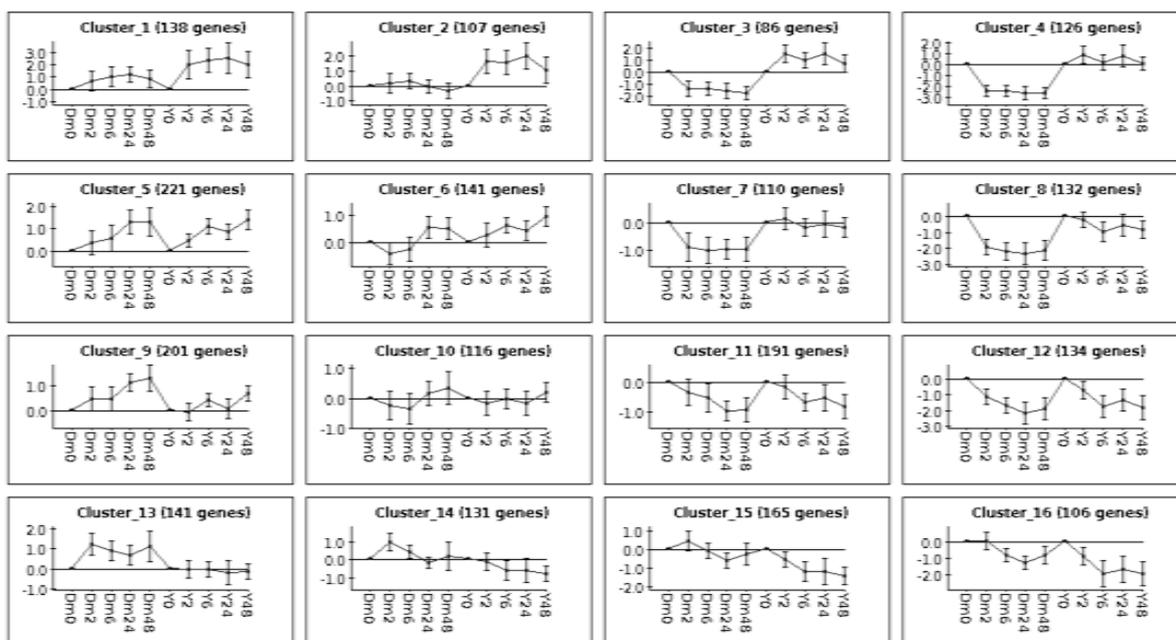


Figura 4. 36 Clusters de genes diferencialmente expressos no *T. cruzi* cepa Dm28c e Y durante a infecção de parasitas Dm28c e Y. O eixo X representa os pontos de infecção e o eixo Y o nível de expressão em log<sub>2</sub>.

Os genes relacionados com a adesão celular apresentaram um padrão de expressão semelhante ao da figura 4.37, no qual foram modulados negativamente já no ponto de 2 horas e mantiveram a expressão reprimida até 48 h, para ambas as cepas. Isso demonstra a rápida modulação destes genes os quais são expressos na forma tripomastigota e promovem uma cascata de sinalização na célula hospedeira ao se ligarem a receptores de superfície permitindo a invasão do parasita. Como mostra a figura 4.37, esses genes estão aumentados no ponto 0, que representa o *T. cruzi* na forma tripomastigota, e já no ponto de 2 h estão reprimidos, demonstrando a regulação desses genes assim que ocorre a interação com a célula hospedeira. Dentre estes genes encontram-se glicoproteínas gp63 (figura 4.37A), mucinas (figura 4.37B) e trans-sialidasas (figura 4.37C).

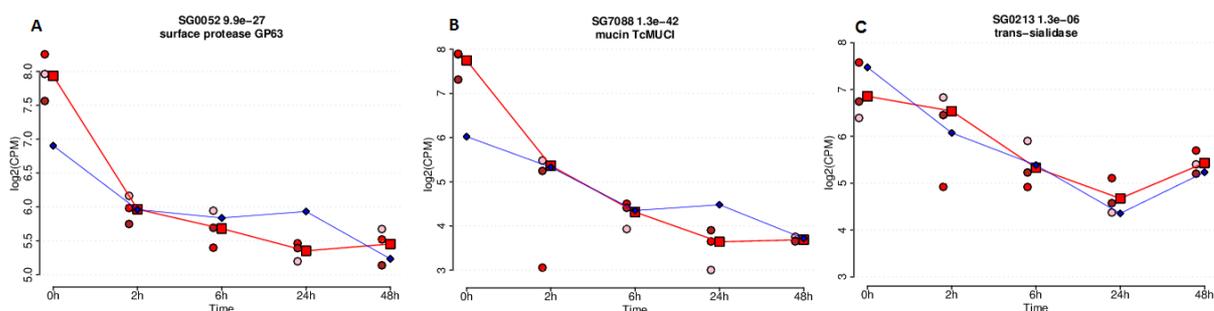


Figura 4.37 Gráfico do padrão de modulação de genes de superfície celular de Dm28c e Y durante a infecção. Legenda: O gráfico mostra no eixo X os pontos da infecção e no eixo Y o nível de expressão gênica em log<sub>2</sub>. A linha em vermelho representa modulação em Dm28c e a linha azul, a modulação em Y. Os círculos representam as réplicas A, B e D, enquanto os quadrados representam a média das réplicas localmente ponderada de em cada ponto.

No sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*; 2005) foram encontrados aproximadamente 1300 genes que pertencem à família MASP, conhecidas como proteínas de superfície associadas à mucina, os quais são expressos nas formas infectivas. Essas proteínas representaram 10% do total de genes modulados nos parasitas durante a infecção. Para diversas MASP, a modulação ocorreu principalmente em Dm28c, como mostra a figura 4.38A, no qual apresentou uma modulação negativa acentuada do ponto 0 para 2 horas e se manteve estável até 48 horas. Para a cepa Y, através de uma análise minuciosa no qual esse padrão de expressão se repetiu para outros genes, deduzimos que esse gene não é expresso nesta cepa. Por outro lado, a figura 4.38B mostra outro perfil de modulação das proteínas MASP na cepa Y, semelhante ao encontrado em Dm28c.

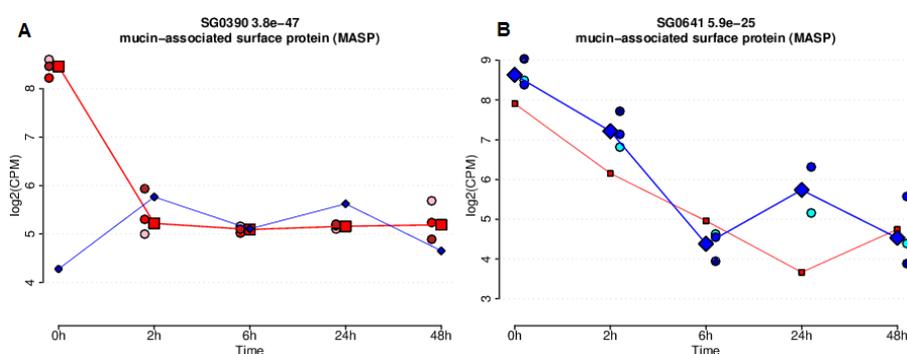


Figura 4. 38 Gráfico do padrão de modulação de genes da família MASP Dm28c e Y durante a infecção. Legenda: ver figura 4.37.

Esses dois perfis de modulação das proteínas MASP moduladas na cepa Y se repetiram para outras proteínas de superfície celular como mostra a figura 4.39 que apresenta a matriz de expressão para os *clusters* 4 e 12, enriquecidos para genes relacionados com a adesão celular. O primeiro gráfico, *cluster* 4, mostra o perfil de expressão para uma grande variedade de MASP. Para a cepa Dm28c há uma forte modulação negativa e para a Y essa modulação é bem menor e, em alguns casos, parece ser positiva. Entretanto, como já mencionado, este padrão corresponde ao da figura 4.38A e não significa modulação em Y. Por outro lado, o segundo gráfico, *cluster* 12, apresenta outras proteínas de adesão às quais são fortemente moduladas negativamente em ambas as cepas, inclusive MASP. Neste cluster estão presentes mucinas, trans-sialidases, proteína da família TASV e a glicoproteína gp63, como demonstrado na figura 4.39.



reprimidos no ponto de 6 h para Dm28c e tem sua expressão aumentada apenas 24 h após a infecção. Em Y, a ativação desses genes ocorre após 6 horas de infecção.

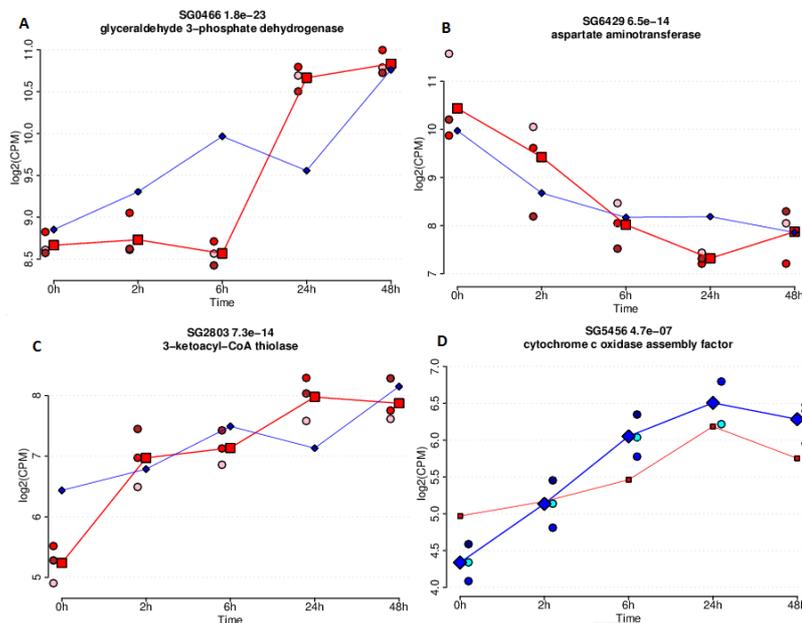


Figura 4.40 Gráfico do padrão de modulação de genes envolvidos no metabolismo energético em Dm28c e Y durante a infecção. Legenda: ver figura 4.37.

O ciclo celular é um processo complexo, no qual uma série de proteínas reguladoras estão envolvidas. Alguns desses fatores são essenciais para que o processo de divisão ocorra como as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, as quais regulam a progressão da célula através dos estágios do ciclo celular conhecidos como G1, S, G2 e M em eucariotos superiores. Em tripanossomatídeos, os mecanismos que regulam o ciclo celular são parcialmente compreendidos.

Genes associados à regulação da divisão celular foram identificados nos parasitas, como mostra a figura 4.41.

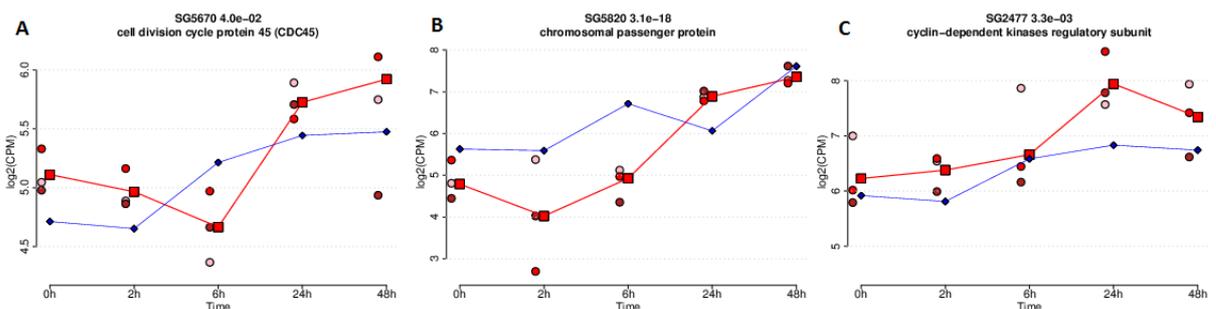


Figura 4.41 Gráfico do padrão de modulação de genes envolvidos na divisão celular em Dm28c e Y durante a infecção. Legenda: ver figura 4.37.

As figuras A e C apresentam a *cdc45* (*cell division cycle*), e uma quinase dependente de ciclina identificadas em *T. cruzi* no processo de infecção. Ambos os genes aparecem com um acentuado aumento da expressão no ponto de 24 h para a cepa Dm28c. Para a cepa Y, a modulação positiva desses genes foi mais precoce, iniciando 6 h após a infecção. Esses dados se confirmam no *cluster 5* da figura 4.39, o qual mostra o perfil de expressão de uma proteína *cdc* (sublinhado) que apresenta o mesmo padrão da figura 4.41A.

Durante a mitose, o complexo CPC (*chromosomal passenger complex*) conduz diferentes processos como alinhamento dos cromossomos, modificação das histonas e citocinese. Nós identificamos duas proteínas do complexo CPC. Uma delas é representada na figura 4.41B, no qual apresenta expressão diminuída em 2 h seguida de um aumento até 48 h para Dm28c. Para Y, a expressão é aumentada em 6 e 48 h após a infecção, com uma diminuição em 24 h. De maneira geral, um aumento da expressão dos genes relacionados com a regulação da divisão celular foi verificado em 24 h para a cepa Dm28c e em 6 h para a cepa Y.

Os parasitas utilizados neste estudo, Dm28c e Y, apresentaram perfil de modulação bem semelhante para alguns genes como mostra os *clusters 12* da figura 4.39. Por outro lado diversos genes apresentaram modulação bem diferente entre os parasitas, como mostra os *clusters 4* e *14* (figura 4.36). Isso evidencia que as cepas do *T. cruzi* utilizando vias comuns e particulares durante o processo de infecção.

## 5 DISCUSSÃO

A interação patógeno-hospedeiro envolve uma série de adaptações que estão relacionadas com diferentes processos de sinalização e modulação da expressão gênica em ambas as células, garantindo o sucesso no estabelecimento da infecção. A identificação dessas mudanças globais no transcrito de ambas as células pode fornecer uma nova visão sobre o processo de infecção, pela identificação dos mecanismos requeridos tanto para a sobrevivência do patógeno intracelular, quanto para célula hospedeira em resposta a infecção.

Um dos desafios da compreensão da doença de Chagas está justamente no entendimento dos mecanismos utilizados na interação *T. cruzi*-hospedeiro. Os estudos da interação *T. cruzi*-célula hospedeira têm permitido avanços no conhecimento da biologia da interação deste parasita, contribuindo para o melhor entendimento da patogenia da doença.

Neste trabalho, avaliamos e comparamos o perfil de infecção, bem como as modulações gênicas geradas na célula hospedeira e no parasita durante o processo de infecção com duas cepas distintas do *Trypanosoma cruzi*, Dm28c e Y. Essas cepas pertencem a diferentes grupos: Dm28c ao grupo *T. cruzi* I o qual é associado com o ciclo selvagem de transmissão e mamíferos arbóreos; Y ao grupo *T. cruzi* II o qual está relacionado com o ciclo doméstico de transmissão e nichos terrestres (ZINGALES *et al.*, 2009).

Diversos estudos mostram que as cepas Y e Dm28c utilizam diferentes habilidades para invadir e infectar a célula hospedeira. Nos trabalhos de Soeiro e colaboradores (1995) e de Souza (2003) diferentes modulações fisiológicas em cardiomiócitos frente à infecção por *T. cruzi* Y e Dm28c foram reportadas. Nesses estudos, os parasitas da cepa Dm28c levaram a modulações mais precoces e pronunciadas do que a cepa Y, além de causarem maior alteração na superfície da célula hospedeira. Além disso, esta mesma cepa apresentou uma rápida invasão e alta taxa de proliferação comparado com parasitas da cepa Y (SOEIRO, SILVA-FILHO e MEIRELLES, 1995). Esses dados corroboram com o nosso estudo onde a cepa Dm28c apresentou maior quantidade de parasitas no interior das células já nas primeiras horas de infecção passando de aproximadamente 3 para 26 parasitas por célula em 48 horas. Parasitas da cepa Y apresentaram baixa invasão, exibindo apenas 2 parasitas até o ponto de 24 horas e alcançando 6 parasitas por célula em 48 horas, valor muito abaixo do encontrado para Dm28c. Ainda, a taxa de infecção (porcentagem de célula infectada em 100 células) de Dm28c foi superior a 60% desde o ponto inicial. Por outro lado, a infecção causada pela cepa Y não ultrapassou 40% em todos os pontos analisados. Esses dados suportam a informação de que os parasitas Dm28c apresentam rápida invasão e alta taxa de proliferação *in vitro*.

Nossos dados evidenciaram que a cepa Y foi pouco invasiva e a taxa de infecção foi baixa ao longo da cinética de infecção. No entanto, a cepa Y caracteriza-se por apresentar alta virulência e patogenicidade em camundongo além de elevado percentual de mortalidade (DE DIEGO *et al.*, 1991; SCORZA e SCORZA, 1972). A cepa Y também mostrou alta infectividade, com elevado nível de parasitemia, em cães da raça *Beagle* (GUEDES, 2006). Contudo, alguns autores sugerem que a manutenção desses parasitas, após longos períodos em cultura, podem ser a causa da perda de infectividade e da virulência de diversas cepas do *T. cruzi* (MUNIZ, 1962; KAGAN, NORMAN e DOROTHY, 1966; BORGES e MELLO, 1980).

Em um estudo comparando parasitas cultivados apenas em meio axênico, com passagens alternadas entre camundongo e triatomíneos e cultivados apenas em camundongo, demonstrou que os parasitas mantidos por longos períodos em cultura apresentaram reduzida taxa de diferenciação na metaciclogênese (processo de diferenciação de formas epimastigotas replicativas para tripomastigotas metacíclicas infectivas). Em relação a infecção em camundongos, os parasitas que tiveram passagens alternadas entre camundongo e triatomíneos apresentaram a maior taxa de virulência enquanto os cultivados em meio axênico foram os menos infectivos e menos letais entre as condições de cultivo comparadas. Os autores sugerem que os tripomastigotas metacíclicos obtidos de parasitas mantidos em cultivos tem algumas propriedades afetadas como capacidade de invasão e colonização de células de cultivo (CONTRERAS, ARAQUE e DELGADO, 1994). Nesta mesma linha, evidências confirmam que a permanência do *T. cruzi* em meio de cultivo por longos períodos modifica a expressão de genes codificadores de polipeptídeos específicos das formas infectivas que leva a perda de virulência. Essa mudança na expressão pode variar de acordo com a manutenção em laboratório (CONTRERAS, DE LIMA e ZORRILLA, 1998). Por exemplo, tripomastigotas metacíclicos obtidos pelo estresse nutricional com TAU3AAG continua a expressar esses polipeptídeos específicos da forma infectiva que apresenta importante papel na virulência. Isso pode explicar o fato da cepa Dm28c apresentar maior taxa de infecção pois a metaciclogênese para essa cepa é bem estabelecida utilizando o TAU3AAG dando rendimentos de mais de 90%.

As cepas utilizadas neste projeto vem de um período de replicação *in vitro*, no qual os parasitas são mantidos em ciclos de infecção com células Vero. Diante disso, a virulência pode ter sido alterada neste processo como descrito acima.

## 5.1 RNA-Seq: célula hospedeira

Ao avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente, os estudos do transcrito da célula hospedeira durante o processo de infecção têm expandido grandemente a análise dos processos moleculares envolvidos na adaptação e sobrevivência do parasita bem como a resposta da célula frente à infecção.

Neste trabalho, através da tecnologia de sequenciamento do RNA, foi possível identificar um grande número de genes diferencialmente expressos na célula hospedeira ao longo da infecção culminando com 1752 genes modulados com Dm28c e 1264 com Y, 48 horas após a infecção. Nos tempos iniciais (2-6 h) poucos genes foram modulados (19 para Dm28c e 56 para Y). Curiosamente, em 24 horas houve menor quantidade de genes diferencialmente expressos do que em 6 h de infecção com a cepa Y, porém essa diferença não foi significativa. Isso pode ser devido ao fato de que a amostra Y6D teve uma maior taxa de infecção e maior quantidade de parasitas intracelulares do que os pontos de 24 h em Y. Uma solução para melhorar isso seria realizar as análises em relação à taxa de infecção. No teste de ANOVA, comparando todos os pontos, foram identificados ao todo 1061 e 831 genes modulados na infecção com Dm28c e Y, respectivamente.

Nos trabalhos descritos na literatura que avaliaram a modulação gênica da interação *T. cruzi*-célula hospedeira, em geral, poucos genes foram identificados. Em fibroblastos infectados com a cepa Y foram identificados apenas 6 genes modulados no período de 2-6 horas e um aumento significativo de 106 genes foi identificado no período de 24 horas (VAENA DE AVALOS *et al.*, 2002). Outro trabalho avaliando fibroblastos após 8 dias de infecção com a cepa Tulahuen detectou somente 16 genes diferencialmente modulados (IMAI *et al.*, 2005). Em coração de camundongos infectados, 186 genes foram identificados nos 3°, 37° e 110° dias após a infecção (GARG, VSEVOLOD e PAPACONSTANTINOU, 2003). Em células Hela, 64 genes foram modulados após 3 dias de infecção dos quais 41 tiveram a expressão aumentada enquanto 23 foram reprimidos (SHIGIHARA *et al.*, 2008). No modelo de cardiopatia chagásica crônica em camundongos infectados com a cepa Brasil após 100 dias de infecção, Mukherjee e colaboradores (2003) identificaram 455 genes aumentados e 575 reprimidos. O perfil de expressão em pacientes com cardiopatia chagásica crônica foi avaliado em 2005 por Cunha-Neto e colaboradores. Neste estudo foram modulados positivamente 123 genes e 39 genes tiveram a expressão diminuída. Através de uma metodologia baseada em microarranjo celular que utiliza RNA de interferência, foram detectados 14 genes diferencialmente expressos após 36 horas de infecção com *T. cruzi*.

Em 2011, nosso grupo investigou o transcrito da célula hospedeira durante a interação da cepa Dm28c com cardiomiócitos através de uma cinética de infecção mais detalhada (MANQUE *et al.*, 2011). Os pontos analisados foram 1, 2, 4, 6 h, 12 h, 24 e 48 h, ao todo foram identificados 353 genes diferencialmente expressos sendo que a maioria dos genes teve sua expressão modulada na fase tardia entre 24 e 48 h. Dentre os genes modulados, 111 tiveram sua expressão aumentada e 242 foram reprimidos. No mesmo ano, nosso grupo investigou as modulações gênicas no mesmo modelo biológico, Dm28c/cardiomiócitos, através de sequenciamento de RNA (RAMPAZZO, 2011). Os pontos analisados foram 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h pós-infecção sendo identificados 572 genes modulados, dos quais 371 se apresentaram com expressão aumentada e 201 reprimida. Há uma crescente modulação gênica ao longo de infecção iniciando com 18 genes diferencialmente expressos em 1 h culminando em 24 h com 492 genes modulados.

#### 5.1.1 Resposta imune

Os genes modulados que se referem à resposta imune foram ativados em todos os pontos da infecção, a partir de 2 h após a infecção, com ambas as cepas do *T. cruzi*. Dentre esses genes identificados encontram-se quimiocinas, citocinas (IL1 $\alpha$ , IL8, IL6, IL7, IL11, TGF- $\beta$  e etc) e receptores como IL6R, IL21R e TNFR.

As quimiocinas são substâncias produzidas pelo organismo que atuam na modulação e controle da resposta imunológica através do recrutamento de diferentes células da resposta imune inata e adaptativa. De modo geral, as quimiocinas CXC atuam sobre os neutrófilos e as células T e B, enquanto as CC atuam sobre um espectro mais amplo de populações celulares, como monócitos, basófilos, eosinófilos, células T, células dendríticas e células natural killer, não atuando sobre os neutrófilos. São responsáveis pela orientação, pelo processo de quimiotaxia, pela migração dos leucócitos, ativação de respostas inflamatórias e participação em outras funções, incluindo a regulação do crescimento dos tumores (ALIBERTI *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos têm mostrado que o papel desenvolvido pelas citocinas pró e anti inflamatórias na patogênese da doença de Chagas é extremamente importante para a modulação da resposta imune. A infecção experimental de camundongos com a cepa Colombiana demonstrou que o *T. cruzi* pode agir na regulação de quimiocinas e, conseqüentemente, na modulação da resposta imunológica nas fases da doença em cardiomiócitos e em macrófagos. A análise dos mRNAs mostra que as quimiocinas CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP10), bem como CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES) foram expressas

durante a fase aguda da doença de Chagas (HARDISON *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que a ativação de células T CD8 foi concomitante com a expressão das quimiocinas CCL5, CXCL9, CXCL10, CCL2 e MIP-1, as quais são ativadas pela citocina IFN- $\gamma$  (TEIXEIRA 2002).

Durante o processo de infecção do *T. cruzi* com a célula Vero foram identificadas diversas quimiocinas (CCL7, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6) incluindo CXCL10, bem como CCL2. As quimiocinas CCL5, CXCL9, CXCL10, CCL2 e MIP-1 parecem induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a produção de óxido nítrico por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi in vitro* (ALIBERTI *et al.*, 1999; 2001).

As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune que regulam os mecanismos efetores da resposta imune e inflamatória e estimulam o crescimento e diferenciação dos linfócitos. A citocinas interferons (IFNs) desempenham um papel central na resistência do hospedeiro a patógenos. Na doença de Chagas, IFN- $\gamma$  pode ativar fagócitos a produzir substâncias oxidantes, como o óxido nítrico, que leva à destruição do parasito (SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003). Esse processo pode ser desencadeado pela associação com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) induzindo a ativação da enzima sintase induzível de óxido nítrico, que catalisa a reação de produção de óxido nítrico (ALIBERTI *et al.*, 2001).

Os fatores reguladores de interferon (IRFs) são uma família de proteínas que regulam a atividade do IFN- $\gamma$  ativando ou reprimindo sua transcrição gênica. O fator IRF2 apresentou aumento da expressão em fibroblasto humano infectado com a cepa Y de *T. cruzi* e sua atividade inibiu a transcrição de IFN- $\gamma$  (CHAVES *et al.*, 2001). Uma proteína do herpesvírus bovino foi capaz de induzir a degradação de IRF3, culminando na inibição do IFN- $\beta$  nas células infectadas favorecendo a infecção viral (SAIRA *et al.*, 2007).

Os 3 genes codificadores de fatores reguladores de interferon que aparecem modulados neste trabalho possuem atividade de ativação do IFN- $\gamma$ . IRF3 e IRF9 parecem com expressão aumentada desde o início da infecção, sendo mais acentuada em 24 h. Enquanto o IRF1 foi reprimido no início da infecção e passou a apresentar modulação positiva apenas em 48 h para a cepa Dm28c e em 6 h para Y.

Outras citocinas como IL2, IL4 e IL-10 possuem ação anti inflamatória e estão presentes na fase aguda da infecção (SAMUDIO *et al.*, 1998). Essas citocinas e TNF- $\beta$  são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzidos por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação dos metabólitos tóxicos, quanto a diferenciação de células Th1, caracterizando um parasitismo sustentado (REED, 1994). Os genes codificadores das citocinas IL1 $\alpha$ , IL8 e IL11 tiveram sua expressão aumentada após 6 h de infecção, enquanto IL7 teve sua expressão reprimida a partir

de 2 h para ambas as cepas do *T. cruzi*. Por outro lado, o gene IL6 apresentou um perfil de expressão diferente entre as cepas, sendo ativado apenas em 6 h na infecção com Y e apenas em 48 h com Dm28c.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa da célula hospedeira pela detecção do agente infeccioso através de receptores como os receptores Toll-like (TLR). Moléculas de superfície do *T. cruzi* podem induzir a produção de citocinas e quimiocinas por células da resposta imune inata, provavelmente através da ativação dos receptores Toll-Like (TLR) modulando a resposta imunológica contra este parasito. A infecção em camundongos deficientes de TLR e de receptores de interleucina resultou na diminuição de citocinas inflamatórias, maior parasitemia e mortalidade (CAMPOS *et al.*, 2004). Este resultado indica que o *T. cruzi* pode ser reconhecido pelos TLRs e que a ativação de citocinas por estes receptores desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. O receptor TLR5 apresentou expressão aumentada a partir de 6 h com pico em 24 para ambas as cepas do parasita.

A resposta imune da célula hospedeira tem início nas primeiras horas de infecção, como sugere nossos dados no qual os genes envolvidos nesse processo estão aumentadas desde 2 h e se mantém elevada ao longo da infecção. Isso também foi verificado no modelo biológico cardiomiócito frente à infecção do *T. cruzi* no qual, avaliando o transcrito da célula hospedeira através de RNA-Seq, grande parte dos genes modulados no estágio inicial da infecção referem-se à resposta imune (RAMPAZZO, 2011).

### 5.1.2 Divisão celular

A divisão celular é tradicionalmente dividida em duas fases: mitose (M) e intérfase. A replicação do DNA ocorre em uma determinada parte da intérfase, a fase S. A fase S é precedida pela G1, na qual a célula se prepara para a síntese de DNA, e seguida pela fase G2, durante a qual a célula se prepara para a divisão. A transição entre as fases ocorre de forma ordenada e é regulada por diferentes proteínas.

As proteínas reguladoras chaves são as ciclinas dependente de quinases (CDK), uma família de proteínas serina/treonina quinases. Essas proteínas são ativadas em pontos específicos do ciclo celular, como G1, S, G2 e M. Quando ativadas, se ligam a ciclina formando um complexo e induzem uma cascata de sinalização, através da fosforilação de certas proteínas (VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

As proteínas BUB1 e BUB1B pertencem à família serina/treonina quinase e desempenham um papel fundamental na formação do fuso mitótico. A BUB1 é requerida para

o pareamento dos cromossomos, localização das proteínas MAD2, BUB1B, CENP-E (proteína associadas ao centrômero) e CENP-F no cinetócoro e manutenção da ligação dos microtúbulos ao fuso. Por outro lado, a BUB1B estabiliza a ligação dos microtúbulos ao cinetócoro e organiza o alinhamento dos cromossomos. Essa proteína faz parte do complexo de *checkpoint* da mitose, que inclui a CDC20 (*cell division cycle*), e inibe o complexo de promoção da anáfase (BOLANOS-GARCIA e BLUNDELL, 2011).

O complexo APC (complexo promotor de anáfase) permite a célula prosseguir ao longo do ciclo celular e a degradação da proteína securina causa a separação dos cromossomos. No final da anáfase, a ciclina B1 é degradada levando à inativação da cdk1 e ao fim da mitose. A proteína CKAP2 é um substrato para o complexo APC, sendo degradada no final da mitose. Os níveis dessa proteína na célula variam ao longo do ciclo celular sendo mais elevados na mitose (SEKI e FANG, 2007). Esse gene foi reprimido ao longo da infecção pelo *T. cruzi* e aumentou sua expressão apenas em 48 h.

A replicação do DNA tem início com a formação de complexos de nucleoproteínas altamente organizadas nas origens de replicação. Esta maquinaria é denominada ORC. Esse complexo formado por 6 subunidades reconhece as origens de replicação e recruta outras proteínas. Quando a ORC interage com o DNA, passa também a interagir com a proteína CDC6, CDT1 e o complexo de MCM (SCLAFANI e HOLZEN, 2007).

A subunidade 1, 5 e 6 do complexo ORC bem como a CDC6 e CDC45, integrantes do complexo de replicação, foram negativamente modulados durante a infecção. O complexo MCM formado por proteínas altamente conservadas de manutenção do mini-cromossomo possuem atividade de helicase. A fosforilação dessas proteínas pela cdk1 reduz a atividade de helicase. Neste estudo identificamos os genes codificadores para quatro proteínas do complexo MCM: MCM4, MCM6, MCM8 e MCM10, os quais encontraram-se reprimidos ao longo da infecção.

Os genes relacionados à regulação do ciclo celular da célula hospedeira foram reprimidos ao longo da infecção, como ciclinas (CCNA2, CCNH e CCNE2), cdk's (CDK1, CDK17 e CDK14), BUB1 e BUB1B e genes do ciclo de divisão celular (CDC25C, CDCA2, CDC45, CDC6).

### 5.1.3 Metabolismo energético

Estudos mostram que a infecção do *T. cruzi* afeta o metabolismo energético na célula hospedeira. Além disso, a função diminuída da mitocôndria tem sido associada com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica (WEN, VYATKINA e GARG, 2004).

Durante a infecção, a célula hospedeira exibe altas taxas do metabolismo do ácido graxo. A taxa de oxidação do ácido graxo na mitocôndria é controlada pelo fluxo de glicose através da via glicolítica e pela taxa de conversão do piruvato a acetil-Coa através da atividade da enzima piruvato desidrogenase. Em cardiomiócitos, a infecção pelo *T. cruzi* causou aumento da expressão de genes relacionados à  $\beta$ -oxidação no metabolismo de ácido graxo e diminuição da expressão da enzima piruvato desidrogenase (GARG *et al.*, 2004). Os autores sugerem que além de compensar a glicólise, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos fornece substratos para o ciclo de Krebs. O desenvolvimento da infecção pelo parasita é afetado em células deficientes de quinase piruvato desidrogenase, regulador negativo da enzima, que exibem aumento da atividade da piruvato desidrogenase.

Em mamíferos, a  $\beta$ -oxidação ocorre nos peroxissomos e na mitocôndria. Os ácidos graxos de cadeia longa são transportados para os peroxissomos e oxidados para produzir cadeias curtas, os quais são enviados para a mitocôndria onde continua a oxidação através das enzimas acil-Coa desidrogenase até a produção de acetil-Coa. Proteínas peroxissomais envolvidas no transporte de ácidos graxos de cadeia longa e na  $\beta$ -oxidação tiveram positiva associação com o crescimento intracelular do parasita (CARADONNA *et al.*, 2013). Concomitantemente, evidenciamos a presença de três genes codificadores das enzimas acil-CoA desidrogenase (ACAD) e das enzimas enoil CoA hidratase e canitina, ambas envolvidas na  $\beta$ -oxidação, com expressão aumentada a partir de 6 h após a infecção. Esses dados suportam a hipótese de que a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa desempenha papel chave no desenvolvimento intracelular do *T. cruzi*.

A família citocromo P450, integrante da cadeia transportadora de elétrons, está envolvida em diversas funções, como síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos. Em humanos, possui papel importante no metabolismo de drogas. Durante a infecção, identificamos três genes da família citocromo P450 (CYP) com expressão aumentada nos tempos 6 e 24 h na cepa Dm28c e 24 e 48 h para a cepa Y. Esses dados, juntamente com o gene NDUFB6 e NDUFB9, subunidades do complexo NADH: ubiquinona oxidoreductase da cadeia transportadora de elétrons com expressão aumentada ao longo da infecção, são diferentes dos encontrados na fase crônica da doença. Garg e colaboradores (2003) demonstraram que esses genes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons foram drasticamente diminuídos em miocárdios durante a fase crônica da doença. Por outro lado, em cardiomiócitos, os genes dessa via também apresentaram aumento da expressão (MANQUE, 2011), corroborando os nossos dados.

Durante a infecção, evidenciamos a repressão de vários genes envolvidos com a mitocôndria, como o gene MFN2, cujo produto é integrante da membrana mitocondrial, o

MRPL42, ribossomo mitocondrial, os transportadores mitocondriais SLC25A15 e SLC25A22 e o gene codificador de uma translocase envolvida na inserção de proteínas hidrofóbicas na membrana mitocondrial interna. Todos esses genes aparecem reprimidos ao longo da infecção.

Nossos resultados destacam que distúrbios mitocondriais podem ter início nos estágios iniciais da infecção, como mostram outros trabalhos (MANQUE, 2011; RAMPAZZO, 2011) com agravamento dos danos cardíacos nas fases aguda e crônica da doença.

Através do modelo de cardiopatia chagásica, Garg e colaboradores (2004) avaliaram as alterações no transcrito nos pontos 3 a 5, 25 a 40 (fase aguda) e 150 a 180 (fase crônica) dias após infecção. Os principais resultados revelaram que o aumento na expressão de genes associados à  $\beta$  oxidação de ácidos graxos podia compensar as deficiências da glicólise ligadas à oxidação de piruvato e ainda fornecer substratos para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A repressão observada nos componentes da cadeia respiratória implicaria na perda da capacidade de gerar ATP e isso poderia ser a base provável para a deficiência energética vista na cardiopatia chagásica crônica (GARG *et al.*, 2004).

#### 5.1.4 Apoptose

A apoptose, morte celular programada, é desencadeada por fatores externos, tóxicos, imunológicos e infecciosos ou pelo desenvolvimento e controle de crescimento através de genes específicos. Neste estudo, poucos genes modulados foram identificados com função relacionada com a apoptose, dentre os quais três são da família Bcl-2. Os genes da família Bcl-2 são conhecidos por desempenhar um importante papel na regulação da apoptose, induzindo ou reprimindo. Essas proteínas se associam às membranas do retículo endoplasmático, envelope nuclear e membrana mitocondrial externa. A expressão de proteínas Bcl-2 é capaz de impedir a liberação de caspases, enzimas proteolíticas que desencadeiam o processo de apoptose ativando uma cascata de sinalização (BURLACU, 2003). Os membros da família Bcl-2 identificados neste estudo são classificados como pro-apoptóticos (BCL2L11 e BAX) e anti-apoptóticos (BCL2L15 e BBC3). Os genes das proteínas BCL2L15, BBC3 e BAX estão aumentados desde 2 h após a infecção enquanto o gene BCL2L11 está reprimido ao longo da infecção em ambas as cepas bem como o gene da caspase 2. Ainda, identificamos o gene ARL11 que desempenham um papel na apoptose de maneira dependente de caspase e apresenta modulação positiva principalmente em 6 h.

A cruzipaina foi descrita apresentando um papel anti-apoptótico em cultura de cardiomiócito. De acordo com os autores, tanto a infecção pelo *T. cruzi* como a cruzipaina promovem a sobrevivência dos cardiomiócitos em cultura. O efeito anti-apoptótico foi mediado pela expressão do gene Bcl-2 (AOKI *et al.*, 2004).

Outros trabalhos avaliando a modulação do transcriptoma da célula hospedeira durante a infecção por *T. cruzi* identificaram diversos genes relacionados à apoptose. Em cardiomiócitos genes pró e anti-apoptóticos foram modulados e envolvidos em diferentes vias de sinalização (MUKHERJEE, BELBIN, *et al.*, 2003; MANQUE *et al.*, 2011; RAMPAZZO, 2011). A apoptose parece favorecer a dispersão do parasita e ainda atuar no controle da carga parasitária no hospedeiro.

## 5.2 RNA-Seq: *Trypanosoma cruzi*

Através da tecnologia de sequenciamento do RNA, este trabalho foi pioneiro ao estudar a modulação dos transcritos do parasita durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira. Os trabalhos avaliando a modulação gênica, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, no processo de infecção através da tecnologia de RNA-Seq, iniciaram em 2010 com a avaliação da interação da célula HeLa com o vírus da vaccínia, no qual foram identificados 118 genes modulados no patógeno (YANG *et al.*, 2010). Após esse estudo pioneiro, outros grupos dedicaram esforços a fim de avaliar o transcriptoma de diferentes patógenos ao longo da infecção. Até o momento, foram realizados 9 estudos avaliando ambos os transcriptomas, tendo como patógenos vírus, fungos, bactérias e um único trabalho com protozoário (*Leishmania braziliensis*) (YANG *et al.*, 2010; TIERNEY *et al.*, 2012; STARK *et al.*, 2012; MARETTI-MIRA *et al.*, 2012; KAWAHARA *et al.*, 2012; SKVORTSOV *et al.*, 2013; VANNUCCI, FOSTER e GEBHART, 2013; YAZAWA *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2013).

Um grande número de genes foi identificado como diferencialmente expresso ao longo da infecção. Ao todo, 2372 genes foram identificados em Dm28c e 1233 genes na cepa Y. Dentre esses genes, cerca de 45% foram identificados como codificadores de proteínas hipotéticas. Com os dados do sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005) foi possível fazer a classificação funcional de proteínas, utilizando ferramentas de predição gênica. Um conjunto de genes, constituindo 52,3% das proteínas identificadas, foi classificado genericamente como proteínas hipotéticas, com função desconhecida. Os dados de proteômica do *T. cruzi*, divulgados em 2005, corroboram esses dados, uma vez que mais de 30% das proteínas identificadas na análise foram classificadas como hipotéticas

(ATWOOD III *et al.*, 2005), sendo que mais da metade possui ortólogos em *Leishmania major* e *T. brucei*. Do total de genes modulados identificados como codificadores de proteínas hipotéticas durante a infecção, aproximadamente 900 (86% entre as hipotéticas) foram anotadas como codificadores de proteínas hipotéticas conservadas, as quais apresentam ortólogos em outros organismos. Diante disso, o estudo da genômica funcional do *T. cruzi*, principalmente das proteínas hipotéticas é muito importante por se tratar de um organismo que apresenta diversas peculiaridades em sua biologia molecular. Neste contexto, nosso laboratório possui diversos projetos com ênfase na caracterização de proteínas hipotéticas visando aumentar o conhecimento sobre a expressão, função e regulação ao longo do ciclo de vida do parasita.

As proteínas presentes na superfície celular que desempenham importante papel na adesão celular, promovendo a invasão do parasita, tiveram uma grande representação nos genes modulados em *T. cruzi* durante a infecção (aproximadamente 460 genes, sendo metade representada pela família MASP). Os genes codificadores das proteínas de superfície como as associadas à mucina (MASP), membros da superfamília de trans-sialidases, mucinas e a glicoproteína de superfície gp63 foram identificadas no sequenciamento do genoma e somam cerca de 18% dos genes codificadores de proteínas em *T. cruzi*. As trans-sialidases constituem a família mais representada no genoma de *T. cruzi*, com 1430 genes, sendo 693 pseudogenes. A família MASP, identificada pela primeira vez no sequenciamento do genoma, possui 1377 genes.

Nos dados de proteômica, 223 trans-sialidases foram identificadas e representaram 30 das 50 proteínas mais expressas em tripomastigota. Amastigota e tripomastigotas metacíclicos também apresentaram um conjunto de trans-sialidases. As MASPs também foram identificadas em tripomastigota, mas em menor proporção que as trans-sialidases. Em nosso estudo, 245 genes codificadores de MASPs tiveram sua expressão modulada durante o processo de infecção, sendo principalmente reprimidos a partir de 2 horas após a infecção. Ainda, aproximadamente 90 genes para trans-sialidases foram moduladas na infecção. A maioria desses genes aparece com expressão aumentada em tripomastigota e, em seguida, foram reprimidos. Isso sugere que essas proteínas são importantes para o processo de adesão e invasão do parasita que ocorre nos primeiros momentos de contato com a célula hospedeira. Uma vez interiorizados, os parasitas apresentaram grande parte desses genes com expressão reprimida e outros ativados, como os que codificam enzimas do metabolismo energético. Isso pode demonstrar que o parasita regula a expressão apenas de genes necessários para sua sobrevivência. Além disso, parte dessas proteínas não é expressa na superfície celular da

forma amastigota. Isso demonstra que logo no começo da infecção o parasita inicia seu processo de diferenciação, alternado seu transcrito já em 2 horas.

A expressão de diversas MASPs foi diferente entre as cepas, assim como outras proteínas de superfície. Isso demonstra a variedade de sinalização que cada cepa do parasita utiliza para invadir a célula hospedeira. Estudos têm mostrado que isolados de *T. cruzi* de diferentes regiões expressam diferentes proteínas de superfície e utilizam diferentes habilidades para invadir a célula hospedeira (YOSHIDA, 2006).

O estudo do metabolismo energético na forma amastigota de *T. cruzi* tem sido limitado devido à influência do metabolismo do hospedeiro e os dados ainda são controversos. Engel e colaboradores (1987) realizaram um estudo bioquímico em amastigota axênico e os resultados sugeriram que essa forma do ciclo de vida utiliza a glicólise como maior fonte de energia. Além disso, demonstraram que os parasitas amastigotas axênicos realizam a fermentação de glicose a succinato e outros produtos, mas apresentaram baixa atividade da cadeia respiratória e ciclo de Krebs. Os autores sugerem que o transportador de hexose tem uma correlação importante com a glicólise para geração de energia em amastigota, pois a disponibilidade de glicose livre no citoplasma da célula hospedeira deve ser baixa por se tratar de uma fonte de energia para ambas as células, parasita e hospedeiro.

Por outro lado, um trabalho mais recente (MARCIANO *et al.*, 2008) afirma que o metabolismo de aminoácido é a principal fonte de energia em todo o ciclo de vida do *T. cruzi*. Diferentes enzimas aminotransferases são utilizadas nesta via, sendo que algumas isoformas foram detectadas como exclusiva de uma das fases evolutiva do *T. cruzi*.

Nossos dados sugerem que as formas amastigotas utilizam ambas as vias, glicolítica e o metabolismo de aminoácido, como fonte de energia. Diversos genes codificadores de enzimas da via glicolítica foram identificados e apresentaram um perfil de modulação aumentado para as cepas do parasita. No gráfico de modulação gênica o gene para transporte de hexose manteve alta expressão em todos os pontos da infecção desde o início quando o parasita ainda se encontra na forma tripomastigota. Genes codificadores de enzimas aminotransferase que atuam no metabolismo do aminoácido foram reguladas durante o processo de infecção, inclusive a malato desidrogenase glicosomal e a tirosina desidrogenase identificadas anteriormente como exclusiva de epimastigota (MARCIANO *et al.*, 2008).

Esses dados mostram como o estudo do mecanismo utilizado para o metabolismo energético nas formas amastigotas é deficiente e o estudo do transcrito pode auxiliar no seu entendimento. Mas de maneira geral, nossos dados sugerem que ambas as cepas, Dm28c e Y, utilizam o metabolismo de glicose e aminoácidos.

Durante o processo de infecção, após a invasão, o parasita permanece no vacúolo parasitóforo e inicia o processo de diferenciação para amastigota. Após o escape do vacúolo, o parasita se localiza no citoplasma onde finaliza sua diferenciação. A divisão celular das formas amastigota inicia 24 h (MOTT e BURLEIGH, 2008) ou 35 h (de SOUZA, 2002), dependendo da cepa, após a invasão. Antes do processo de divisão há um aumento gradual dos amastigotas. O cinetoplasto e núcleo se dividem, um novo flagelo é formado e fendas aparecem na extremidade posterior e anterior da célula dividindo-a.

Todo esse processo de divisão é regulado por diferentes proteínas. As ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são peças chaves neste processo. A ativação dessas proteínas ocorre em determinados pontos do ciclo direcionando o processo de divisão.

Em tripanossomatídeos, o mecanismo que regula o ciclo celular ainda é parcialmente compreendido e seu genoma não apresenta todas as proteínas reguladoras dos demais eucariotos. Embora a síntese de DNA nuclear e cinetoplástico ocorram ao mesmo tempo em *T. brucei*, a fase S do cinetoplasto termina antes (WOODWARD e GULL, 1990). O mecanismo que regula e coordena os pontos de checagem no núcleo e no cinetoplasto são desconhecidos. A caracterização de uma ciclina dependente de quinase revelou sua localização celular no núcleo, cinetoplasto e citoplasma. Isso sugere a existência de um mecanismo molecular geral que controla os ciclos no núcleo e cinetoplasto.

Durante a mitose, o complexo CPC conduz diferentes processos como alinhamento dos cromossomos, modificação das histonas e citocinese. Em *T. brucei* foi demonstrado que esse complexo é necessário para a formação do fuso mitótico, segregação dos cromossomos e citocinese nas formas procíclicas.

Neste trabalho identificamos alguns genes codificadores de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular com expressão diferencial ao longo da infecção. A 4.41 mostra o perfil de modulação desses genes os quais foram modulados positivamente para ambas as cepas, mas Y teve esse aumento mais precoce na infecção.

Todos esses dados mostram que o *T. cruzi* ainda é um organismo ainda pouco compreendido. Faltam esclarecimentos acerca do metabolismo e da regulação do ciclo celular, entre outros aspectos, principalmente nas formas intracelulares. A presença de diversas proteínas anotadas como hipotéticas, as quais ainda se desconhecem a função que desempenham, dificulta o entendimento mais profundo do metabolismo do parasita. Diante disso, estudos em larga escala, como o conduzido, podem fornecer informações importantes para colaborar com o entendimento do organismo e de seus mecanismos de sobrevivência, ao longo do ciclo de vida.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos nesta dissertação concluímos que:

- Através da tecnologia de RNA-Seq foi possível identificar que a infecção com ambas as cepas do *T. cruzi* levam a uma modulação muito semelhante no transcrito da célula hospedeira. Ao todo, 1061 e 831 genes foram diferencialmente expressos na infecção com Dm28c e Y, respectivamente.
- Esse trabalho foi pioneiro ao identificar as modulações no transcrito do parasita durante o processo infeccioso. Ao todo 2372 genes foram identificados como modulados em Dm28c e 1233 na cepa Y.
- A cepa Dm28c foi mais infectiva e apresentou maior quantidade de parasitas interiorizados que a cepa Y, em nossas condições experimentais. Conseqüentemente, a cepa Dm28c levou à maior modulação gênica em ambas as células envolvidas na infecção.
- A resposta da célula hospedeira ocorre logo no início da infecção (2 h) com ativação de diversas quimiocinas e citocinas pró e anti inflamatórias.
- Genes relacionados com a divisão celular, principalmente a regulação da replicação do DNA e progressão do ciclo, foram reprimidos ao longo da infecção na célula hospedeira.
- Com relação ao metabolismo energético, a célula Vero apresentou aumento da expressão de genes envolvidos principalmente no metabolismo de lipídios. E evidenciamos a repressão de vários genes envolvidos com o metabolismo mitocondrial.
- A infecção desencadeou a modulação de alguns genes envolvidos na apoptose, principalmente da família Bcl-2 e caspase.
- As cepas Dm28c e Y utilizam vias comuns e particulares durante o processo de infecção.
- No parasita, a maioria dos genes modulados foram identificados como proteínas hipotéticas e proteínas de superfície celular, principalmente da família MASP. Essas proteínas de superfície encontram-se reprimidas desde o início da infecção.
- Os genes envolvidos no metabolismo foram modulados positivamente em 6 h para a cepa Y e 24 h para a cepa Dm28c, bem como os genes envolvidos na divisão celular.

## 7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para esse trabalho temos:

- Terminar a preparação das bibliotecas das amostras amplificadas com miniéxon.
- Preparar a réplica C na plataforma SOLiD para o sequenciamento a fim de melhorar as análises, aumentando a confiabilidade estatística.
- Fazer uma nova análise correlacionando a quantidade de parasita por célula.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucinlike glycosyl-phosphatidylinositol glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, 304, 1994. 793–802.
- ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNONE, S.C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, 116, Maio 2007. 44–52.
- ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life.**, 59, 2007. 274-279.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 94, 1999. 71-80.
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A *T. cruzi*-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low pH. **Cell**, 61, 29 Julho 1990. 1277-1287.
- AOKI, M. P.; GUIÑAZÚ, N. L.; PELLEGRINI, A. V.; GOTOH, T.; MASHI, D. T.; GEA, S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 286, 2004. 206-212.
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infect Immun**, 72, 2004. 5892–5902.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: Perspectives after a 15-year study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 87, 1992. 43-56.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, 25, 2000. 25-29.
- ATWOOD III, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETO, R. L. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, 309, 2005. 473-476.
- AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, 7 fevereiro 2004. 2034-2039.
- BERNSTEIN, R. E. Darwin's illness: Chagas disease resurgens.. **J R Soc Med**, 77, 1984. 608-609.
- BOLANOS-GARCIA, V. M.; BLUNDELL, T. L. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, 36, 2011.
- BONALDO, M C; SOUTO-PADRON, T; DE SOUZA, W; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol.**, 106, 1988. 1349-1358.
- BORGES, M. A.; MELLO, D. A. Infectividade de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi*, mantidas em cultura, para *Calomys callosus* (Rodentia) e camundongos albinos. **Rev. Pat. Trop.**, 9, 1980. 145-151.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, 27, 1973. 347-382.
- BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **J. Cell. Mol. Med.**, 7, 2003. 249-257.
- BURLEIGH, B. A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Science's STKE**, 293, 2005.

BURLEIGH, B.A.; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. **J Cell Biol**, 136, 1997. 609–620.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, 4, 2002. 701–711.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; NOIA, J. M. D. *Trypanosoma cruzi* surface mucins:host-dependent coat diversity. **NATURE REVIEWS - MICROBIOLOGY**, 4, março 2006. 229-236.

CALVET, C. M.; TOMA, L.; DE SOUZA, F. R.; MEIRELLES, M DE N.; PEREIRA, M. C. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 50, 2003. 97-103.

CALVET, C. M.; MEUSER, M.; ALMEIDA, D.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi*- cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. **Exp Parasitol** 2004; 107 (1-2): 20-30. **Exp Parasitol**, 107, 2004. 20-30.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURN, N. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect.**, 5, 2003. 1231-1240.

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENT, E. P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88. **The Journal of Immunology**, 172, 2004. 1711–1718.

CAMPOS, P. C.; BARTHOLOMEU, D. C.; DAROCHA, W. D.; CERQUEIRA, G. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol.**, 38, 2008. 1383-1389.

CANÇADO, J. R. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. E. B.-N. M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M. E. A. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 71, 1995. 273-278.

CARADONNA, K. L.; ENGEL, J. C.; JACOBI, D.; LEE, C. H.; BURLEIGH, B. A. Host Metabolism Regulates Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Host & Microbe**, 13, 2013. 108–117.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1, 1909. p. 159-218.

CLEVELANT, W. S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **J. American Statistical Association**, 74, 1979. 829-836.

CHAVES, A.C.L.; FRANKLIN, B.S.; CERÁVOLO, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; ROMANHA, A.J. Interferon regulatory factor (IRF-2) may be involved in the inhibition of IFN- $\gamma$ -induced tryptophan degradation by *Trypanosoma cruzi* in human fibroblasts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2001, 34:144-144.

CONTRERAS, V. T.; ARAQUE, W.; DELGADO, V. S. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro - I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 89, 1994. 53-259.

CONTRERAS, V. T.; DE LIMA, A. R.; ZORRILLA, G. *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93, 1998. 753-760.

COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi* -infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC Genomics**, 10, 2009. 252.

- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 102, 2007. 113-122.
- COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 104, 2009. 549-554.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97, 2002. 3-24.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2009. 31-40.
- CUNHA-NETO, E.; DZAU, V.J.; ALLEN, P.D.; STAMATIOU, D.; BENVENUTTI, L.; HIGUCHI, M.L.; KOYAMA, N.S.; SILVA, J.S.; KALIL, J.; LIEW, C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **Am J Pathol**, 167, 2005. 305-313.
- DE CARVALHO, M. C. D. C. G.; DA SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 40, março 2010. 735-744.
- DE DIEGO, J. A.; PENIN, P.; DEL REYL, J.; MAYERL, R. A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. **Histol Histopath**, Madrid, Spain, 1991. 199-206.
- DE SOUZA, W. O Parasita e a sua interação com os hospedeiros.. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan S.A. , 2000. p. 88-126.
- DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, 8, 2002. 269-285.
- DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010, Julho 2010. 295394.
- DIAS, J. C. P. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. E. B.-N. M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan S.A., 2000.
- DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23, 2007. 13-22.
- DIAS, J. C. P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2009. 41-45.
- DIEHN, M.; RELMAN, D. A. Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, 4, 2001. 95-101.
- DORTA, M. L.; FERREIRA, A.T.; OSHIRO, M.E.M.; YOSHIDA, N. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol Biochem Parasitol**, 73, 1995. 285-289.
- EL-SAYED, N. M. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, 309, 15 Julho 2005. 409-415.
- ERFLE, H; SIMPSON, J.C; BASTIAENS, P.I.H; PEPPERKOK, R. siRNA cell arrays for high-content screening microscopy. **Biotechniques**, 34, 2004. 454-458, 460, 462.
- FAVORETO, S. J.; DORTA, M. L.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa Protein Tyrosine Phosphorylation Is Associated with Host Cell Invasion. **Experimental Parasitology**, 89, 1998. 188-194.
- GAO, L.; TU, Z. J.; MILLETT, B. P.; BRADEEN, J. M. Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber-*Phytophthora infestans* interactions. **BMC Genomics**, 23, 2013. 340.
- GARCIA, E. A.; ZILIANI, M.; AGUERO, F.; BERNABO, G.; SANCHEZ, D.O.; TEKIEL, V. TcTASV: a novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypomastigote cDNA library. **PLoS Negl. Trop. Dis**, 10, 2010.

GARG, N.; GERSTNER, A.; BHATIA, V.; DEFORD, J.; PAPACONSTA, J. Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways. ; 381 (Pt 3):. **Biochem J**, 381, 2004. 743-752.

GARG, N.; VSEVOLOD, L. P.; PAPACONSTANTINO, J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. **Biochimica Biophysica Acta**, 1683, 2003. 106-120.

GENOVESIO, A.; GIARDINI, M. A.; KWON, Y.; DOSSIN, F. DE M.; CHOI, S. Y.; KIM, N. Y.; KIM, H. C.; JUNG, S. Y.; SCHENKMAN, S.; ALMEIDA, I. C.; EMANS, N.; FREITAS-JUNIOR, L. H. Visual genome-wide RNAi screening to identify human host factors required for *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS One**, 6, 2011.

GIAROLA, N. L. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: Effects of heat shock on ecto-ATPase activity. **Experimental Parasitology**, 133, 2013. 434-441.

GÜNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic Cell**, 9, 2010. 1159–1170.

HIDE, G. History of Sleeping Sickness in East Africa. **Clin. Microbiol**, v. 12, 12, 1999. p. 112-25.

HUANG, C.; MA, W.Y.; LI, J.; DONG, Z. Arsenic induces trioxide induces apoptosis of myeloid leukemia cells by activation of caspases. **Med. Oncol**, 16, 1999. 58–64.

HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R. A.; CARPENTER, P. M.; LANE, T. E.; MANNING, J. E. The Chemokines CXCL9 and CXCL10 Promote a Protective Immune Response but Do Not Contribute to Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**. v. 1, n. 74: 125–134. Jan. 2006.

IMAI, K.; TATSUYUKI, M.; KAWAI, M.; KOGA, H. Microarray analysis of host gene-expression during intracellular nests formation of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Microbiol Immunol**, 49, 2005. 623-631.

KAGAN, I. G.; NORMAN, L.; DOROTHY, A. Studies on *Trypanosoma cruzi* isolated in the United States: A Review. **Rev. Biol. Trop.**, 14, 1966. 55-73.

KAWAHARA, Y. et al. Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. **PLoS One**, 2012.

LEEVERS, S. J.; VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. **Current Opinion in Cell Biology**, 11, 1999. 219–225.

LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NESSENSWEIG, V.; ANDREWS, N.W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med**, 171, 1990. 401-413.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, 2, 2003. 830–840.

MANDLIK, A.; LIVNY, J.; ROBINS, W.P.; RITCHIE, J.M.; MEKALANOS, J.J.; WALDOR, M.K. RNA-Seq-Based Monitoring of Infection-Linked Changes in *Vibrio cholerae* Gene Expression. **Cell Host Microbe**., 10, Agosto 2011. 165-167.

MANQUE, P.A; PROBST, C; PEREIRA, M.C.S; RAMPAZZO, R.C.P; OZAKI, L.S; PAVONI, D.P; SILVA NETO, D.T; CARVALHO, M.R; XU, P; SERRANO, M.G; ALVES, J.M.P; MEIRELLES, M.N; S, GOLDENBERG; KRIEGER, M.A; BUCK, G.A. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocyte. **Infect Immun**, 79, 2011. 1855-1862.

MARCIANO, D.; LLORENTE, C.; MAUGERI, D. A.; DE LA FUENTE, C.; OPPERDOES, F.; CAZZULO, J. J.; NOWICK, C. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology** , 161, 2008. 12-20.

MARETTI-MIRA, A.C.; BITTNER, J.; OLIVEIRA-NETO, MP.; LIU, M.; KANG, D.; LI, H.; PIRMEZ, C.; CRAFT, N. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania*

*braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. **PLoS Negl Trop Dis.**, 6, 2012.

MEIRELLES, M. N.; MARTINEZ-PALOMO, A.; SOUTO-PADRON, T; DE SOUZA, W. Participation of concanavalin A binding sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. **J Cell Sci.**, 62, 1983. 287-299.

MEIRELLES, M. N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Mol Biochem Parasitol.**, 52, 1992. 175-184.

MELLO, C. B.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. Differential in Vitro and in Vivo Behavior of Three Strains of *Trypanosoma cruzi* in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, 82, 1996. 112–121.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews in Genetics.**, 11, 2010. 31-46.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos epidemiológicos. **Boletim Informativo**, 2012.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, 2009. 17-30.

MOTT, G. A.; BURLEIGH, B. A. The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. **Subcell. Biochem.**, 47, 2008. 165–173.

MUKHERJEE, S.; BELBIN, T.J.; SPRAY, D.C.; IACOBAS, D.A.; WEISS, L.M.; KITSIS, R.N.; WITTNER, M.; JELICKS, L.A.; SCHERER, P.E.; DING, A.; TANOWITZ, H.B. Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. **Parasitol Res**, 91, 2003. 187-196.

MUNIZ, J. Imunidade na doença de Chagas. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 60, março 1962.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic Surface Molecule gp82 in Adhesion to Gastric Mucin and Invasion of. **Infection and Immunity**, 2003. 557–561.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int J Parasitol**, 32, 2002. 405-414.

NÓBREGA, A A; GARCIA, MARCIO H.; TATTO, ERICA; OBARA, MARCOS T.; COSTA, ELENILD; SOBEL, JEREMY; ARAUJO, WILDO N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, 41, 2009. 296-300.

PEREIRA, M. E. A.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E. M.; MING, M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect. Immun.**, 64, 1996. 3884-3892.

RAMPAZZO, R.C.P. Genômica funcional da infecção de cardiomiócitos por *Trypanosoma cruzi* in vitro. 134 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2011.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, 2010. 1388-1402.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. of Immunol.**, v.153, p.3135–3140, 1994.

RODRÍGUEZ, A.; RIOULT, M. G.; ORA, A.; ANDREWS, N. W. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J. Cell. Biol**, 129, 1995. 1263-1273.

SAMUDIO, M. et al. CYTOKINE RESPONSES IN *TRYPANOSOMA CRUZI*-INFECTED CHILDREN IN PARAGUAY. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58, 1998. 119–121.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, 2012. 1-13.

SAIRA, K.; ZHOU, Y.; JONES, C. The infected cell protein encoded by bovine herpesvirus 1 (1,ICPO) induces degradation of interferon response factor 3 (IKFj), and consequently inhibits beta interferon promoter activity. **Virology**, 2000 81: 3077-3086.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A. P. C. A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Potentiated by Activation of Bradykinin B2 Receptors. **J. Exp. Med.**, 192, novembro 2000. 1289–1299.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.; W., HART. G.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells.. **Cell**, 65, 1991. 1117-1125.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A. J.; HEISE, N.; CARDOSO-DE-ALMEIDA, M. L.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidas in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol. Mol Biochem Parasitol**, 59, 1993. 293-304.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase and Cell Invasion. **Parasitology Today**, 9, 1993. 218-222.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas.. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2000. p. 1-15.

SCHNAUFER, A.; PANIGRAHI, A. K.; PANICUCCI, B.; IGO Jr, R. P.; SALAVATI, R.; STUART, K. An RNA Ligase Essential for RNA Editing and Survival of the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei*.. **Science**, 291, 2001. 2159 – 2162.

SCLAFANI, R. A.; HOLZEN, T. M. Cell Cycle Regulation of DNA Replication. **Annu. Rev. Genet.**, 41, 2007. 237–280.

SCORZA, C.; SCORZA, J. V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, São Paulo, 14, 1972. 171–177.

SEKI, A.; FANG, G. CKAP2 Is a Spindle-associated Protein Degraded by APC/C-Cdh1 during Mitotic Exit. **The Journal of Biological Chemistry**, 282, 2007. 15103–15113.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49, 1995. 117-143.

SHARAN, R.; MARON-KATZ, A.; SHAMIR, R. CLICK and EXPANDER: a system for clustering and visualizing gene expression data. **Bioinformatics**, 19, 2003. 1787–1799.

SHIGIHARA, T; HASHIMOTO, M; SHINDO, N; AOKI, T. Transcriptome profile of *Trypanosoma cruzi*-infected cells: simultaneous up- and down regulation of proliferation inhibitors and promoters. **Parasitol Res**, 104, 2008. 715-722.

SILVA; NUSSENZWEIG. Infecção experimental do *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. **Rev Pat Trop**, 13, 1953. 1-7.

SILVEIRA, J. F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*.. In: ZIGMAN BRENER, Z. A. E. M. B.-N. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000. p. 127-152.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria.. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97, 2000. 6986-6993.

SKVORTSOV, T.A.; IGNATOV, D.V.; MAJOROV, K.B.; APT, A.S.; AZHIKINA, T.L. Mycobacterium tuberculosis Transcriptome Profiling in Mice with Genetically Different Susceptibility to Tuberculosis.. **Acta Naturae.**, 2013.

SOEIRO, M. N. C.; SILVA-FILHO, F. C.; MEIRELLES, M. N. L. Alterations in the surface charge of heart muscle cells during interaction with *T. cruzi*. **Cell Biophysics**, 26, 1995. 21-44.

STARK, THOMAS J.; ARNOLD, JUSTIN D.; SPECTOR, DEBORAH H.; YEO, GENE W. High-Resolution Profiling and Analysis of Viral and Host Small RNAs during Human Cytomegalovirus Infection. **J. Virol.**, 86, 2012. 226.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, 71, 1992. 1117-1130.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced Cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> Transients. **J. Exp. Med.**, 179, Março 1994. 1017-1022.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgrad Med J**, 82, 2006. 788-798.

TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of medical and biological**, 31, 1998. 1503-1516.

TIERNEY, L.; LINDE, J.; MÜLLER, S.; BRUNKE, S.; MOLINA, J.C.; HUBE, B.; SCHÖCK, U.; GUTHKE, R.; KUCHLER, K. An interspecies regulatory network inferred from simultaneous RNA-seq of *Candida albicans* invading innate immune cells. **Front Microbiol.**, 2012.

TODOROV, A.G.; EINICKER-LAMAS, M.; DE CASTRO, S.L.; OLIVEIRA, M.M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. **J Biol Chem**, 275, 2000. 32182–32186.

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, 110, 1995. 547-554.

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Rev Med Chile**, 139, 2011. 258-266.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacol Ther**, 117(2), 2008, 244-279.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, 31, Maio 2001. 472-481.

VAENA DE AVALOS, S; BLADER, I.J.; FISHER, M; BOOTHROYD, J.C; BURLEIGH, B.A. Immediate/Early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **J Biol Chem**, 277, 2002. 639-644.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. **Microbiological Reviews**, 59, Julho 1995. 223–240.

VANNUCCI, F. A.; FOSTER, D. N.; GEBHART, C. J. Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). **BMC Genomics.**, 2013.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, 36, 2003. 131–149.

VICTORIA, L.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J Exp Med**, 168, 1 Agosto 1988. 649–659.

WANG, E. RNA amplification for successful gene profiling analysis. **Journal of Translational Medicine.**, 3, 2005. 216-222.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for Transcriptomics. **Nature Reviews**, 10, 2009. 57-63.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, 10, 2009.

WEN, J. J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Radic. Biol. Med.**, 37, 2004. 1821–1833.

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **NATURE REVIEWS-MICROBIOLOGY**, 10, 2012. 618-630.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, 975, 2012.

WILHELM, B. T.; LANDRY, J.-R. RNA-Seq: quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. **Methods**, 48, 2009. 249–257.

WILKOWSKY, S.E.; BARBIERI, M.A.; STAHL, P.; ISOLA, E.L. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. **Exp Cell Res**, 264, 2001. 211-218.

WOODWARD, R.; GULL, K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.**, 95, 1990. 49–57.

WOOLSEY, A.M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C.A.; BRACHMANN, S.N.; CANTLEY, L.C.; BURLEIGH, B.A. Novel PI 3-kinase -dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J Cell Science**, 116, 2003. 3611-3622.

YANG, Z.; BRUNO, D.P.; MARTENS, C.A.; PORCELLA, S.F.; MOSS, B. Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. **Proc. Natl. Acad Sci**, 107, 2010. 11513-11518.

YAZAWA, T. et al. Simultaneous transcriptome analysis of Sorghum and *Bipolaris sorghicola* by using RNA-seq in combination with de novo transcriptome assembly. **PLoS One.**, 30, 2013.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais Acad. Bras. Ciências**, 78, 2006. 87-111.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, J. R. S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33, 2000. 269-278.

XIAO, W. Advances in NF- $\kappa$ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, 1, 2004. 425–433.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2009. 1051-1054.

ZWIERZYNSKI, T. A.; BUCK, G. A. RNA-protein complexes mediate in vitro capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings National Academy Sciences USA.**, 88, 1991. 5626-5630.