

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RITA DE CÁSSIA PONTELLO RAMPAZZO

Genômica funcional da infecção de cardiomiócitos por *Trypanosoma cruzi in vitro*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadores: Dr. Marco Aurélio Krieger
Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira

RIO DE JANEIRO

2011

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

R177

Rampazzo, Rita de Cássia Pontello.

Genômica funcional da infecção de cardiomiócitos por *Trypanosoma cruzi in vitro* / Rita de Cássia Pontello Rampazzo. – Rio de Janeiro, 2011.

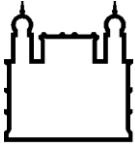
xiii, 206 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.

Bibliografia: f. 99-120

1. Transcritoma. 2. Miócitos Cardíacos . 3. Infecção. 4. *Trypanosoma cruzi*. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RITA DE CÁSSIA PONTELLO RAMPAZZO

Genômica funcional da infecção de cardiomiócitos por *Trypanosoma cruzi* in vitro

ORIENTADORES: Dr. Marco Aurélio Krieger
Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira

Examinada em: 29/08/2011

EXAMINADORES:

Dr. Milton Ozório Moraes- Presidente
Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg
Dra. Técia Maria Ulisses de Carvalho
Dr. Adeilton Alves Brandão
Dra. Myrna Cristina Bonaldo

Rio de Janeiro, 29 de agosto de 2011

À minha família; Emílio, Izilda, Ana Raquel, Camila e Júlio.

Ao meu amor, Pedro.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco Krieger, por quem tenho especial admiração, pelas oportunidades oferecidas. Nos momentos difíceis foi ímpar para manter o foco no trabalho transmitindo muita confiança e tranquilidade.

À Dra. Mirian Pereira, fundamental para a concretização deste trabalho, dedicada e incansável; uma nova amiga.

Ao Dr. Christian Probst, essencial para este trabalho; um grande amigo.

À Dra. Daniela Pavoni, parte da equipe do projeto e uma das melhores amigas que tenho.

Ao Dr. Stenio Fragoso mais um amigo especial e que além disso, incentivou minha formação.

Aos amigos do laboratório de Genômica que contribuíram diretamente com o trabalho especialmente Andreia Dalabonna, Paulo Arauco e Rafael Kessler. Além disso, Tahiana, Cheysa, Juliane, Henrique, Michel, Felipe, Eduardo, Ana, Newton, Fernanda, Bruno, Adriana, Camila, Maykol, Carla, Flávia, Josiane, Nicole.

Aos amigos Dr. Alejandro Correa, Dr. Bruno Dalagiovanna, Dra. Paola Celedon, Dr. Fabrício Marchini, Dra. Patricia Morking, Dra. Mariana Moretão, Flávia Morini e Tatiana Passos.

Ao apoio técnico e administrativo de Nilson, Vanessa, Tânia, Silvio, Maria Cristina, Edilaine, Luís, Vivielen e ainda toda a equipe do LUC.

À Diretoria do Instituto Carlos Chagas, especialmente Dr. Samuel Goldenberg, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

Ao Pedro, uma pessoa especial e amada, que me ajudou e teve extrema paciência nos momentos complicados que surgem no desenvolvimento e finalização da tese; aos seus pais Flávia e José que também me incentivaram.

À minha linda família, Emílio, Izilda, Ana Raquel, Camila, Júlio, que lutou para eu conseguisse chegar até aqui.

A Deus.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, acomete entre 7 e 8 milhões de pessoas especialmente na América Latina e Caribe, apresentando manifestações em órgãos associados ao sistema digestivo e cardíaco. A principal manifestação na fase crônica determinada é a cardiopatia chagásica e pode acometer entre 10 e 30% dos indivíduos infectados. Diante da ineficiência do tratamento, estudos com ênfase na biologia de interação parasita-hospedeiro têm sido desenvolvidos na busca de moléculas inovadoras que possam ser usadas para a prevenção, tratamento e/ou diagnóstico.

A aplicação da genômica funcional na interação *T. cruzi*-célula hospedeira tem como desafio desvendar a regulação de genes na célula alvo, buscando estratégias que enfoquem mecanismos de sobrevivência e replicação do parasita. A abordagem cinética utilizada neste trabalho (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas de infecção) para analisar a expressão gênica global através da metodologia inovadora de RNA-Seq proporcionou um melhor entendimento dos eventos que culminam na ativação coordenada e temporal de moléculas durante a interação *T. cruzi*-cardiomiócito. Identificamos 572 genes modulados, sendo que 371 apresentavam expressão gênica induzida e 201 reprimidos. Nossos resultados revelam que o *T. cruzi* induz uma modulação gênica dinâmica com 18 genes alterados após uma hora de interação. No estágio inicial da infecção (1 a 4 horas), os genes modulados encontram-se relacionados com a estratégia de invasão do parasita e, principalmente, com a resposta de cardiomiócitos induzindo genes relacionados à resposta imune e atividade tripanocida. Neste contexto, evidenciamos a ativação de genes envolvidos com a resposta pró-inflamatória, estresse oxidativo e metabolismo de radicais livres indicativos da tentativa da célula cardíaca de conter a disseminação do parasita. Com o avanço da infecção, constatamos a modulação de genes integrados com o remodelamento do citoesqueleto e rigidez celular, provavelmente associado com a acomodação do parasita intracelular, e ainda repressão de genes relacionados com junções celulares e manutenção da arquitetura celular. Distúrbios na expressão de genes envolvidos em vias metabólicas mitocondriais apontam para uma deficiência energética e disfunção mitocondrial induzida pelo *T. cruzi*. Destacamos ainda alterações em genes associados à hipertrofia, principalmente relacionados à IL1 e IL6, receptor toll-like 2 e GSK3B, desde os tempos iniciais de infecção (1 a 4 horas). O remodelamento associado à matriz extracelular apresentou genes com padrão diminuído principalmente no ponto de 24 horas quando a taxa de infecção ultrapassa 75%, sendo as alterações relacionadas aos genes de colágeno e fibronectina. Genes associados à apoptose com perfil pró- e anti-apoptótico foram diferencialmente modulados nas diferentes fases da infecção, sugerindo que a indução ou repressão da apoptose pode estar diretamente relacionada a dispersão do parasita, controle da carga parasitária no hospedeiro e/ou escape da resposta imune

Dessa forma, a identificação de genes importantes para adaptação do *T. cruzi* no microambiente da célula cardíaca aliada à modulação de genes envolvidos na resposta desta célula alvo contribuirá para aplicação de novas estratégias de controle deste parasita, possibilitando a seleção de potenciais alvos vacinais e/ou terapêuticos.

ABSTRACT

Chagas` disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects between 7 and 8 million people especially in Latin America and Caribbean, presenting manifestations in organs associated with the digestive system and heart. The main clinical manifestation on symptomatic chronic phase is chagasic cardiopathy and may affect about 10 to 30% of infected individuals. Given the ineffectiveness of the treatment, studies with emphasis on biology of host-pathogen interaction have been carried out to search innovative molecules that can be used to prevention, treatment and/or diagnosis.

The application of functional genomics in the *T. cruzi*-host cell interaction has as its goal to display the regulation of genes in the target cell, seeking strategies that focus on mechanisms of survival and replication of the parasite. The kinetic approach used on this research (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours of infection) to analyse the global gene expression by RNA-Seq, an innovative methodology, provide a better understanding of events that culminate in coordinated and temporal activation of molecules during *T. cruzi*-cardiomyocyte interaction. We identified 572 modulated genes, where 371 were induced and 201 repressed. Our results indicate that *T. cruzi* induces a dynamic gene modulation with 18 genes altered after one hour of interaction. On early stage of infection (1 to 4 hours), the modulated genes are related to immune response and trypanocidal activity. In this context, we observed the activation of genes involved in pro-inflammatory response, oxidative stress and free radical metabolism indicating that the cardiac cell attempts to control the dissemination of the parasite. With the progression of the infection, it was evident the modulation of genes involved in cytoskeleton remodeling and cell stiffness, probably associated with intracellular parasite accommodation and repression of cell junctions genes as well as cell architecture maintenance genes. Alterations in expression of genes involved in metabolic pathways point to a mitochondrial dysfunction and energy deficiency induced by *T. cruzi*. We also point out changes in genes associated with hypertrophy, mainly related to IL1, IL6, toll like receptor 2 and GSK3B from early times of infection (1 to 4 hours). Remodeling associated to extracellular matrix showed genes with decreased expression mainly at 24 hours when the infection exceeds 75%, specially collagen- and fibronectin-related genes. In addition, genes associated to apoptosis with pro- and anti- apoptotic activity were differentially modulated in different stages of infection, suggesting that induction or repression of apoptosis may be directly related to parasite spread, the parasite load control in the host and/or escape of immune response.

Thus, the identification of genes important to adaptation of *T. cruzi* on the microenviroment of the cardiac cell combined with modulation of genes involved in the response of the target cell will contribute to implementation of new strategies to control this parasite, allowing the selection of potential vaccine and/or therapeutic targets.

Lista de Figuras

Figura 1.1 Dados epidemiológicos relacionados à doença de Chagas.....	2
Figura 1.2 Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> e as principais manifestações da doença de Chagas.....	5
Figura 1.3 Modelo esquemático demonstrando as moléculas envolvidas no processo de interação <i>T. cruzi</i> -célula hospedeira	10
Figura 1.4 Bases para o método de Sequenciamento.....	22
Figura 1.5 Representação dos experimentos de RNA-Seq na plataforma SOLiD..	23
Figura 3.1 Eletroferograma modelo.....	27
Figura 3.2 RNA-Seq	29
Figura 3.3 PCR em emulsão.....	31
Figura 4.1. Perfil de infecção de culturas de cardiomiócitos durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> , clone Dm28c	36
Figura 4.2. Relação de parasitas intracelulares/100 células cardíacas em culturas primárias de cardiomiócitos durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i>	36
Figura 4.3 Perfil de infecção dos cardiomiócitos durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i> visualizado por microscopia de luz após coloração pelo Giemsa.....	37
Figura 4.4 Total de genes diferencialmente expressos (DEG) durante cinética de interação com <i>T. cruzi</i>	40
Figura 4.5 Representação gráfica da quantidade de genes diferencialmente expressos.....	40
Figura 4.6 Principais funções obtidas por GO durante a cinética de infecção	42
Figura 4.7 Padrão de Clusterização dos genes diferencialmente expressos.....	45
Figura 4.8 Representação gráfica dos clusters 12 e 18	46
Figura 4.9 Representação gráfica dos clusters 4 e 5	47
Figura 4.10 Representação gráfica do cluster 6.....	48
Figura 4.11 Representação gráfica do cluster 10.....	49
Figura 4.12 Representação gráfica dos clusters 16 e 17.	51
Figura 4.13 Representação gráfica dos clusters 23 e 24.	52
Figura 4.14 Representação gráfica dos clusters 15, 21 e 22.....	53
Figura 4.15 Representação gráfica dos clusters 7 e 8.	54
Figura 4.16 Representação gráfica dos clusters 1 e 2.	56
Figura 4.17 Representação gráfica dos clusters 13 e 14.	57

Figura 4.18 Representação gráfica do cluster 19.....	58
Figura 4.19 Representação gráfica do cluster 3.....	59
Figura 4.20 Representação gráfica do cluster 20.....	60
Figura 4.21 Representação gráfica do cluster 9.....	60
Figura 4.22 Representação esquemática da conexão entre as redes.....	62
Figura 4.23 Rede gênica 1.....	63
Figura 4.24 Rede gênica 2.....	64
Figura 4.25 Rede gênica 3.....	65
Figura 4.26 Rede gênica 4.....	66
Figura 4.27 Rede gênica 5.....	67
Figura 4.28 Rede gênica 6.....	68
Figura 4.29 Rede gênica 7.....	69
Figura 4.30 Rede gênica 8.....	70
Figura 4.31 Rede gênica 9.....	71
Figura 4.32 Rede gênica 10.....	72
Figura 4.33 Rede gênica 11.....	73
Figura 4.34 Rede gênica 12.....	74
Figura 4.35 Rede gênica 13.....	75
Figura 4.36 Rede gênica 14.....	76
Figura 4.37 Rede gênica 15.....	77
Figura 4.38 Rede gênica 16.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 Quantidade de RNA pós depleção de fração ribossomal (ng).	38
Tabela 4.2 Número inicial de transcritos diferencialmente expressos durante interação <i>T. cruzi</i> -cardiomiócito.	39

Lista de Abreviaturas

cDNA: DNA complementar

Dm: *Didelphis marsupialis*

DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxiribonucleosídeo trifosfato

dpi: dias pós-infecção

GO: *Gene Ontology*

C: cardiomiócitos não infectados

V: cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* clone Dm28c

SOLiD: *Sequencing by oligonucleotide ligation and detection*

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

FC: *fold-change*, razão de mudança

FDR: *false discovery rate*, taxa de descoberta falsa

g: aceleração da gravidade

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: reação em cadeia pela polimerase

RIN: índice de integridade do RNA

RNA: ácido ribonucléico

RNase: ribonuclease

rRNA: fração ribossomal de ácido ribonucléico

SFB: soro fetal bovino

L: *ladder*, marcador

SOM: *Self organizing map*, mapas auto-organizados

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
SUMÁRIO	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas – Generalidades.....	1
1.2 Agente etiológico, vetores e ciclo biológico	3
1.3 Doença de Chagas – Patologia e patogenia.....	5
1.4 Interação <i>T. cruzi</i> -célula hospedeira	8
1.4.1 Moléculas envolvidas no reconhecimento celular e invasão do <i>T. cruzi</i>	8
1.4.2 Mecanismo de invasão do <i>T. cruzi</i> e desenvolvimento intracelular	11
1.5 Alterações na célula hospedeira induzidas pelo <i>T. cruzi</i>	14
1.6 Avaliação em larga escala da interação <i>T. cruzi</i> -hospedeiro.....	16
1.7 Avaliação em larga escala de transcritomas: novas tecnologias	21
2 OBJETIVO GERAL	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Cultura primária de cardiomiócitos	25
3.2 Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de linhagem celular	26
3.3 Interação <i>T. cruzi</i> -cardiomiócitos	26
3.4 Extração de RNA total	26
3.5 Depleção de RNA ribossomal	28
3.6 RNA-Seq	28
3.6.1 Fragmentação do RNA do transcrito	28
3.6.2 Construção da biblioteca amplificada	28
3.6.3 Análise dos dados	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Preparação das amostras e sequenciamento	35
4.2 Quantidade de transcritos diferencialmente expressos	38
4.3 Agrupamento dos genes	44
4.3.1 Clusters 12 e 18	45

4.3.2	Clusters 4 e 5	47
4.3.3	Cluster 6	48
4.3.4	Clusters 10 e 11	49
4.3.5	Clusters 16 e 17	50
4.3.6	Clusters 23 e 24	52
4.3.7	Clusters 15, 21 e 22	53
4.3.8	Clusters 7 e 8	53
4.3.9	Clusters 1 e 2	55
4.3.10	Clusters 13 e 14	57
4.3.11	Cluster 19	58
4.3.12	Cluster 3	59
4.3.13	Cluster 20	60
4.3.14	Cluster 9	60
4.3.15	Análise integrada de clusters	61
4.4	Redes gênicas selecionadas no ponto de 24 horas pós-infecção.	61
4.4.1	Rede gênica 1	63
4.4.2	Rede gênica 2	64
4.4.3	Rede gênica 3	65
4.4.4	Rede gênica 4	66
4.4.5	Rede gênica 5	67
4.4.6	Rede gênica 6	68
4.4.7	Rede gênica 7	69
4.4.8	Rede gênica 8	70
4.4.9	Rede gênica 9	71
4.4.10	Rede gênica 10	72
4.4.11	Rede gênica 11	73
4.4.12	Rede gênica 12	74
4.4.13	Rede gênica 13	75
4.4.14	Rede gênica 14	76
4.4.15	Rede gênica 15	77
4.4.16	Rede gênica 16	78
5	DISCUSSÃO	79
5.1	Modulação de genes da resposta imune induzidos pelo <i>T. cruzi</i>	81
5.2	Alterações associadas à apoptose	86
5.3	Alterações na expressão de genes envolvidos com a dinâmica do citoesqueleto.....	89

5.4	Alterações associadas à hipertrofia e matriz extracelular	92
5.5	Efeito da infecção na expressão de genes mitocondriais	94
6	CONCLUSÕES	97
7	PERSPECTIVAS	98
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
9	ANEXOS	121
9.1	Artigos publicados	121
9.1.1	Infection and Immunity: <i>Trypanosoma cruzi</i> infection induces a global host cell response in cardiomyocytes.	121
9.1.2	Molecular and Biochemical Parasitology: Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein (KAP3) in <i>Trypanosoma cruzi</i> : Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation.	121
9.2	Artigos submetidos	121
9.2.1	FEMS Microbiology Letters: The zinc finger TcZFP2 regulates the abundance of its target mRNAs during <i>Trypanosoma cruzi</i> metacyclogenesis.	121
9.2.2	PLoS ONE: Profiling the <i>Trypanosoma cruzi</i> phosphoproteome.	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas – Generalidades

As doenças tropicais negligenciadas são as principais causas de infecções em populações pobres da América Latina e Caribe, onde 40% do total de indivíduos vivem abaixo da linha de pobreza. Os dados de prevalência destas doenças associados à perda de anos de vida por incapacidade destacam as doenças provocadas por helmintos, seguidas por doença de Chagas, dengue, esquistossomose, filariose, tracoma e hanseníase como as mais relevantes. Quando somadas, estas condições de doença representam dados alarmantes e podem ser mais frequentes que HIV/AIDS, tuberculose ou malária (Hotez *et al.*, 2008).

A doença de Chagas foi descrita ocasionalmente no início do século XX pelo médico brasileiro Carlos Chagas em Minas Gerais, cidade de Lassance, durante uma campanha de combate à malária. A grande quantidade de insetos hematófagos que habitavam as frestas das casas de pau-a-pique e se alimentavam de sangue humano e animais domésticos durante a noite despertaram a curiosidade deste médico sanitarista que, em 1907, ao examinar o conteúdo intestinal destes insetos, identificou formas flageladas semelhantes a *Crithidia* (Chagas, 1909). Assim, iniciavam-se os trabalhos que culminariam no fato inédito da medicina em que Carlos Chagas descreve, em 1909, o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*; o ciclo evolutivo, os vetores e reservatórios e as complicações mais frequentes da doença (Chagas, 1909).

Atualmente, sabe-se que a doença de Chagas estava presente no Brasil mesmo antes da colonização europeia. Os estudos de Fernandes e colaboradores (2008) identificaram em uma múmia com idade entre 520 e 600 anos material genético de *T. cruzi* e sinais característicos de megacólon. A dispersão da infecção pelo *T. cruzi* em civilizações antigas estava relacionada com a biologia do agente etiológico e seu vetor, o meio ambiente, a biologia e comportamento humano interferindo no ciclo silvestre através da invasão de ecótopos naturais (Aufderheide, 2003). Este cenário de prevalência da infecção natural na América Latina ainda é destaque entre os diferentes mecanismos de transmissão, sendo responsável por 80 a 90% dos casos, seguido da infecção por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (5 a 20% dos casos), transmissão congênita (0,5 a 8% dos casos), acidentes de laboratório e infecção via oral (revisto Schmuñis, 2000; revisto por Dias, 2000; revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010). Outra possível forma de transmissão relaciona-se à partilha de agulhas; entretanto, os dados

quantitativos desse modo de infecção ainda não foram estabelecidos e os casos detectados são pouco frequentes (Auger *et al.*, 2005; Nijar e Del Bigio, 2007).

Com relação à epidemiologia da doença (Figura 1.1), os dados de prevalência na década de 1980 indicavam entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* na América Latina (WHO, 2000) e 100 milhões de indivíduos sob risco de contaminação (25% da população dessa área) (WHO, 2002). Em 2005, a Organização Pan Americana de Saúde, após várias iniciativas como o controle de vetores e triagem sorológica para *T. cruzi* em bancos de sangue, divulgou resultados surpreendentes e promissores apresentando decréscimo no número de indivíduos infectados para 7 a 8 milhões e, conseqüentemente, redução da população em área de risco para 20% (revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010).

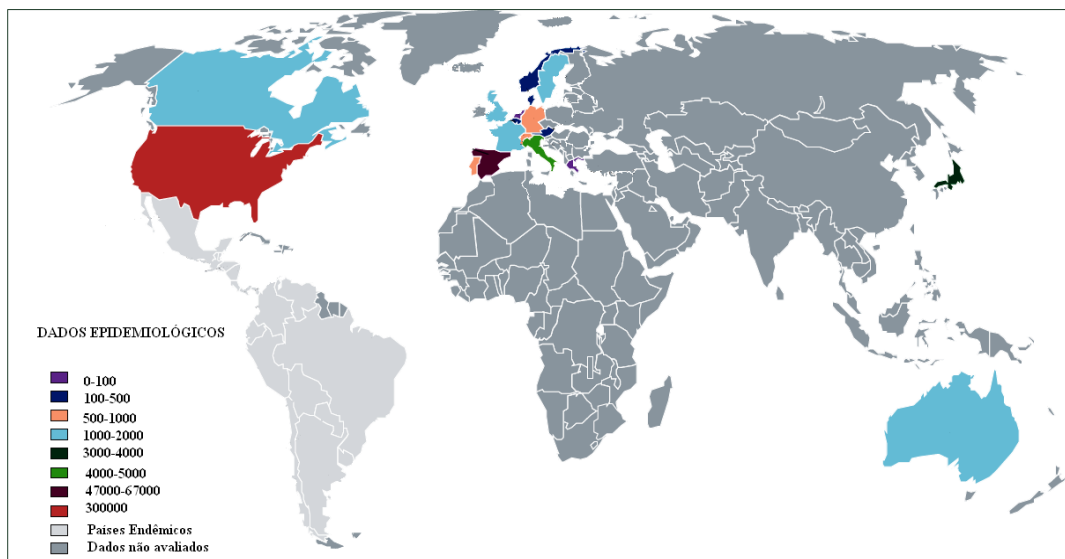


Figura 1.1 Dados epidemiológicos relacionados à doença de Chagas. Países endêmicos e número de indivíduos infectados em áreas não endêmicas (modificado de Rassi e Marin Neto, 2010).

Essas medidas de prevenção diminuíram significativamente o número de novos casos detectados. Em 1983, a taxa de novos casos alcançou 700.000, em 2000 cerca de 200.000 e em 2006 o número registrado atingiu 41.200; o mesmo pode ser verificado com o índice de mortes por ano, aproximadamente 50.000, em 1990 e 12.500 em 2006 (Moncayo *et al.*, 2009). No Brasil, o custo-benefício do programa de controle de vetores demonstra que para cada dólar investido na prevenção há uma economia de 17 dólares usados em cuidados médicos e aposentadorias precoces (Moncayo *et al.*, 2009).

O conjunto de cuidados relacionados à prevenção proporcionou resultados bastante animadores nas áreas endêmicas, entretanto surtos de casos agudos de doença de Chagas por

infecção oral vêm ocorrendo em diferentes regiões do Brasil (Coura, 2006; Nóbrega *et al.*, 2009) e chamam a atenção de pesquisadores e autoridades governamentais. Além disso, devido aos fenômenos migratórios, o número de indivíduos infectados vivendo em áreas não endêmicas, como os Estados Unidos, Canadá e partes da Europa, Japão e Austrália vêm aumentando (Figura 1.1) e constitui um novo problema de saúde pública para essas regiões (Florian Sanz *et al.*, 2005; Kirchhoff *et al.*, 2006; Nowicki *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2008; Gascon *et al.*, 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010, Parker e Sethi, 2011).

Apesar dos esforços realizados por pesquisadores, ainda permanece a busca por compostos ativos para o tratamento das diferentes fases da doença de Chagas. Os compostos utilizados na clínica, como benzonidazol, são efetivos apenas na fase aguda e apresentam fortes reações adversas (Coura e Castro, 2002). Os avanços em quimioterapia, vacina e diagnóstico só poderão ser obtidos através de conhecimento aprofundado em aspectos celulares peculiares de *T. cruzi* como processos biológicos, estruturas e organelas e, ainda, o entendimento da dinâmica de eventos biológicos da interação parasita-célula hospedeira (de Souza, 2002 e Urbina e Docampo, 2003).

1.2 Agente etiológico, vetores e ciclo biológico

O *T. cruzi* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (Levine *et al.*, 1980). Algumas particularidades dos membros da família Trypanosomatidae relacionam-se à presença de cinetoplasto, que consiste em um compartimento especializado de uma única mitocôndria e contém grande quantidade de DNA, denominado kDNA (Maslov e Simpson, 1995), compartimentalização da via glicolítica em glicossomas (Opperdoes, 1995) e ainda um único flagelo. Em relação ao genoma de *T. cruzi*, a cepa CL Brener foi submetida ao sequenciamento e revelou aproximadamente 22.570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12.570 representam pares alélicos e ainda 50% desse total sendo representado por regiões repetitivas compostas principalmente por retrotransposons e genes que codificam grandes famílias de proteínas de superfície (El Sayed *et al.*, 2005).

Os vetores, vulgarmente conhecidos como barbeiros, por picarem frequentemente a face dos indivíduos, apresentam classificação sistemática na família Reduviidae, sub-família Triatominae. Entre os vetores existem pelo menos 130 espécies potenciais (revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010), sendo *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens* e *Panstrongylus megistus* as espécies de maior importância epidemiológica. O

maior grau de adaptação às regiões domiciliares e peridomiciliares é atribuído a *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *Rhodnius prolixus* (WHO, 2007).

O ciclo biológico, inicialmente caracterizado por Carlos Chagas em 1909, foi revisto por uma série de pesquisadores (Chagas, 1909; Brener, 1973; Tanowitz *et al.*, 1992a; Burleigh e Andrews, 1995a; Tyler e Engman, 2001; Andrade e Andrews, 2005) e está representado na Figura 1.2, sendo bastante complexo, com o parasita se apresentando sob diferentes formas nos hospedeiros invertebrados (insetos vetores) e nos hospedeiros vertebrados (mamíferos). Durante o ciclo de vida observa-se diferenças morfológicas ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas onde os tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos apresentam-se como formas infectivas clássicas e não proliferativas e os epimastigotas e amastigotas (formas infectivas não clássicas) como formas proliferativas (Brener, 1973; revisto por Tanowitz *et al.*, 1992a; Zeledon, 1999; revisto por Tyler e Engman, 2001). No hospedeiro mamífero, onde a doença pode realmente se estabelecer, uma série de alterações fisiológicas foram evidenciadas enquanto no inseto vetor nenhum tipo de dano foi ainda observado (revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010).

A infecção natural pelo *T. cruzi* ocorre através da liberação de formas tripomastigotas metacíclicas nos excretas do triatomíneo infectado durante o repasto sanguíneo. Essas formas não rompem a pele íntegra e apenas podem penetrar através de lesões, normalmente o próprio local da picada ou ainda mucosas, e assim, conseguem atingir a corrente sanguínea onde infectam células do sistema fagocítico mononuclear e/ou diferentes tecidos. Detalhes do processo de invasão e desenvolvimento intracelular serão apresentados posteriormente.

As etapas do ciclo biológico no trato digestivo dos triatomíneos infectados iniciam-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas que se diferenciam em epimastigotas e, no intestino médio dos triatomíneos, iniciam o processo de divisão celular. Ao término das multiplicações por fissão binária, as formas epimastigotas migram para a porção posterior do intestino e ocorre a transformação em tripomastigotas metacíclicos que são liberadas juntamente com os excretas do inseto. Assim, após em média 3 a 4 semanas, a fase do ciclo no inseto se finaliza, permitindo que as formas infectivas sejam transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo biológico.

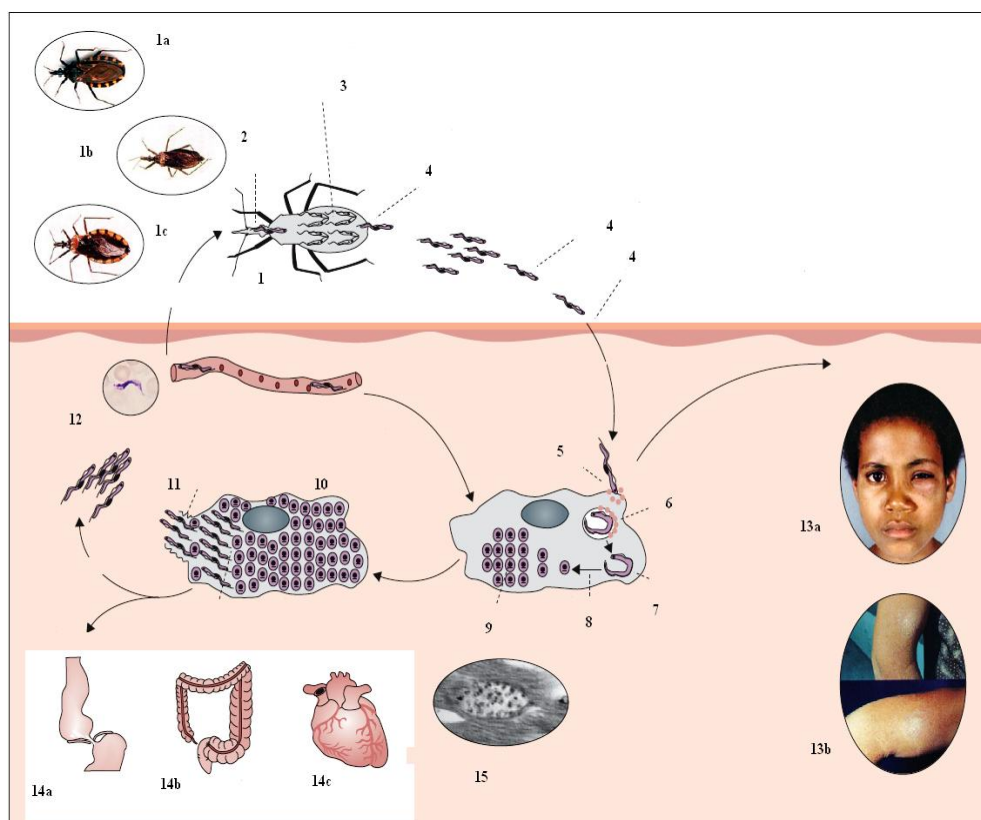


Figura 1.2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi* e as principais manifestações da doença de Chagas. Hospedeiro invertebrado: 1- inseto vetor triatomíneo, 1a *Triatoma infestans*, 1b *Rhodnius prolixus*, 1c *Triatoma dimidiata*, 2- ingestão de tripomastigotas sanguíneos, 3- epimastigotas em divisão, 4- tripomastigotas metacíclicos; Hospedeiro vertebrado: 5- tripomastigotas metacíclicos aderindo às células de mamífero, 6- tripomastigotas metacíclicos no vacúolo parasitóforo, 7- liberação de formas tripomastigotas e término da transformação para amastigotas, 8- formas amastigotas, 9- amastigotas em divisão, 10- fim dos ciclos de divisão e início da diferenciação para formas tripomastigotas, 11- rompimento da célula e liberação de formas tripomastigotas, 12- formas tripomastigotas podendo infectar novas células ou insetos vetores durante o repasto sanguíneo. Manifestações patológicas: Fase aguda 13a Sinal de Romaña, 13b Chagoma de inoculação; Fase crônica 14a megaesôfago, 14b megacólon, 14c cardiopatia, 15 miofibrila com células repletas de amastigotas (Modificado de Rassi e Marin Neto, 2010).

1.3 Doença de Chagas – Patologia e patogenia

Uma grande variedade de células pode ser infectada pelo *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* com tropismo definido para células musculares (Brenner, 1973; Cabrine-Santos *et al.*, 2001; Vera-Cruz *et al.*, 2003). Essa relação de tropismo se torna ainda mais evidente quando se analisa a diversidade genética da população desse parasita e se consegue relacionar uma determinada cepa com disfunções em órgãos específicos do hospedeiro mamífero, como o coração, intestino e esôfago (Vago *et al.*, 2000) (Figura 1.2).

A doença pode ser dividida em fases aguda e crônica e suas características, assim como a evolução, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi*, como cepa, virulência e tamanho do inóculo; ao homem, como idade, sexo e provavelmente raça; e ao ambiente

(revisto por Dias, 2000). As lesões provocadas em cada fase podem variar, mas é importante ressaltar que estas disfunções apresentam uma relação direta com a persistência dos parasitas nos órgãos afetados (Elizari 1999; Zhang e Tarleton, 1999; Lages-Silva *et al.*, 2001; revisto por Gutierrez *et al.*, 2009).

O curso da doença se inicia com a infecção e progride para a fase aguda, normalmente assintomática. Quando sintomática, caracteriza-se inicialmente por uma reação inflamatória focal no sítio de entrada do parasita, conhecida como chagoma de inoculação, ou sinal de Romana quando a lesão inflamatória é decorrente da infecção ocular (Romana, 1935) (Figura 1.2). Em poucos dias, podem ser detectados a presença de imunocomplexos, parasitemia elevada, diminuição do nível do fator C3 do complemento, hepato e esplenomegalia, além de necrose no foco inflamatório, fenômenos de agregação plaquetária, degranulação de eosinófilos, edema, trombose, estase sanguínea, isquemia e febre. As manifestações mais graves relacionam-se à meningoencefalite e miocardite e acontecem em número reduzido de pacientes (Shikanai-Yasuda *et al.* 1990; Prata, 2001) Embora casos clínicos graves tenham sido relatados na fase aguda, esta fase normalmente se resolve espontaneamente dentro de 2 a 4 meses e a taxa de mortalidade não excede 5% dos casos (revisto por Tanowitz *et al.*, 1992a; Andrade, 1999; revisto por Rassi *et al.*, 2000; revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010).

Em seguida, a doença evolui para a fase crônica, sendo evidenciada drástica diminuição de parasitemia e resposta imunológica caracterizada pela redução dos níveis de IgM e aumento de IgG. A evolução dessa fase é lenta podendo durar toda a vida do indivíduo, sendo que a maioria permanece assintomática (forma crônica indeterminada) e apenas cerca de 30% desenvolvem os sintomas característicos, predominantemente cardíacos, digestivos ou neurológicos (forma crônica determinada) (revisto por Tanowitz *et al.*, 1992a; revisto por Dias, 2000).

O comprometimento cardíaco caracteriza-se como a manifestação mais grave e frequente na fase crônica da doença, tipicamente após anos ou décadas de infecção. Nas áreas endêmicas da América Latina, a cardiopatia chagásica pode ser considerada a principal causa de morte associada a problemas cardíacos em pacientes na faixa etária entre 30 e 50 anos (Rassi *et al.*, 2000). O mecanismo consenso para o estabelecimento da cardiopatia não se encontra totalmente elucidado e acredita-se que a persistência do parasita e a resposta imunológica dirigida ao *T. cruzi* sejam eventos-chave (revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010). No entanto, a prevalência de auto-anticorpos em doenças cardíacas (Nussinovitch e Shoenfeld, 2011a; Nussinovitch e Shoenfeld 2011b) reforça o mecanismo de autoimunidade

na cardiopatia chagásica crônica (Bonney e Engman 2008), sugerindo que múltiplos mecanismos atuam na complexa cardiopatia de etiologia chagásica (Gironès e Fresno 2003). A manifestação cardíaca crônica pode ser caracterizada por uma reação inflamatória focal, multifocal ou difusa composta por células linfomononucleares que produzem uma destruição progressiva das fibras cardíacas associada a uma fibrose reparativa afetando múltiplas áreas. O sistema nervoso parassimpático e o condutivo estão envolvidos e comprometidos produzindo bloqueios do tipo intraventricular e atrioventricular e disfunção do nóculo sinusal além de arritmias ventriculares (Rassi *et al.*, 2000; Rassi e Marin-Neto, 2010). A fibrose miocárdica focal apresenta-se como o substrato anatômico para as arritmias ventriculares e/ou atriais, predispõe à dilatação cardíaca e falência além de formação de aneurismas no ventrículo esquerdo, uma característica da doença cardíaca chagásica (Rassi *et al.*, 2000).

A persistência e liberação do parasita não contribuem apenas com a destruição direta dos cardiomiócitos e com a manutenção do processo inflamatório, mas também induzindo de forma indireta outros mecanismos adicionais para o dano cardíaco como as anormalidades microvasculares coronarianas, microtrombos, espasmos microvasculares e disfunções endoteliais que já foram reportados tanto em modelos animais quanto em humanos (Rassi e Marin Neto, 2010). As três maiores síndromes desse tipo de cardiopatia, que inclusive podem coexistir em um mesmo paciente, são a disarritmia, falência e tromboembolismo (sistêmico e pulmonar) (revisto por Rassi *et al.*, 2000; revisto por Rassi e Marin-Neto, 2010).

As manifestações gastrointestinais da doença de Chagas estão principalmente relacionadas às lesões de sistema nervoso entérico, principalmente nos plexos mioentérico (plexo de Auerbach) e submucoso (plexo de Meissner) e também às lesões pré-ganglionares e redução no número de células dorsais do vago. Essas podem ocorrer desde as glândulas salivares, esôfago, esfíncteres, estômago, intestino delgado, cólon, vesícula biliar sendo que os órgãos mais frequentemente acometidos são o esôfago (megaesôfago) e parte do intestino grosso, o cólon (megacólon) (Tanowitz *et al.*, 1992a; revisto por Matsuda *et al.*, 2009). O megaesôfago caracteriza-se por comprometimento do esôfago e de seu esfíncter inferior, com o paciente apresentando extrema dificuldade para engolir (acalasia chagásica), manifestação caracterizada principalmente por diminuição da pressão no esfíncter enquanto o megacólon caracteriza-se principalmente por constipação (fecaloma) procedente de alterações no reflexo reto-anal (revisto por Matsuda *et al.*, 2009).

O comprometimento do sistema nervoso central é pouco comum e acontece em casos associados à reativação da doença em estados de imunodeficiência (AIDS, neoplasias

hematológicas, transplantes de rins ou coração, terapia com corticosteróides, etc). O quadro de encefalite na forma crônica difere da apresentada na aguda por apresentar um caráter necrotizante com alguns pacientes inclusive apresentando a forma tumoral com lesões hemorrágicas necróticas únicas ou múltiplas (revisto por Pitella, 1993; Cordova *et al.*, 2008).

1.4 Interação *T. cruzi*-célula hospedeira

O estabelecimento da infecção em hospedeiros vertebrados é uma etapa fundamental para que o *T. cruzi* complete seu ciclo biológico. Monteón e colaboradores (1996) demonstraram que as formas tripomastigotas metacíclicas durante a infecção primária penetram em macrófagos, fibroblastos e outros tecidos mesenquimais e, em seguida, através da disseminação hematogênica, ocorre infecção de tecidos mais distantes de acordo com o tropismo do parasita. O processo de infecção se inicia com a adesão de formas infectivas à célula hospedeira e ativação de vias de sinalização tanto no parasita quanto na célula alvo seguidas de interiorização, liberação dos parasitas do vacúolo parasitóforo, diferenciação em formas amastigotas, multiplicação no citoplasma, rediferenciação às formas tripomastigotas, rompimento da célula hospedeira e liberação de tripomastigotas (revisto por Yoshida, 2006).

*1.4.1 Moléculas envolvidas no reconhecimento celular e invasão do *T. cruzi**

A adesão de formas infectivas de *T. cruzi* à célula hospedeira é uma etapa crucial para o estabelecimento da infecção, sendo mediada pelo reconhecimento de ligantes e/ou receptores presentes na superfície de células hospedeiras e do parasita (Figura 1.3) (Epting *et al.*, 2010). Considerando-se o parasita, estudos revelaram que uma porcentagem significativa do genoma do *T. cruzi* codifica proteínas envolvidas com o processo de reconhecimento e adesão à célula hospedeira (El Sayed *et al.*, 2005). Entre as mais bem estudadas se incluem as famílias protéicas associadas à superfície celular, como as mucinas (Di Noia *et al.*, 1998) e as trans-sialidases (Schenkman *et al.*, 1991; Schenkman *et al.*, 1992; Schenkman e Eichinger 1993; Schenkman *et al.*, 1993), ambas ancoradas à superfície celular através de resíduos de glicosilfosfatidilinositol.

As mucinas, um grupo de proteínas ricas em treonina, serina e prolina, são representadas no genoma de *T. cruzi* com pelo menos 863 genes e são aceptores de ácido siálico, podendo exercer outras funções dependendo da forma apresentada pelo parasita (Di Noia *et al.*, 1998; El Sayed *et al.*, 2005). Baseados na expressão sincronizada de diferentes conjuntos durante o ciclo de vida, essas são divididas em dois grupos, um presente nas formas que se desenvolvem no vetor e o segundo nas que se desenvolvem no hospedeiro mamífero

(Di Noia *et al.*, 1998; Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Especificamente, em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos estão presentes o conjunto denominado gp35/50 que são resistentes à ação de proteases e favorecem o desenvolvimento dessas formas no trato digestivo de insetos vetores, onde as enzimas com atividade proteolítica são bastante abundantes. Além da função de proteção descrita anteriormente, nas formas metacíclicas este conjunto também se relaciona à adesão e sinalização com mobilização de cálcio durante o processo de interação com a célula hospedeira (Mortara *et al.*, 1992; Schenkman *et al.*, 1993; Villalta *et al.*, 2008). Nas formas presentes no hospedeiro mamífero, o conjunto de mucinas expressas têm entre 60/70-200 kDa, são susceptíveis à ação de proteases e estão fortemente envolvidas com a adesão à célula hospedeira (Schenkman *et al.*, 1991; Di Noia *et al.*, 1998).

As trans-sialidases pertencem à várias famílias multigênicas, sendo conhecidas como superfamília gp85/trans-sialidase (Araya *et al.*, 1994 Colli e Alves, 1999; El Sayed *et al.*, 2005), apresentam a função característica de transferir ácido siálico de glicoconjugados presentes no hospedeiro para o parasita, onde os aceptores mais comuns são as mucinas. Entretanto, essa superfamília que engloba proteínas de peso molecular entre 75 e 280 kDa apresenta diversos membros que não possuem atividade enzimática, os quais são importantes no processo de invasão, como a Tc85, em tripomastigotas sanguíneos, e a gp82, em metacíclicos (revisto por Alves e Colli, 2007).

Além das moléculas presentes nas diferentes formas do parasita descritas anteriormente, o processo de adesão e reconhecimento pode ser facilitado por enzimas proteolíticas, incluindo TC80 (Santana *et al.*, 1997; Grellier *et al.*, 2001), cruzipaína (Cazzulo *et al.*, 1990) e oligopeptidases B (Burleigh e Andrews 1995b), por outras proteínas como gp83 (Villalta *et al.*, 2008), penetrina (Ortega-Barria e Pereira, 1991; Oliveira Jr *et al.*, 2008) e também por esteróis (Fernandes *et al.*, 2007). As enzimas proteolíticas do parasita, com destaque para uma prolil-oligopeptidase com 80 kDa, especificamente secretada por formas tripomastigotas, são liberadas através da bolsa flagelar e agem na degradação de componentes da membrana plasmática da célula hospedeira e também em componentes da matriz extracelular, apresentando especificidade para degradar colágeno do tipo I e IV, além de, fibronectina (Santana *et al.*, 1997; Grellier *et al.*, 2001).

Na superfície de tripomastigotas, proteínas com propriedade de ligação à heparina foram identificadas e se relacionam com o processo de infecção por apresentarem características adesivas de ligação ao colágeno, heparan sulfato e heparina (Ortega-Barria e Pereira 1991; Calvet *et al.*, 2003; Oliveira-Jr *et al.*, 2008). Ainda, os esteróis presentes na

membrana do parasita apresentam relação com o processo infectivo de maneira forma-específica; estudos usando o tratamento de formas tripomastigotas metacíclicas e amastigotas depletadas com metil- β -ciclodextrina (M β CD) demonstraram que apenas em tripomastigotas metacíclicas a taxa de infecção apresentava-se significativamente diminuída na condição descrita (Fernandes *et al.*, 2007).

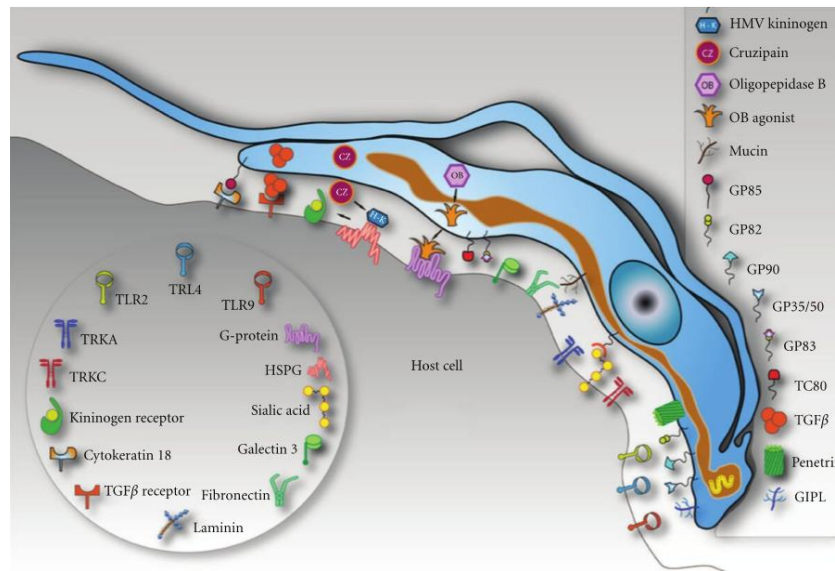


Figura 1.3 Modelo esquemático demonstrando as moléculas envolvidas no processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira (de Souza *et al.*, 2010).

Com relação às células de mamíferos, uma variedade de moléculas na superfície celular foi descrita como moduladoras do processo de reconhecimento e invasão do *T. cruzi*. Dentre os receptores e ligantes relevantes neste processo destacamos (i) integrinas, cujo papel foi demonstrado pela redução da infecção de macrófagos após bloqueio de beta1 (VLA) integrina (Fernández *et al.* 1993), (ii) colesterol, presentes em domínios especializados de membrana (“lipid rafts”), cujo bloqueio reduziu a invasão do *T. cruzi* em células Vero, HeLa (Fernandes *et al.*, 2007) e macrófagos (Barrias *et al.*, 2007), (iii) carboidratos presentes na superfície celular, sendo evidenciado a participação de resíduos de galactose, manose e N-acetil glicosamina (Barbosa e Meirelles 1992) e (iv) componentes de matriz extracelular, incluindo proteoglicanos de heparan sulfato, fibronectina e colágeno (Ortega-Barria e Pereira 1991; Calvet *et al.*, 2003, 2004; Oliveira Jr *et al.*, 2008). Assim, a interação de ligantes e receptores da superfície da célula hospedeira e do parasita dispara cascatas de sinalização bidirecionais (hospedeiro e parasita) que iniciarão o processo de interiorização através de diferentes mecanismos (Epting *et al.*, 2010).

1.4.2 Mecanismo de invasão do *T. cruzi* e desenvolvimento intracelular

Embora as várias fases do processo de invasão por *T. cruzi* tenham sido alvo de intensa investigação nas últimas décadas, dados sobre o mecanismo completo ainda são controversos. Em relação à fase de interiorização foram descritos mecanismos independentes ou dependentes do citoesqueleto da célula alvo, incluindo penetração ativa, endocitose, exocitose ativa de lisossomos e ativação de tirosina quinase (IP3-quinase). No entanto, o mecanismo disparado durante o processo de invasão parece ser dependente da forma evolutiva e genótipo do parasita, assim como, o tipo celular (Barbosa 1999; revisto por de Souza *et al.*, 2010).

Neste contexto, ressaltaremos a seguir alguns pontos importantes da dinâmica do processo de invasão e os diferentes mecanismos reportados. Os trabalhos iniciais de Dvorak (1975) sugeriam que as formas tripomastigotas invadiam ativamente através do rompimento localizado da membrana plasmática da célula hospedeira. No entanto, evidências da localização do parasita intracelular em compartimentos envoltos por membrana, vacúolo parasitóforo, foram determinantes para o questionamento da penetração ativa, favorecendo a aceitação de um processo endocítico (Meirelles *et al.*, 1987). A prevalência do mecanismo de invasão por endocitose foi confirmada por ensaios de infecção em macrófagos e células musculares (cardíacas e esqueléticas) com diferentes formas do parasita, onde o processo iniciava-se com a adesão seguida de interiorização de maneira fagocítica clássica em macrófagos e endocítica nas células musculares, com formação do vacúolo parasitóforo e fusão com lisossomos (Araújo-Jorge *et al.*, 1992).

Ainda em 1992, a importância da penetração ativa como mecanismo de invasão foi retomada por Schenkman e Mortara (1992) baseado no fato de que citocalasina D, inibidor da polimerização de actina, ser incapaz de prevenir a invasão do *T. cruzi* em células HeLa. Em seguida, Tardieux e colaboradores (1992) descreveram um mecanismo de infecção em células não fagocíticas independente de actina através de exocitose ativa de lisossomos no sítio de adesão do parasita, culminando com a internalização e formação do vacúolo parasitóforo. Nos estudos subsequentes do grupo demonstrou-se que na célula do hospedeiro mamífero o processo é dependente do aumento da concentração de cálcio e também de AMP cíclico disparados pelo parasita (Burleigh e Andrews, 1998; Rodríguez, 1999; revisto por Andrews, 2002). A oligopeptidase B, uma proteína com 120 kDa expressa em todas as formas do ciclo biológico do parasita e localizada no citoplasma, relaciona-se com este processo de sinalização de maneira forma dependente. Em experimentos onde se inibiu a atividade enzimática ou ainda realizou-se a deleção do gene de cópia única a taxa de infecção e a

concentração de cálcio apresentaram-se diminuídas apenas com tripomastigota derivado de cultivo celular. A partir do conjunto de experimentos realizados a enzima pode ser classificada como possível ativadora de uma via agonista de cálcio, pois durante o tratamento de células de mamífero com a proteína purificada o processo de sinalização não foi ativado, indicando o requerimento de outros compostos para mediar o evento (Burleigh e Andrews, 1995b; Burleigh *et al.*, 1997; Burleigh e Andrews, 1998; Caler *et al.*, 1998).

As cascatas de sinalização ativadas durante a interação de tripomastigotas metacíclicos ou tripomastiotas derivados de cultivo celular com a célula hospedeira culminam com a mobilização intracelular de cálcio tanto no parasita quanto na célula hospedeira (Docampo *et al.*, 1996; Burleigh e Andrews, 1998; Burleigh e Woolsey, 2002; revisto por Yoshida 2006). Entretanto, é importante ressaltar que entre as moléculas envolvidas nesse processo, diferenças são evidentes entre cepas distintas de *T. cruzi* e também entre as formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultivo) de uma mesma cepa (revisto por Yoshida, 2006; Yoshida e Cortez, 2008). Os tripomastigotas metacíclicos de cepas de *T. cruzi* com alta capacidade infectante, como a cepa CL, invadem células não fagocíticas de maneira gp82-dependente (Ramirez *et al.*, 1993; revisto por Yoshida, 2006). Essa proteína induz a ativação de uma tirosina-quinase que fosforila outra proteína, denominada p175. Dessa via de transdução de sinal participa também a fosfolipase C, que gera IP3 (Yoshida *et al.*, 2000), sendo o cálcio liberado oriundo do retículo endoplasmático. A sinalização de cálcio disparada por gp82 induz um mecanismo de invasão independente do citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 2006). O envolvimento de gp82 no remodelamento do citoesqueleto da célula hospedeira foi demonstrado por ensaios com a proteína recombinante que tem a capacidade de se ligar à célula hospedeira de uma maneira indistinguível da proteína nativa (Cortez *et al.*, 2006).

As formas metacíclicas de cepas de *T. cruzi* pouco infectantes, como a cepa G, utilizam as glicoproteínas do tipo mucina para adesão e invasão celular. Neste processo, a resposta mediada por cálcio, induzida especificamente por gp35/50, é dependente de uma adenil ciclase que gera AMP cíclico, sendo que o cálcio, requerido para a invasão, é liberado dos acidocalcissomas (Neira *et al.*, 2002; revisto por Yoshida, 2006). Interessantemente, o sinal de cálcio é menor que o induzido por gp82 (Yoshida *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1993; revisto por Yoshida 2006) e o mecanismo de invasão é dependente do citoesqueleto da célula alvo. Ainda, tripomastigotas metacíclicos secretam SAPs, proteína com massa molecular de 55 kDa que relacionam-se com a mobilização intracelular de cálcio, apresentando-se como um fator adicional para a mobilização desse íon de maneira cepa-dependente. Cepas pouco infectantes,

como a cepa G, apresentam baixa expressão dessas proteínas enquanto que cepas com alta infectividade, como a cepa CL, apresentam alta expressão (Baida *et al.*, 2006).

Além das moléculas anteriormente descritas no processo de sinalização, destaca-se também a interação entre receptores de bradicinina da célula hospedeira e a principal cisteino-proteinase de *T. cruzi*, a cruzipaina. Essa enzima, expressa em todas as formas do ciclo de vida do parasita, está envolvida no processo de infecção por sua habilidade de gerar bradicinina a partir do cininogênio aderido à célula e levar a mobilização de cálcio através dessa via (Scharfstein *et al.*, 2000).

Embora a via de sinalização por cálcio e a invasão dependente de lisossomo sejam relevantes, este processo não parece ser o único a promover a invasão do *T. cruzi*. Diversos estudos demonstraram a participação efetiva do citoesqueleto da célula alvo (Barbosa e Meirelles 1995; Rosestolato *et al.*, 2002) e, recentemente, evidência de processo endocítico modulado por dinamina foi relatado em células não-fagocíticas e fagocíticas profissionais (Barrias *et al.*, 2010). Além disso, a ativação de outras vias de sinalização, incluindo PI3-quinase (Vieira *et al.*, 1994; Woolsey *et al.*, 2003) e TGF β (Ming *et al.*, 1995; Waghbi *et al.*, 2005; Waghbi *et al.*, 2007), foram demonstradas no processo de invasão do *T. cruzi*. Woolsey e colaboradores (2003) caracterizaram uma nova rota de invasão celular em que os tripomastigotas induzem invaginação da membrana plasmática e formação de um vacúolo rico em lipídeos da classe IP3, como PtdInsP3/PtdIns(3,4)P2, e isento de marcadores lisossomais. Essa rota independente de lisossomos foi identificada em vários tipos celulares não fagocíticos, inclusive em células musculares cardíacas. Os trabalhos iniciais de Dvorak (1975) sugeriam que as formas tripomastigotas invadiam ativamente através do rompimento localizado da membrana plasmática da célula hospedeira

Diferente da maior parte dos patógenos intracelulares obrigatórios, que se esquivam da fusão com lisossomos (Amer e Swanson, 2002), a associação do vacúolo parasitóforo com compartimento lisossomal é um pré-requisito para a sobrevivência e permanência de *T. cruzi* na célula hospedeira (Ley *et al.*, 1990; Andrade e Andrews, 2004). Este requisito é alcançado de forma direta quando os parasitas utilizam o mecanismo de entrada dependente de lisossomos (Tardieux *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1996; Kima *et al.*, 2000) e indiretamente quando utilizam outras rotas, como endocitose e invaginação de membrana, nas quais os marcadores lisossomais são adquiridos no citoplasma após formação do vacúolo parasitóforo (Meirelles *et al.*, 1987; Woolsey *et al.*, 2003).

O tempo de permanência no vacúolo pode variar entre as diferentes formas e cepas. A maior parte dos amastigotas e tripomastigotas de cultivo estudados permanecem até 2 horas no compartimento, enquanto que nas formas metacíclicas o tempo desta etapa pode alcançar 10 horas (revisto por Alves e Mortara, 2009). No interior das células hospedeiras, tripomastigotas de cultivo e amastigotas secretam TcTOX, uma proteína semelhante ao fator 9 do complemento, que em pH ácido atua na lise da membrana do vacúolo parasitóforo, permitindo o escape do parasita para o citoplasma. Nas formas metacíclicas, esse fator não foi detectado e o mecanismo de escape ainda continua pouco compreendido (revisto por Alves e Mortara, 2009). No citoplasma da célula hospedeira, os amastigotas sofrem sucessivas divisões, diferenciam-se em tripomastigotas e são liberados após o rompimento da célula (revisto por Andrade e Andrews, 2005).

1.5 Alterações na célula hospedeira induzidas pelo *T. cruzi*

Nas células do hospedeiro mamífero ocorre uma série de modificações fisiológicas e estruturais durante o processo de infecção por *T. cruzi*. Em células musculares cardíacas já foram identificadas modificações em níveis de RNA mensageiro (Pereira *et al.*, 2000a; Pereira *et al.*, 2000b), na homeostase de cálcio (Garzoni *et al.*, 2003), no sistema de condução (Campos de Carvalho, 1992; Adesse *et al.*, 2008, Waghabi *et al.*, 2009) na organização do citoesqueleto (Pereira *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.*, 2005), nos componentes de matriz extracelular (Calvet *et al.*, 2004) e, ainda, distúrbios mitocondriais (Gupta *et al.*, 2009; Ba *et al.*, 2010).

A contração espontânea dos cardiomiócitos relaciona-se diretamente com mudanças nos níveis de cálcio e a complexa organização do citoesqueleto da célula muscular. Na etapa inicial de infecção por *T. cruzi* (adesão), ocorre um aumento adicional na concentração desse íon, levando a alterações responsáveis por ativação repetitiva em níveis de contração que em longo prazo podem contribuir para a patogênese da doença e desenvolvimento de cardiopatia (Garzoni *et al.*, 2003).

Ainda, as alterações eletrocardiográficas evidenciadas na doença de Chagas podem estar relacionadas com a destruição de miofibrilas e componentes do citoesqueleto durante o desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.*, 2005). Estas modificações não se restringem à mudanças estruturais, uma vez que a infecção pelo *T. cruzi* acarreta redução significativa dos níveis de RNA de α -actina cardíaca e elevada expressão de

RNA de β -actina, refletindo um perfil não muscular de expressão desenvolvido em condições patológicas (Pereira *et al.*, 2000b).

Além de modular a organização de actina filamentosa e a expressão dos genes de actina, a infecção por *T. cruzi* modula negativamente a expressão de α actinina (Melo *et al.*, 2006), costâmeros de vinculina (Melo *et al.*, 2004) e junções celulares, incluindo junções aderentes (Melo *et al.*, 2008) e comunicantes (Adesse *et al.*, 2008; Campos de Carvalho *et al.*, 1992). Os distúrbios de condução durante a infecção de cardiomiócitos também estão relacionados com a perda de junções do tipo *gap* que apresentam-se reduzidas principalmente entre as células infectadas. Esta reorganização provocada pelo quadro infectivo ocasiona atividade contrátil assíncrona, condução juncional prejudicada e diminuição na expressão de conexina 43, eventos que podem apresentar relação direta com as arritmias tão frequentes em pacientes chagásicos (Campos de Carvalho *et al.*, 1992; Adesse *et al.*, 2008). Além disso, as alterações no sistema de condução e no estabelecimento de fibrose cardíaca podem também estar relacionadas com TGF β . O evento foi confirmado tanto em corações quanto em cardiomiócitos isolados infectados por *T. cruzi* que demonstraram alterações nas junções do tipo *gap* diretamente proporcionais ao aumento da taxa desta citocina (Waghabi *et al.*, 2009).

Níveis elevados de TGF β no plasma de pacientes chagásicos estão relacionados com incidência aumentada de fibrose cardíaca (Araújo-Jorge *et al.*, 2002, 2008). Além disso, evidências demonstraram que mediadores solúveis, incluindo TGF β , estimulam a expressão de componentes de matriz extracelular, como a laminina, fibronectina, colágeno dos tipos I, III e IV, observados na infecção pelo *T. cruzi in vivo* (Andrade *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1999). No entanto, cardiomiócitos altamente infectados apresentam redução na expressão de fibronectina (Calvet *et al.*, 2004) mesmo após estímulo com TGF β (Calvet *et al.*, 2009).

Gupta e colaboradores (2009) confirmaram dados relacionados à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, que já haviam sido demonstrados em modelos de infecção animal e em humanos, demonstrando pela primeira vez a participação ativa de cardiomiócitos infectados na produção desses compostos. Os experimentos foram realizados com linhagens celulares e cardiomiócitos isolados de camundongos neonatos infectados por *T. cruzi* e foram visualizadas alterações mitocondriais decorrentes de produção aumentada das espécies reativas, um processo que diminui a viabilidade das células e pode estar relacionado com a falência cardíaca.

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelas mitocôndrias de cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* foram identificadas como o estímulo primário para a ativação de PARP-1-NF kappa B e a concomitante expressão de citocinas. A modificação das membranas mitocondriais via PARP resulta em um *feedback* positivo para a formação das espécies reativas e para o dano de DNA/PARP1 e, além disso contribuem direta ou indiretamente para a expressão aumentada de citocinas. (Ba *et al.*, 2010).

1.6 Avaliação em larga escala da interação *T. cruzi*-hospedeiro

Uma série de alterações durante o processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira ainda não são conhecidas e uma alternativa bastante promissora que vem sendo usada para compreender e aumentar os conhecimentos na área é o uso de ferramentas em larga escala tanto para estudos de transcrito quanto de proteoma desse processo.

As respostas das células hospedeiras a microrganismos patogênicos estão entre os estímulos externos mais bem estudados. Os patógenos induzem alterações fenotípicas em células hospedeiras que frequentemente são acompanhadas por mudanças importantes no padrão de expressão gênica. Com o advento da tecnologia de microarranjos de DNA, que permitiu a análise de vários genes simultaneamente, a habilidade de monitorar essas alterações transcricionais foi grandemente expandida (revisito por Jenner e Young, 2005).

Zhu e colaboradores (1998) foram os pioneiros no uso dessa ferramenta, verificando as alterações transcricionais durante a infecção por citomegalovírus em fibroblastos humanos. O primeiro relato da utilização de microarranjos para o estudo da infecção com protozoários foi feito por Buates e Matlashewski em 2001, analisando as alterações na expressão gênica em macrófagos infectados por *Leishmania donovani*.

O início dos estudos no campo de genômica funcional relacionados à infecção por *T. cruzi* aconteceu há menos de 10 anos. Vaena de Avalos e colaboradores (2002), usando microarranjos de cDNA contendo aproximadamente 27000 sequências, analisaram alterações transcricionais em fibroblastos humanos infectados com a cepa Y na sequência temporal de 2, 4, 6 e 24 horas após a infecção. Nos tempos iniciais de infecção (2 a 6 horas), os resultados revelaram ausência de ativação transcricional e apenas um pequeno conjunto de 6 genes com repressão significativa. No tempo tardio dessa cinética (24 horas), 106 transcritos apresentaram expressão aumentada (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Os genes mais fortemente induzidos no tempo tardio correspondiam aqueles estimulados por interferon (ISGs) e representavam 35,9% do total. Outras categorias de transcritos induzidas relacionavam-se

com transdução de sinal e receptores (8,6%), metabolismo (5%), transcrição (5%), matriz extracelular (2,5%), EST (27,5%), e sem agrupamento determinado (15,5%) (Vaena de Avalos *et al.*, 2002).

Em 2003, os estudos em modelos de infecção experimental em animais se iniciaram através do isolamento de corações de camundongos infectados pela cepa Sylvio de *T. cruzi*. Garg e colaboradores observaram que dos 1.176 genes do arranjo usado pelo grupo, 114 apresentavam-se diferencialmente regulados no curso da infecção, sendo 31, 89 e 66 no 3°, 37° e 110° dias após a infecção, respectivamente. Os dados demonstraram que todos os genes diferencialmente expressos em 3 dias pós-infecção apresentavam-se regulados positivamente e correspondiam a genes relacionados à resposta imune e codificadores de proteínas de defesa/stress. No 37° dpi, correspondente à fase aguda, 89 genes apresentaram-se diferencialmente expressos, 12 apresentavam-se reprimidos, sendo 8 deles envolvidos na codificação de proteínas relacionadas ao metabolismo energético mitocondrial e 77 aumentados com a maior parte continuando relacionada à resposta imune. Seguindo o curso da infecção e já na fase crônica (110 dpi), a maior parte dos genes diferencialmente expressos apresentava-se reprimida sendo que o conjunto relacionado ao metabolismo mitocondrial e à manutenção da estrutura e função do citoesqueleto e da matriz extracelular representava 60% deste total.

Para complementar o primeiro trabalho do grupo, que demonstrou uma série de alterações em genes mitocondriais durante a infecção por *T. cruzi*, Garg e colaboradores (2004) construíram um arranjo específico com sondas relacionadas à β oxidação de ácidos graxos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a cadeia respiratória de elétrons apresentando cobertura para 95 genes. Através do mesmo modelo de cardiopatia chagásica usado inicialmente foram analisadas as alterações de expressão em diferentes fases da infecção (3 a 5 dias após infecção, fase aguda correspondente de 25 a 40 dias após infecção e crônica correspondente de 150 a 180 dias após infecção). Os principais resultados revelaram que o aumento na expressão de genes associados à β 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).

Na mesma área, Mukherjee e colaboradores (2003) analisaram corações infectados com a cepa Brazil após 100 dias de infecção, na fase crônica da doença, em um modelo

previamente caracterizado onde estes órgãos apresentariam inflamação crônica, fibrose e intensa vasculite. O arranjo usado apresentava maior cobertura que o trabalho de Garg e colaboradores (2003) e estava composto por 27.000 sondas de cDNAs. Os resultados apresentaram 455 genes com expressão aumentada e 575 com expressão diminuída; deste conjunto, 65% foram classificados como ESTs e excluídas das análises finais. As funções alteradas nesse modelo de cardiopatia chagásica crônica relacionavam-se principalmente a transcrição (23%), transporte intracelular (11%), transporte através da membrana plasmática (6%), adesão, junção e matriz extracelular (22%), metabolismo (22%), citoesqueleto (4%), forma celular e morte (2%) e sinalização intracelular (12%). Nesse trabalho demonstrou-se pela primeira vez que sSLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), um importante modulador de resposta inflamatória, que tem a função de inibir várias proteases e catepsina G e limitar a lesão tecidual, encontrava-se aumentado, podendo estar relacionado com o controle da resposta inflamatória e/ou com o remodelamento cardíaco.

Cunha-Neto e colaboradores (2005), com o objetivo de analisar os padrões de expressão relacionados com a doença de Chagas e suas manifestações em humanos, realizaram o primeiro trabalho em larga escala com amostras de pacientes que seriam submetidos a transplante cardíaco com um microarranjo construído a partir de bibliotecas de cDNA cardiovascular (10.000 sondas). O estudo comparativo incluiu amostras de coração de pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, portadores de cardiopatia dilatada de outras etiologias e corações normais. Os genes modulados positivamente foram 582 e 364 em pacientes com cardiopatia chagásica e dilatada enquanto os genes modulados negativamente foram 465 e 32, respectivamente. No total de genes modulados, 126 genes apresentaram-se regulados em ambas as condições. Os padrões de expressão gênica apresentaram-se notavelmente distintos entre as condições estudadas e a similaridade nesses padrões referia-se a resposta hipertrófica e remodelamento ventricular com expressão aumentada de proteínas contráteis fetais, peptídeos natriuréticos, genes de construção de sarcômero, mioglobina e enzimas associadas ao metabolismo. Um evento importante que já havia sido verificado em modelos animais de cardiopatia chagásica foi confirmado nesse trabalho demonstrando que em humanos a principal categoria modulada positivamente também se relaciona à resposta imune, com a maioria dos genes associados ao interferon gama.

Em 2008, baseados no mesmo modelo de cardiopatia chagásica e com uso de um arranjo semelhante ao empregado no primeiro trabalho em larga escala do grupo, Mukherjee e colaboradores expandiram seu trabalho inicial (2003) através da análise de diferentes estágios

da doença englobando desde a fase aguda até a crônica (30, 60, 90, 120, 150 dias após infecção).

Os resultados obtidos corroboraram e complementaram os trabalhos do próprio grupo e também os de Garg e colaboradores (2003) e Cunha-Neto e colaboradores (2005); entretanto, em relação a sSLPI, um importante modulador da resposta imune que havia sido bastante evidenciado no primeiro artigo, os resultados foram controversos, apresentando aumento da expressão desse gene nos tempos iniciais da infecção seguido de expressão diminuída na fase crônica.

Os trabalhos em larga escala também foram importantes para determinar alterações no padrão de expressão gênica na célula hospedeira que parecem vantajosas para o parasita. Durante a formação de ninhos de amastigotas, Imai e colaboradores (2005), utilizando microarranjos de cDNA (1.700 sondas), observaram 16 genes diferencialmente expressos em fibroblastos murinos, sendo 10 positivamente e 6 negativamente regulados com destaque para uma via particular que modula o remodelamento do citoesqueleto, facilitando a proliferação dessas formas no interior da célula hospedeira. Outros genes importantes relacionados à formação de ninhos de amastigotas apresentaram-se modulados durante a análise do transcrito de células HeLa infectadas com *T. cruzi*, usando microarranjos de oligonucleotídeos com sondas para pelo menos 47.000 transcritos gênicos. Deste conjunto, 41 genes apresentaram expressão aumentada enquanto 23 apresentaram expressão diminuída. A maior parte dos genes modulados relacionou-se à inibição da proliferação celular, um evento que influencia o desenvolvimento do ciclo biológico do parasita facilitando a replicação de formas amastigotas e a formação dos ninhos (Shigihara *et al.*, 2008).

Um evento chave para a patogênese da doença de Chagas foi elucidado recentemente por Adesse e colaboradores (2010) através de um arranjo com cobertura para 6.289 genes de camundongos. Nesse trabalho, as análises de genes diferencialmente expressos durante a infecção de mioblastos com diferentes cepas de *T. cruzi* (Brazil, Y, CL e Tulahuen) revelou um resultado surpreendente e demonstrou que as alterações no padrão de expressão gênica eram bastante similares e independiam da cepa utilizada.

Até o momento, os trabalhos relacionados à cardiopatia chagásica demonstram que esta pode ser decorrente da infecção de cardiomiócitos, da infecção de outras células presentes no coração e de eventos sistêmicos relacionados à infecção, ou ainda um somatório destes processos, entretanto pouco se sabe sobre a contribuição específica de cada um desses fatores. Os estudos em larga escala com modelos de cardiopatia chagásica forneceram

importantes avanços para o início do entendimento das bases moleculares do desenvolvimento dessa patologia agregando informações ao processo descrito anteriormente em nível de órgão. Em relação aos trabalhos em larga escala analisando a infecção por *T. cruzi* em células isoladas se utilizaram vários tipos celulares como fibroblastos, células epiteliais e mioblastos. Entretanto, foi somente em 2009 que se iniciaram os estudos com cardiomiócitos, um dos principais alvos da infecção (Goldenberg *et al.*, 2009). Esse estudo avaliou tempos tardios da infecção pelo *T. cruzi* e os autores demonstraram pela primeira vez, usando uma ferramenta de larga escala, o papel ativo de cardiomiócitos como parte da patogênese da doença. A infecção de culturas de cardiomiócitos com a cepa Brazil de *T. cruzi* demonstrou alterações em pelo menos 420 genes de um total de 7624 do arranjo e as categorias mais fortemente moduladas referiam-se a resposta imune, matriz extracelular e adesão celular.

Recentemente, finalizamos o primeiro trabalho de interação *T. cruzi*-célula hospedeira usando ferramentas de larga escala. O modelo utilizado para a infecção foram os cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi*, clone Dm28c, e os microarranjos apresentavam cobertura para 30% do genoma murino (Manque *et al.*, 2011). A cinética de infecção para avaliação da expressão gênica foi cuidadosamente controlada e detalhada, sendo constituída pelos pontos de 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas após infecção. Alterações foram evidenciadas em genes relacionados à resposta imune, inflamação, ciclo celular, estresse oxidativo, via proteossomo-ubiquitina e remodelamento do citoesqueleto. As análises no transcrito desses cardiomiócitos infectados revelaram 353 genes apresentando expressão diferencial durante a cinética, sendo que 111 apresentaram-se aumentados enquanto que 242 estavam diminuídos.

O conjunto de genes mais fortemente modulado positivamente está relacionado a inflamação e a resposta imune e envolvido no recrutamento de células do sistema imune, sinalização mediada por interferon e mediadores de inflamação. Em relação aos genes associados a apoptose, nossas observações sugerem um contraditório e delicado balanço com genes pro-apoptose e anti-apoptose sendo diferencialmente expressos.

Os genes associados ao citoesqueleto e ao tráfego intracelular foram diferencialmente expressos durante a fase tardia (24 e 48 horas após infecção). Os genes associados à dinâmica do citoesqueleto, a organização da citoarquitetura, tráfego vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi foram aqueles que apresentaram expressão fortemente diminuída. A perturbação da homeostase celular já se apresenta como um evento bem caracterizado durante a infecção de células por *T. cruzi* e os nossos dados demonstraram

modulação de genes associados ao estresse oxidativo e funções mitocondriais que podem realmente estar associados com a disfunção mitocondrial desenvolvida nessa doença.

As contribuições que a utilização de microarranjos vem proporcionando iniciaram a busca por eventos moleculares precedentes ou coincidentes com fenótipos-chave no curso das doenças, visando marcadores moleculares inclusive para o prognóstico (Burleigh, 2004). Entretanto, a utilização dessa tecnologia que tanto propiciou a elucidação da resposta celular à infecção não só por *T. cruzi*, mas também por vários patógenos, mostrou ter pouca sensibilidade para avaliar a modulação da expressão gênica no organismo patogênico durante o processo de infecção e, atualmente, essas ferramentas estão sendo substituídas pelos sequenciadores em larga escala que permitem teoricamente o sequenciamento de transcritomas completos inclusive do organismo patogênico.

1.7 Avaliação em larga escala de transcritomas: novas tecnologias

Desde que foram introduzidas no mercado em 2004, as tecnologias de sequenciamento de última geração produziram um grande impacto no campo da genômica, sendo utilizados para sequenciar novos genomas e ressequenciar aqueles previamente caracterizados e ainda em novas aplicações. As tecnologias disponíveis são o pirosequenciamento (sequenciador 454 da Roche), a tecnologia patenteada pela Illumina (usada pelo Solexa), Applied Biosystems (com o SOLiD) e Helicos BioScience (com o HeliScope) (revisto por Morozova e Marra, 2008; revisto por Costa *et al.*, 2010).

Os sistemas de sequenciamento citados acima podem variar em detalhes técnicos, mas a idéia essencial é similar. Cada uma das reações é preparada com DNA em diluições limitantes, com o intuito de que exista apenas uma destas moléculas em cada uma das reações, em seguida ocorre amplificação e o sequenciamento com a geração de milhões de sequências (*reads*), variando entre 35 e 400 pares de bases, de acordo com o equipamento utilizado, que em seguida podem ser mapeados. O número de sequências geradas em um pequeno espaço de tempo é grande e esta é a base para a denominação de sequenciamento massivo ou em larga escala (revisto por Costa *et al.*, 2010; Cullum *et al.*, 2011).

As novas aplicações desses sequenciadores beneficiam-se deste grande número de sequências geradas, em contextos onde o sequenciamento de apenas parte da molécula é suficiente (revisto por Morozova e Marra, 2008). De maneira detalhada, a base da aplicação são as leituras pequenas para determinar o sítio de origem da sequência no genoma de referência sem a necessidade de sequenciar a totalidade de cada molécula presente na amostra inicial, cerca de 30 nucleotídeos (*tag*) já possibilitam identificação através do alinhamento.

Desta forma, o número de leituras que mapeiam em uma determinada região do genoma correlaciona-se com a abundância da mesma na amostra original (revisto por Wold e Myers, 2008) (Figura 1.4). Esse método propiciou uma nova maneira de analisar transcriptomas (RNA-Seq), sítios genômicos de ligação de proteínas (CHIP-Seq) e padrões de metilação de genoma (Metil-Seq) (revisto por Wold e Myers, 2008; revisto por Morozova e Marra, 2008).



Figura 1.4 Bases para o método de Sequenciamento
Molde é sequenciado e as *reads* gerados são mapeados (Modificado de Morozova e Marra, 2008).

O principal objetivo de análise do transcriptoma completo é identificar, caracterizar e catalogar todos os transcritos expressos dentro de uma célula ou tecido específico em um estado particular (Wang *et al.*, 2009). O RNA-Seq, um método poderoso, rápido e de custo relativamente baixo gera quantidades massivas de dados e permite o mapeamento e a quantificação digital de transcriptomas completos de organismos isolados e também da interações entre organismos distintos. No caso de doenças complexas, o seu uso permite relacionar os fenótipos, geralmente bem caracterizados, com o transcriptoma ainda pouco conhecido, caracterizando mais uma revolução neste campo da ciência (Wang *et al.*, 2009; Marguerat e Bähler, 2010).

Os principais passos do protocolo para a técnica de RNA-Seq são o isolamento do RNA, a conversão deste em cDNA seguido pela fragmentação e o sequenciamento. As sequências geradas, na ordem de milhões, são mapeadas e, em seguida, a expressão é estimada permitindo teoricamente a identificação de todos os transcritos de um sistema celular (Wang *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010) (Figura 1.5).

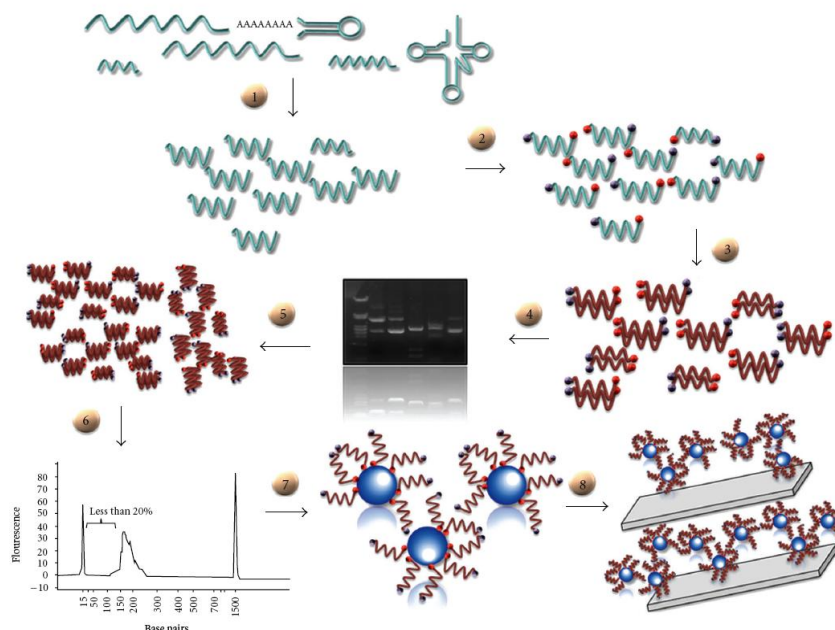


Figura 1.5 Representação dos experimentos de RNA-Seq na plataforma SOLiD. Amostra inicial com RNA total após o rRNA ser depletado, contendo mRNA poliA e não poliA mRNA (tRNAs, miRNAs e pequenos RNAs não codificantes), 1- RNA ribo-depletado é fragmentado, 2- Ligação a adaptadores específicos, 3- Retro-transcrição, 4- Seleção do cDNA através do tamanho através de eletroforese em gel, 5- cDNAs selecionados são amplificados por PCR, 6- Distribuição pelo tamanho é avaliada, 7- PCR em emulsão, com um fragmento de cDNA por *bead*, é usado para a amplificação clonal das bibliotecas de cDNA, 7- As *beads* purificadas e enriquecidas são finalmente depositadas em lâminas de vidro, 8- Sequenciamento por ligação é realizado e os dados estão prontos para análise (Modificado de Costa *et al.*, 2010).

No início de dezembro de 2010, mesmo sendo uma metodologia recente, o RNA-Seq se apresentava como base para 225 trabalhos (PubMed), desde vírus e procariotos até eucariotos complexos, contribuindo com um elevado número de informações nas diferentes áreas de conhecimento, incluindo saúde pública através da compreensão de diversas doenças e desenvolvimento de fármacos mais potentes.

Assim, a aplicação desta nova tecnologia no estudo da interação *T. cruzi*-cardiomiócito possibilitará maior sensibilidade na detecção de genes diferencialmente expressos na célula hospedeira e, pioneiramente, permitirá a avaliação de transcritos do parasita na interação com células de mamífero. Por conseguinte, hoje dispomos de uma ferramenta inovadora que permite estudar a interação *T. cruzi*-cardiomiócito usando toda a informação contida no RNAm.

2 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo consiste no estudo da modulação da expressão gênica de cardiomiócitos *in vitro* após a infecção pelo *T. cruzi* clone Dm28c.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão diferencial global e temporal dos genes de cardiomiócitos *in vitro* durante cinética de interação com formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Categorizar funcionalmente os genes, através de técnicas de agrupamento de genes com expressão coordenada, visando a associação de grupos com o processo de invasão e desenvolvimento intracelular do parasita;
- Discutir comparativamente o perfil de expressão gênica obtido pelo RNA-Seq com os ensaios de microarranjo realizados na interação *T. cruzi*-cardiomiócito.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de cardiomiócitos

Cardiomiócitos foram isolados de embriões obtidos de fêmeas grávidas de camundongos *Swiss Webster* com 18 dias de gestação. Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂). Após abertura da cavidade abdominal, o útero contendo os embriões (~10 a 15 animais) foi removido e transferido para placa de Petri (100x15 mm) contendo solução de Ringer (154 mM NaCl, 56 mM KCl, 17 mM Na₂HPO₄, pH 7,0). Em seguida, os embriões foram decapitados e os corações removidos após incisão do esterno, permitindo a abertura da caixa torácica. Os corações foram transferidos para placas de Petri (100x15 mm) contendo placa de Petri (35x10 mm) com solução de Ringer e mantidos no gelo para minimizar o processo de autólise. Em seguida, os átrios foram retirados e descartados enquanto os ventrículos foram fragmentados e transferidos em solução de Ringer para frasco de Erlenmeyer (50 mL) contendo barra magnética. Para remoção de hemácias, os fragmentos foram lavados por 5 minutos em solução de Ringer sobre placa agitadora aquecida (aproximadamente 37 °C). Posteriormente, os ventrículos fragmentados foram lavados em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,0) e submetidos à dissociação enzimática sequencial utilizando 0,025% de tripsina e 0,01% de colagenase em PBS. A série de tripsinização (5 minutos a 37 °C cada etapa) foi efetuada até completa dissociação do tecido cardíaco. Ao final de cada etapa de dissociação, o sobrenadante contendo as células isoladas foi transferido para tubos cônicos (15 mL) contendo 2 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco completo [DMEM acrescido de 2,5 mM de CaCl₂, 1mM de L-glutamina, 2% de extrato embrionário de galinha e 8% soro fetal bovino (SFB)] sendo ainda adicionado 0,5 mL de SFB que juntamente com a baixa temperatura contribui para a inativação da atividade enzimática. A cada etapa da dissociação, a morfologia, viabilidade (através do uso de azul de tripan) e número de células foram monitorados por microscopia de contraste de fase. As células em suspensão foram sedimentadas por centrifugação por 5 minutos a 500xg e o sedimento contendo as células foi ressuspenso em DMEM completo. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes para uma eficiente eliminação das enzimas de dissociação preservando assim a viabilidade das células isoladas. O número total de células/mL foi determinado pela quantificação em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas na densidade de 2x10⁶ células em placas de cultura

de 60 mm. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de CO₂ e o meio nutritivo trocado diariamente. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo CEUA (licença associada ao protocolo LW-09/11).

3.2 Formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de linhagem celular

Tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, foram obtidos a partir de infecção de linhagem de células Vero. As monocamadas de células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano, foram semanalmente submetidas à dissociação enzimática, utilizando-se 0,02% de tripsina e 0,1% de EDTA em PBS. As células isoladas foram plaqueadas em frascos de cultura de 150 cm² na densidade de 5x10⁵ células e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas de cultivo, as culturas foram infectadas com 10⁷ tripomastigotas, clone Dm28c, e o meio nutritivo foi substituído após 24 horas de interação. No 4º dia pós infecção (dpi), quando ocorre o pico da liberação de tripomastigotas no meio extracelular, o sobrenadante das culturas contendo os parasitas foi recolhido em tubos cônicos (50 mL) e submetidos à centrifugação (15 minutos a 2500xg). O sedimento contendo os tripomastigotas foi ressuspensão em 1 mL de DMEM e o número total de parasitas/mL foi determinado por quantificação em câmara de Neubauer.

3.3 Interação *T. cruzi*-cardiomiócitos

As culturas de cardiomiócitos com 48 horas de cultivo, as quais apresentavam um alto índice de diferenciação e contração espontânea (Pereira *et al.*, 2000b), foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A interação parasita-célula hospedeira foi realizada com tripomastigotas, clone Dm28c, derivados de monocamadas de células Vero. Para análise de genômica funcional, o ensaio de interação foi realizado na proporção de 10 parasitas/ célula hospedeira (10:1). A cinética foi interrompida após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas pós-infecção e processadas para a análise de sequenciamento. Cada tempo do ensaio experimental foi constituído de duplicatas de culturas de cardiomiócitos controles e infectados com *T. cruzi*. Devido ao alto índice de infecção do clone Dm28c em cardiomiócitos, os tripomastigotas livres foram removidos do meio extracelular após 6 horas de interação, através da lavagem das células com solução de Ringer e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.4 Extração de RNA total

O RNA total de culturas controles e infectadas por *T. cruzi*, clone Dm28c, foi extraído de acordo com o protocolo do kit RNeasy (Quiagen). As culturas foram lavadas em PBS e

lisadas em 600 μL de tampão RLT suplementado com β -mercaptoetanol (1:1000). Após completa lise celular, o extrato total foi transferido para microtubos de 2 mL e em seguida, foi adicionado 600 μL de etanol 70% sendo o conteúdo homogeneizado. As amostras foram transferidas para coluna apropriada e centrifugada a 8000xg por 15 segundos. Após a passagem da mistura lisado/etanol, a coluna foi lavada com 700 μL de tampão RW1 e centrifugada a 8000xg por 15 segundos. Em seguida, 500 μL do tampão RPE foi adicionado à coluna e a mesma foi centrifugada a 8000xg por 15 segundos, esta etapa foi repetida e submetida à centrifugação de 8000xg por 2 minutos. O RNA retido na coluna foi eluído em 30 μL de água livre de nuclease na primeira passagem e sequencialmente com mais 30 μL da mesma. O tratamento com DNase foi realizado e a concentração de RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), considerando o valor da absorbância em 260 nm igual a 1 equivalente a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA. A qualidade dos ácidos nucleicos foi determinada pela absorbância em 260 e 280 nm (amostras puras devem apresentar relação >2 na densidade óptica de 260/280 nm) e ainda, avaliada através do equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) pela inspeção visual dos eletroferogramas, das imagens geradas (semelhantes a géis) e pelo índice de integridade do RNA (RIN) que varia de 0-10 em ordem crescente de integridade (Vitale, 2001)(Figura 3.1).

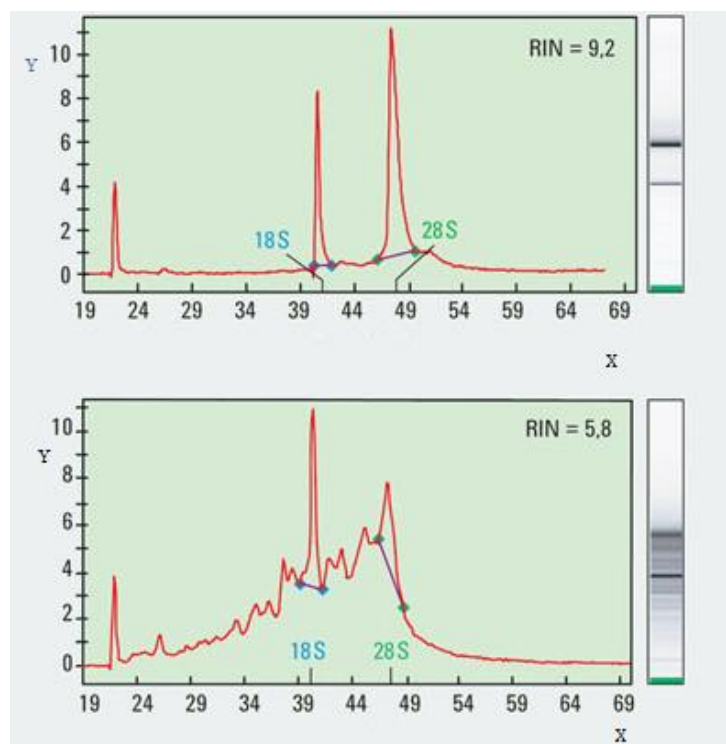


Figura 3.1 Eletroferograma modelo, demonstrando imagem semelhante a gel: amostra RNA íntegra (RIN:9,2) e amostra RNA parcialmente degradada (RIN:5,8); eixo X tempo segundos, eixo Y fluorescência; 18S pico RNA ribossomal fração 18S, 28S pico RNA ribossomal fração 28S - Fonte modificado manual RNA 6000 Pico Kit.

3.5 Depleção de RNA ribossomal

O RNA total de culturas controles e infectadas por *T. cruzi*, clone Dm28c, foi submetido à depleção seletiva de RNA ribossomal (frações 18S e 28S) de acordo com o kit RiboMinus Transcriptome Isolation (Human/Mouse) [Invitrogen]. Brevemente, 10 µg de RNA total (dissolvidos em 20 µL de água livre de nuclease) de cada amostra foram adicionados a 300 µL de tampão de hibridação contendo 8 µL de sequências oligonucleotídicas específicas para RNA ribossomal marcadas com biotina, em seguida a reação foi incubada à 70 °C por 5 minutos e transferida para 37 °C por 30 minutos. O complexo gerado composto por rRNA/5' biotina foi adicionado à esferas magnéticas cobertas com estreptoavidina e mantido a 37 °C por 15 minutos e então transferido para estante magnética por 1 minuto com retirada do sobrenadante livre de RNA ribossomal. O sobrenadante foi precipitado em etanol e ressuspendido em água livre de nuclease e a concentração e qualidade do RNA livre de RNA ribossomal foi determinada da mesma maneira descrita no item 3.4.

3.6 RNA-Seq

O preparo das bibliotecas a serem sequenciadas de amostras de RNA livre de RNA ribossomal controles e infectadas por *T. cruzi*, clone Dm28c, foi realizado através do kit Whole Transcriptome Library Preparation for SOLiD Sequencing. A Figura 3.2 representa o fluxograma do processo de RNA-Seq até a preparação das esferas para o sequenciamento.

3.6.1 Fragmentação do RNA do transcrito

O RNA livre de RNA ribossomal de amostras controles e infectadas pelo *T. cruzi*, clone Dm 28c (entre 0,2 e 1 µg) foi fragmentado a 37 °C por 10 minutos em 10 µL de volume final com 1 µL de tampão específico para fragmentação de ácido nucleico e 1 µL de RNase III. Esta reação foi interrompida pela adição de 90 µL de água livre de nuclease e purificada através de RiboMinus Concentration Module (Invitrogen). Em seguida, a quantidade e qualidade do RNA fragmentado foram determinadas como descrito no item 3.4.

3.6.2 Construção da biblioteca amplificada

A construção das bibliotecas baseou-se sequencialmente nas reações de hibridação e ligação de adaptadores, transcrição reversa, seleção de fragmentos com tamanhos específicos e amplificação do cDNA.

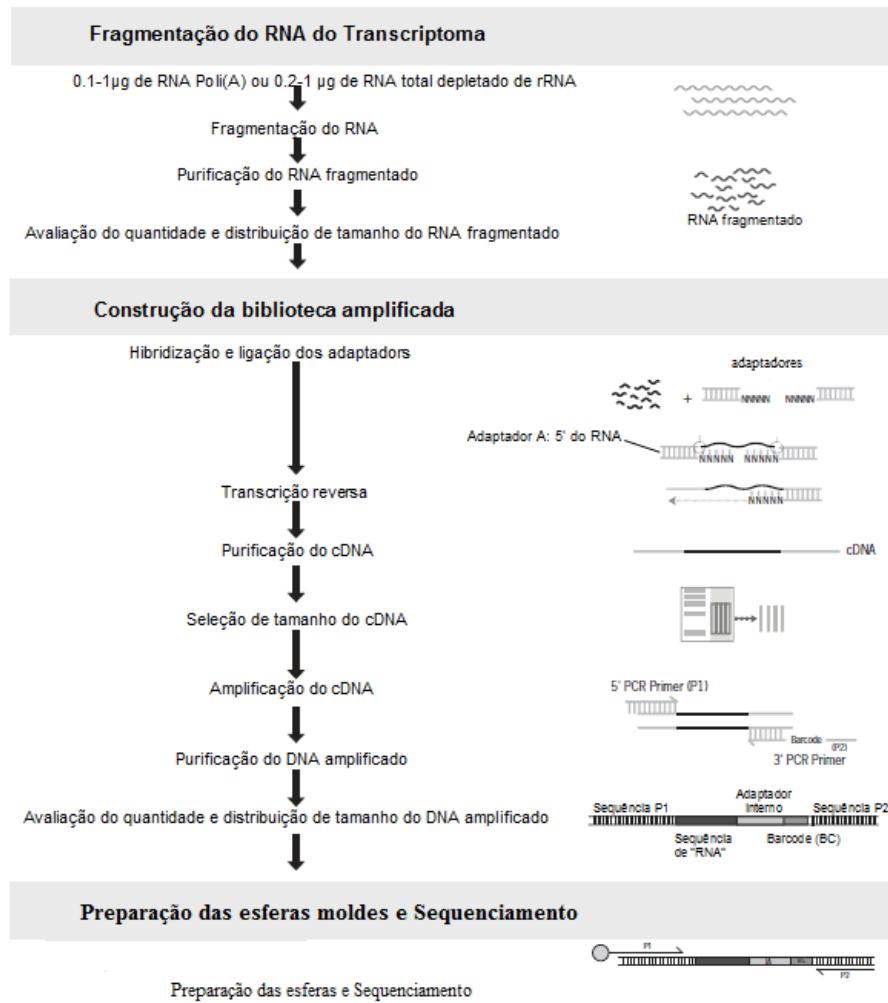


Figura 3.2 RNA-Seq

FONTE – modificado do manual Whole Transcriptome Library Preparation for SOLiD™ Sequencing.

3.6.2.1 Hibridação e ligação dos adaptadores

As reações de hibridação e a ligação de adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos de RNA livres de fração ribossomal das amostras controles e infectadas com *T. cruzi*, clone Dm 28c, foram realizadas usando o kit SOLiD Small RNA Expression. A reação de hibridação, inicialmente composta por 2 µL de solução de adaptadores, 3 µL de solução de hibridização e 3 µL de RNA fragmentado (contendo entre 50 e 100 ng), foi realizada através da incubação a 65 °C por 10 minutos e em seguida, a 16 °C por 5 minutos. A reação de ligação foi iniciada após a adição de 10 µL de tampão de ligase 2x e 2 µL de ligase ao conteúdo submetido à ligação com a incubação sendo realizado a 16 °C por 16 horas.

3.6.2.2 Transcrição Reversa

A transcrição reversa de fragmentos de RNA de amostras controles e infectadas com *T. cruzi*, clone Dm28c, livres de fração ribossomal e ligados a adaptadores foi realizada com o kit SOLiD Small RNA Expression. O cDNA foi obtido através de incubação a 42 °C por 30 minutos com os 20 µL de reação de ligação adicionados a 13 µL de água livre de nuclease, 4 µL de tampão para transcrição reversa 10x, 2 µL de dNTP 2,5 mM, e 1 µL de transcriptase reversa com o conteúdo sendo purificado através do kit MinElute PCR Purification. O cDNA purificado 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 cuba XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen), o gel foi corado com SYBR Gold (Invitrogen) e a excisão de bandas contendo fragmentos entre 100 e 200 bases foi realizada com o fragmento isolado sendo subdividido em quatro partes longitudinais.

3.6.2.3 Amplificação do cDNA

Os fragmentos selecionados (partes longitudinais) correspondentes à bandas entre 100-200 bases de cDNA de amostras controles e infectadas com *T. cruzi* foram submetidas à reação de amplificação com 2 µL da solução de iniciadores (contendo SOLiD™ System Barcode específico) e 98 µL do mix para PCR utilizando-se reagentes do kit SOLiD Small RNA Expression nas condições de 15 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, sucedidos por incubação a 72 °C por 7 minutos. O material amplificado foi purificado com o kit PureLink™ PCR Micro (Invitrogen) e a concentração e qualidade final do material amplificado foram determinadas da mesma forma descrita no item 2.4. O material gerado nesta reação foi a base para a construção das bibliotecas a serem sequenciadas.

3.6.2.4 Preparo de esferas e o sequenciamento

Para que o material preparado nas etapas anteriores seja sequenciado, é necessário a ligação dos fragmentos à uma microesfera magnética e intensiva amplificação desses fragmentos na superfície das mesmas, pelo processo de PCR em emulsão.

3.6.2.4.1 Reações de PCR em emulsão

As reações de PCR em emulsão (ePCRs) das bibliotecas basearam-se no protocolo SOLiD™ 3 System Template Bead Preparation Guide em mini-escala. As bibliotecas, os moldes para a reação de PCR de emulsão (ePCR), estavam compostas por quantidades idênticas de 10 amostras, cada uma amplificada com etiqueta (*barcode*) específica. A Figura 3.3 representa as reações sequenciais descritas abaixo.

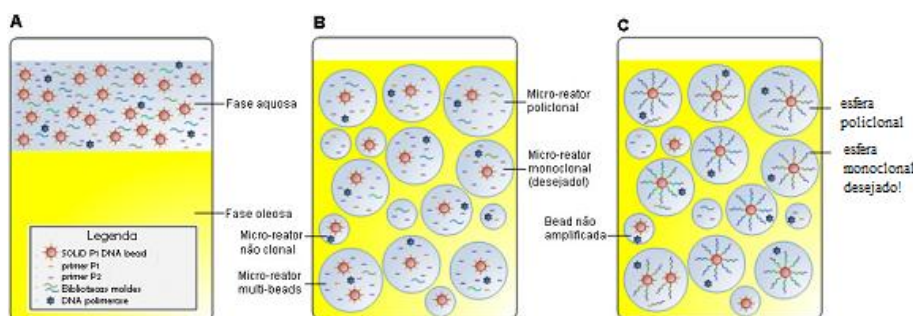


Figura 3.3 PCR em emulsão

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.

3.6.2.4.1.1 Preparo da fase oleosa

A fase oleosa foi preparada através da mistura de 1,8 mL de estabilizador de emulsão 1, 400 µL de estabilizador de emulsão 2 e 37,8 mL de óleo de emulsão para um volume final de 40 mL.

3.6.2.4.1.2 Preparo da fase aquosa

A fase aquosa foi preparada através da combinação de quantidades iguais das amostras de cDNA amplificado contendo os 10 SOLiD™ System *Barcodes* pertencentes a cada biblioteca, para uma concentração final entre 0,5 e 1 pM de DNA molde. A reação de ePCR compunha-se de 14 mM dNTP mix, 25 mM de cloreto de magnésio, 40 nM ePCR primer 1, 3 µM ePCR primer 2, 0,54U/µL AmpliTaq Gold DNA polimerase e água livre de nuclease para volume final de 2720 µL e 800 milhões de esferas revestidas com oligo P1 (P1 DNA Bead) para amplificação nos microrreatores.

3.6.2.4.1.3 Emulsificação das fases aquosa e oleosa

As fases aquosa e oleosa foram emulsificadas por 5 minutos usando o sistema ULTRA-TURRAX™ Tube Drive da IKA® em volume final de 11,8 ml. As microgotículas de fase aquosa geradas no interior da emulsão representam os locais onde a amplificação de DNA em torno da P1 DNA Bead ocorrerá durante a reação de ePCR.

3.6.2.4.1.4 Reação de PCR em emulsão

A emulsão foi submetida à reação de amplificação com incubação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 93 °C por 15 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 75 segundos seguidos por incubação final a 72 °C por 7 minutos.

3.6.2.4.1.5 Quebra da emulsão e lavagem das esferas

Após a reação de ePCR, os microrreatores foram quebrados e as esferas foram lavadas para a retirada de óleo e emulsificadores. O volume total da emulsão foi transferido para o sistema SOLiD™ Emulsion Collection Tray onde se adicionou 10 mL de 2-butanol. A mistura foi homogeneizada e transferida para tubo cônico (50 mL) e 2-butanol foi adicionado para se completar o volume final de 30 mL e então, a amostra foi centrifugada por 5 minutos em 2200xg. Após a centrifugação, a fase líquida foi descartada o precipitado contendo as esferas no tubo de 50 mL foi recuperado com a adição de 600 µL de tampão 1x Bead Wash e em seguida, transferido para tubo LoBind (1,5 mL), sendo essa etapa repetida com o intuito de retirar as esferas restantes no frasco de 50 mL. A mistura contendo aproximadamente 1200 µL foi centrifugada a 21000xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e se adicionou 150 µL de tampão Bead Wash. Em seguida, o total foi agitado e transferido para um novo tubo LoBind (1,5 mL), sendo essa etapa repetida para evitar perda de esferas. Após adição de 1 mL de tampão 1x Bead Wash, a amostra foi centrifugada a 21000xg por 1 minuto e o precipitado ressuspensão em 200 µL de tampão 1x TEX. A solução de esferas em tampão 1x TEX foi transferida para uma estante magnética por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado com as esferas sendo ressuspensas (esferas de sequenciamento) em 200 µL de tampão 1x TEX.

3.6.2.4.1.6 Enriquecimento de esferas contendo DNA (esferas de sequenciamento)

A reação de enriquecimento de esferas, para permitir que o anelamento das extremidades complementares dos adaptadores se tornasse possível, baseou-se na combinação de volumes idênticos de esferas de enriquecimento com esferas de sequenciamento pela incubação a 61 °C por 15 minutos. A mistura contendo esferas de enriquecimento, complexos esferas de enriquecimento- esferas de sequenciamento e esferas não amplificadas, foi transferida para o topo de um colchão de glicerol 60% em um tubo cônico 1,5 mL LoBind. Após centrifugação a 21000xg por 3 minutos, as esferas de enriquecimento e os complexos esferas de enriquecimento- esferas de sequenciamento concentram-se na camada superior onde foram coletados e transferidos para novo tubo 1,5 ml LoBind contendo 1 mL de tampão TEX e então, foram submetidos a nova lavagem com tampão TEX seguido de ressuspensão em 400 µL do mesmo. O conteúdo gerado foi submetido à desnaturação através de 3 lavagens sucessivas com 400 µL de tampão de desnaturação, sendo que as esferas de sequenciamento foram seletivamente recuperadas com auxílio de uma estante magnética e mantidas em 400 µL de tampão TEX.

3.6.2.4.1.7 Modificação da extremidade 3' e quantificação de esferas

Para que as esferas enriquecidas pudessem se ligar a sílica da lâmina de sequenciamento, um nucleotídeo dUTP modificado foi adicionado a extremidade do DNA molde usando uma reação com terminal transferase. A reação baseou-se na centrifugação de 400 µL de esferas enriquecidas mantidas em tampão TEX e ressuspensão em 178 µL de tampão para terminal transferase 1x, onde se adicionou 20 µL de solução Bead Linker (dUTP modificado) e 2 µL da enzima terminal transferase (20 U/µL). Após incubação a 37 °C por 2 horas, as esferas foram lavadas e recuperadas em 200 µL de tampão TEX. A concentração final de esferas/mL foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.6.2.4.1.8 Deposição de esferas e sequenciamento

O preparo das lâminas e o sequenciamento foi realizado segundo o protocolo *SOLiD™ 3 System Instrument Operation Guide*. O sequenciamento foi realizado em lâminas de 8 quadrantes sendo que em cada quadrante depositou-se uma biblioteca contendo 36 milhões de

esferas. O volume adequado para esta quantidade foi lavado com tampão de deposição e finalmente, as esferas foram depositadas em um dos poços de uma câmara de deposição e submetidas à adesão a 37 °C por 90 minutos quando a lâmina foi instalada no aparelho SOLiD™ 3 System. Os sequenciamentos foram realizados segundo protocolo SOLiD Multiplex que baseia-se primeiramente no sequenciamento dos *barcodes* através de um ciclo de ligação para cada um dos 5 oligonucleotídeos de sequenciamento, resultando em um *tag* de 5 bases para cada *barcode*. A seguir foi realizado o sequenciamento dos fragmentos através de 10 ciclos de ligação para cada um dos 5 *primers* 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 (ICS).

3.6.3 *Análise dos dados*

As leituras geradas pelo sequenciamento na plataforma SOLiD foram alinhados frente ao genoma de camundongo usando a ferramenta *SOLiDTM WT Analysis Pipeline*, permitindo até 2 erros. O número de leituras alinhadas em cada gene anotado foi somado, e este valor foi utilizado para as análises de expressão diferencial. Os dados brutos foram pré-processados para retirada de RNAs não codificadores (ncRNAs). Os dados de contagens de leituras 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), sendo o valor máximo permitido 10% e o *fold change* de 1,5x.

O pacote Expander (Shamir *et al.*, 2005) foi usado para o agrupamento através do método de *self organizing map* (SOM) e para análise de enriquecimento de categorias funcionais do Gene Ontology (GO), utilizando $FDR \leq 0,05$. As redes gênicas foram construídas usando o pacote Ingenuity Pathways Analysis.

4 RESULTADOS

4.1 Preparação das amostras e sequenciamento

Culturas primárias de células musculares cardíacas foram utilizadas como ferramenta de investigação para aprofundar o entendimento de eventos biológicos e moleculares disparados durante a interação *Trypanosoma cruzi*-cardiomiócito. Nosso sistema *in vitro* se caracteriza por apresentar cerca de 60% das células diferenciadas, miócitos cardíacos, que se encontravam acopladas com contração espontânea nas primeiras 24 horas de cultivo. Os ensaios experimentais foram realizados com culturas apresentando elevado grau de diferenciação (início após 48 horas de cultivo), onde a monocamada apresentava contração sincrônica. Assim, com a finalidade de avaliar a modulação de genes nos diferentes estágios da interação parasita-célula hospedeira, realizamos uma cinética de interação abrangendo os tempos iniciais da infecção (1 a 6 horas), onde as etapas de adesão, interiorização, escape do vacúolo parasitóforo e início de diferenciação são evidenciadas com *T. cruzi* clone Dm28c derivado de cultivo celular e ainda avaliamos o tempo intermediário da infecção (24 horas de infecção), correspondente à diferenciação em amastigotas e início de intensa proliferação do parasita no seu ciclo intracelular. No entanto, para melhor compreensão dos eventos iniciais da interação, subdividimos o estágio inicial da infecção (1 a 6 horas) em duas etapas principais: recente (1 a 4 horas) e tardia (5 a 6 horas). O tempo inicial recente caracteriza-se por apresentar as etapas de adesão, invasão e permanência no vacúolo parasitóforo, enquanto no tempo inicial tardio ocorre preferencialmente o escape do vacúolo parasitóforo e se inicia a diferenciação em amastigotas.

Com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos dados gerados e reduzir artefatos da técnica, realizamos três réplicas biológicas contendo duplicatas dos diferentes tempos de infecção (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas). Ressaltamos que cada ponto de infecção possuía amostras de cardiomiócitos controles e infectados por *T. cruzi*, clone Dm28c, na proporção de 10:1 parasitas/célula hospedeira. O *T. cruzi* clone Dm28c possui alta capacidade de invasão, apresentando níveis elevados de infecção em tempos curtos de interação. A taxa de infecção média dos experimentos alcançou 17,25% e 75% nos tempos de 1 e 24 horas de infecção, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 4.1. Com a progressão da infecção, notamos um aumento expressivo de parasitas interiorizados (Figura 4.2) e elevado nível de

diferenciação para a forma amastigota após 24 horas de infecção (Figura 4.3), quando comparado com apenas 5 a 7% de diferenciação observada no tempo de 6 horas de infecção.

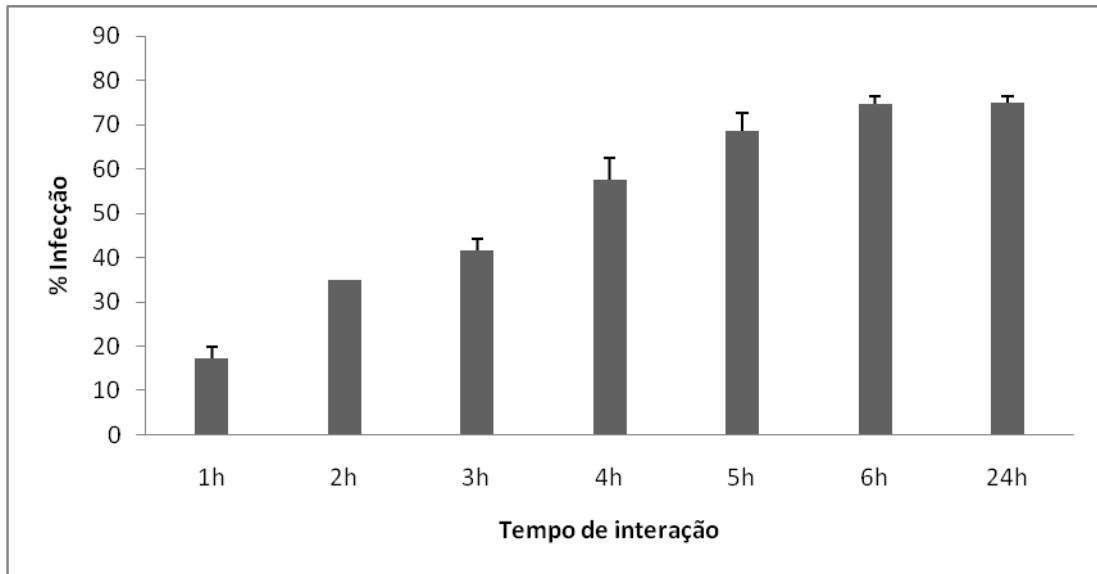


Figura 4.1. Perfil de infecção de culturas de cardiomiócitos durante cinética de interação com *T. cruzi*, clone Dm28c, na proporção de 10:1 parasitas/célula cardíaca.

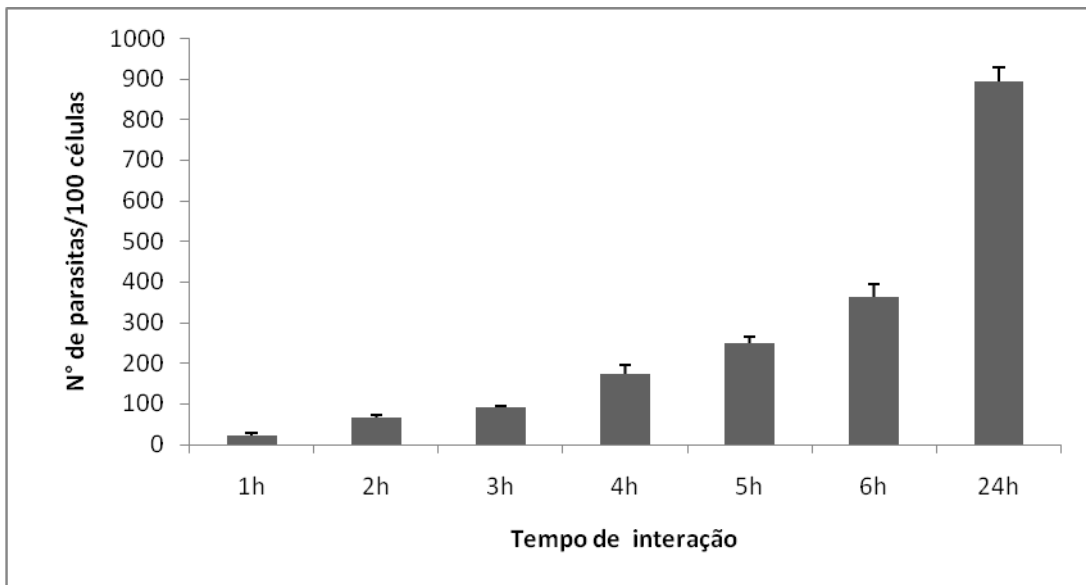


Figura 4.2. Relação de parasitas intracelulares/100 células cardíacas em culturas primárias de cardiomiócitos durante cinética de interação com *T. cruzi*.

Note aumento substancial no número de parasitas interiorizados com a progressão da infecção.

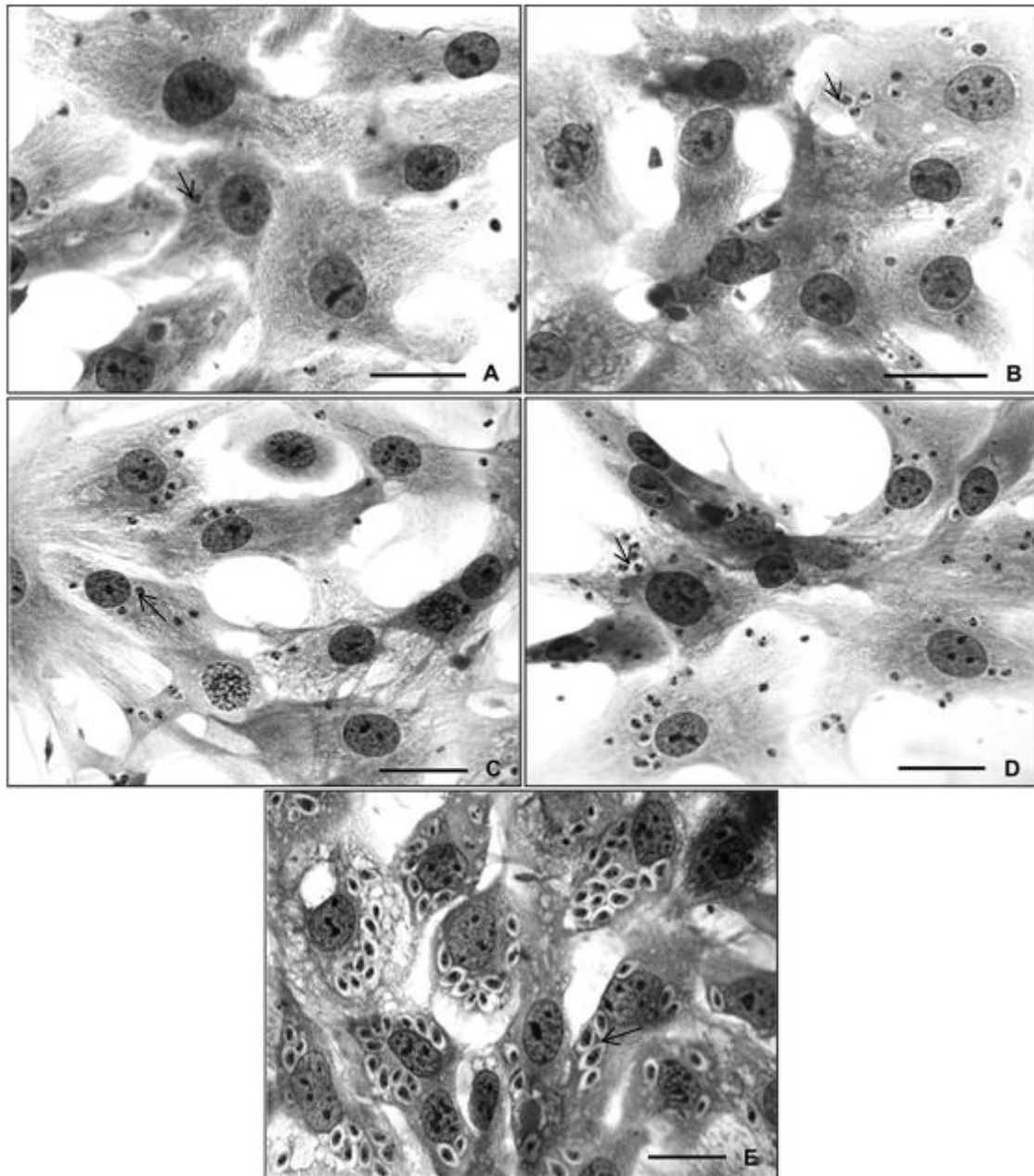


Figura 4.3 Perfil de infecção dos cardiomiócitos durante cinética de interação com *T. cruzi* visualizado por microscopia de luz após coloração pelo Giemsa. Observe o nível de infecção das culturas infectadas por 1 hora (A), 2 horas (B), 4 horas (C), 6 horas (D) e 24 horas (E). Setas= parasitas Barra= 20µm.

Para a realização dos ensaios de RNA-Seq, ressaltamos que é indispensável a utilização de RNA com alta qualidade. Assim, a aplicação do kit RNeasy para extração de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células possibilitou a obtenção de cerca de 13 a 29 µg de RNA com alta qualidade.

Destacamos ainda, a necessidade das amostras de RNAm estarem livres da fração ribossomal, que não apresenta interesse para os estudos de transcrito e constitui a maior parte do RNA presente na célula (>90%). A partir de 20 µg (10 µg de cada réplica técnica) a

fração ribossomal foi depletada com o kit RiboMinus Transcriptome Isolation (Human/Mouse) e o grau de purificação pode ser observado na Tabela 4.1, demonstrando que a fração livre de RNAr não atingiu mais do que 10,4% (2,08 µg). Após a depleção, as amostras foram divididas em 5 bibliotecas e sequenciadas, sendo o número total de leituras geradas de 664.138.967 e o número médio por amostra de 13.282.779.

Amostra	1ª réplica	2ª réplica	3ª réplica
C1	812	340	524
C2	978	696	1172
C3	380	592	2080
C4	746	438	990
C5	642	200	300
C6	226	380	716
C24	514	360	510
V1	380	566	442
V2	1176	756	922
V3	2340	1484	584
V4	2200	896	328
V5	594	280	980
V6	1272	1642	326
V24	1280	440	272

Tabela 4.1 Quantidade de RNA pós depleção de fração ribossomal (ng).
C: Cardiomiócitos não infectados; V: Cardiomiócitos infectados com *T. cruzi*, clone Dm28c, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 horas após a infecção.

4.2 Quantidade de transcritos diferencialmente expressos

Os dados iniciais de transcritos diferencialmente expressos durante infecção de cardiomiócitos com *T. cruzi* clone Dm28c, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas, produzidos após o alinhamento de 664.138.967 leituras contra o genoma de camundongo usando o SOLID™ WT Analysis Pipeline. A quantidade de genes diferencialmente expressos variou nos diferentes tempos de infecção, alcançando o máximo de 929 genes após 24 horas de infecção, conforme dispostos na Tabela 4.2.

Tempo	Número de genes
1 hora	74
2 horas	62
3 horas	70
4 horas	159
5 horas	306
6 horas	365
24 horas	929

Tabela 4.2 Número inicial de transcritos diferencialmente expressos durante interação *T. cruzi*-cardiomiócito.

Os transcritos sequenciados incluem frações restantes de RNA ribossomal, microRNAs e outros transcritos, incluindo possíveis formas de *splicing* alternativo, que foram excluídos do presente trabalho por representarem contaminação ou por não ser possível analisá-los confiavelmente pela sua baixa representatividade na amostra total. Assim, após a retirada destes transcritos, o número de genes diferencialmente expressos em cada estágio da cinética de infecção foi reduzido, alcançando um total de 1113 genes (Figura 4.4), considerando-se os genes considerados diferencialmente expressos com FDR de 10% em qualquer um dos pontos temporais analisados, apresentando uma modulação mínima de 11,35 e máxima de 161,12 vezes quando comparado à expressão dos genes na cultura controle. Evidenciamos uma crescente modulação de genes com a progressão da infecção (Figura 4.4), sendo que mudanças na expressão de genes iniciam-se logo na primeira hora de infecção e encontram-se majoritariamente expressas no tempo intermediário de infecção (24 horas). A quantidade total de genes diferencialmente expressos (n=1113) é menor do que a somatória dos que foram selecionados em cada um dos pontos temporais pois há grande intersecção entre os mesmos.

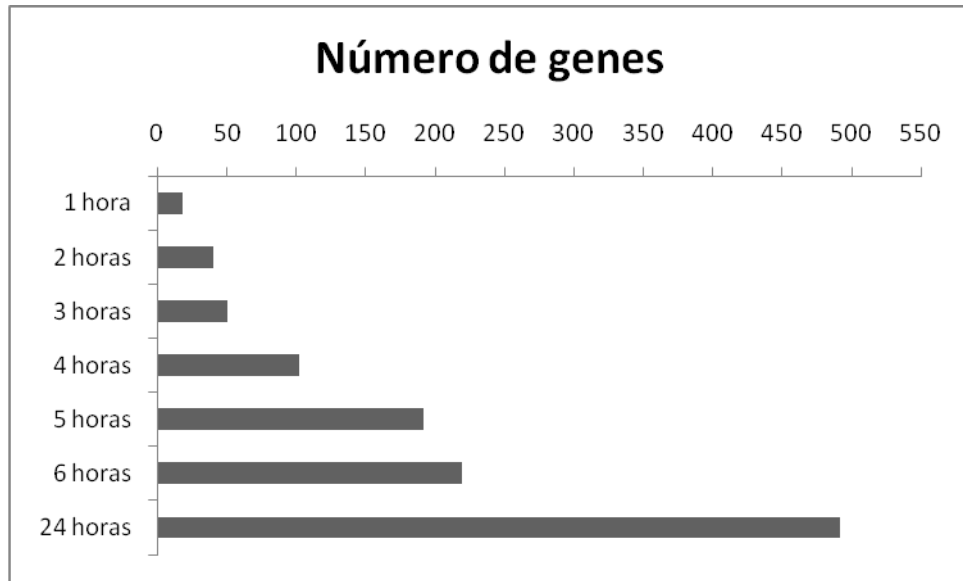


Figura 4.4 Total de genes diferencialmente expressos (DEG) durante cinética de interação com *T. cruzi*. O número de genes aumenta gradativamente ao longo da infecção - 1 hora 18 DEG, 2 horas 40 DEG, 3 horas 50 DEG, 4 horas 102 DEG, 5 horas 192 DEG, 6 horas 219 DEG, 24 horas 492 DEG.

Após a análise da expressão diferencial e temporal destes genes, evidenciamos que no estágio inicial de infecção (1 a 6 horas) ocorre principalmente modulação positiva dos genes, sendo observado genes reprimidos apenas após 3 horas de infecção (1 gene), final da fase inicial recente de infecção, e maior incidência após 24 horas de infecção com repressão de 170 genes (Figura 4.5).

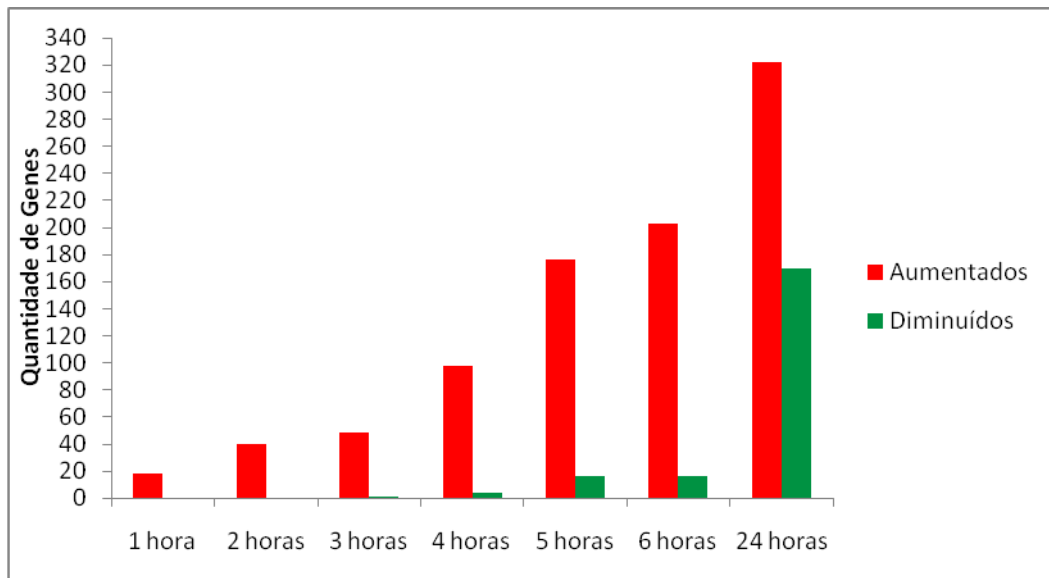


Figura 4.5 Representação gráfica da quantidade de genes diferencialmente expressos.

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 (Figura 4.6).

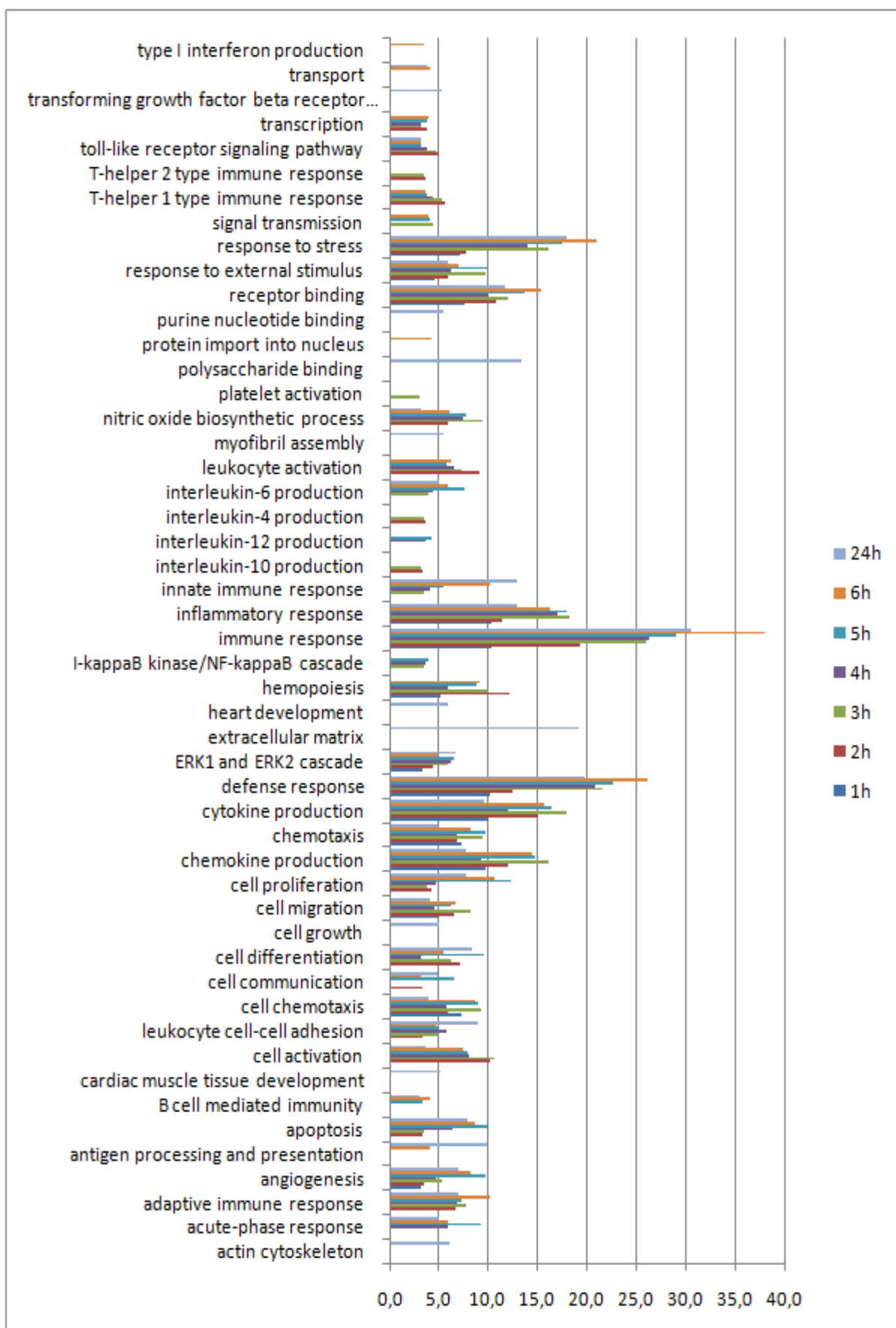


Figura 4.6 Principais funções obtidas por GO durante a cinética de infecção

Interessantemente, do total de genes induzidos grande parte dos genes modulados no estágio inicial da infecção referem-se à resposta imune, com ativação de genes que codificam para quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL16, CCL20 entre outras) e citocinas (IL1 β , IL6, TNF- α e etc), mediadores da imunidade que funcionam no recrutamento de leucócitos para os locais da infecção e participam no tráfego de linfócitos. Ainda dentro deste contexto, identificamos indução de genes que codificam para moléculas de adesão (selectina E, ICAM1 e VCAM1). Embora a modulação de genes de resposta imune seja evidente nas primeiras horas de infecção, estes genes permanecem induzidos, em sua grande maioria, durante toda a cinética de infecção. A modulação destes genes, em especial a família NF-KB, parece disparar a indução sequencial de genes envolvidos com o estresse oxidativo (Slc7a2 e NOS2) e apoptose ainda no estágio inicial recente de infecção (1 a 4 horas). Embora a indução de genes relacionados ao estresse oxidativo seja predominante na fase inicial recente de infecção (1 a 4 horas), a modulação positiva de genes relacionados à redução do estresse oxidativo (Mt1, ceruloplasmina, transferrina, GSTA1, GSTA2, GSTA3, Srxn1) também foi observada, principalmente após 5 horas de infecção.

A resposta hipertrófica se inicia no tempo inicial recente e os principais genes associados foram a IL1 β , IL6, genes pertencentes à família de NF-kappa-B, toll like 2 e grande parte deles permanece com expressão aumentada até o ponto de 24 horas quando estimulam a redução da expressão do gene GSK3B. Em relação aos genes associados à matriz extracelular estes se apresentam preferencialmente com expressão reprimida no ponto intermediário e maior destaque foi percebido naqueles associados à família de colágeno, fibronectina 1, BGN e elastina.

A modulação de genes para apoptose é bastante heterogênea. Ambos, indução e repressão de genes são evidenciados nos diferentes estágios de infecção. Genes representantes de eventos anti-apoptótico (serpinas, membros anti-apoptóticos família BCL2, IRF5, MAP3K8, BCL3, TNFAIP3, NGF) encontravam-se induzidos principalmente no estágio inicial recente (1 a 4 horas), mas intercalam-se com a ativação de genes pró-apoptose (IRF1, Bid, ZC3H12A) ainda neste estágio de infecção. Apenas a partir da fase inicial tardia (5 a 6 horas) os genes relacionados à cascata de sinalização pró-apoptose (FAS, CD47, NGTTR75, ACIN1 reticulon 1, caspase 4, IFIT2, ZFP36L2 OASL1, OASL2, OAS1) possuíam destaque no perfil de genes induzidos.

Com relação a genes que codificam para proteínas do citoesqueleto, identificamos uma modulação discreta, com poucos genes diferencialmente expressos nos momentos iniciais da

infecção (1 a 2 horas). No entanto, neste período, destaca-se a ativação do gene IP3KB provavelmente envolvido no processo de invasão. Ainda, observamos que os genes relacionados com a conservação da citoarquitetura se apresentavam modulados negativamente desde o estágio inicial tardio (5 a 6 horas) até a fase intermediária de infecção (24 horas) onde predomina a multiplicação intracelular dos parasita. Entre os genes com expressão reprimida relacionados com citoesqueleto encontram-se os membros da família de actina e miosina e ainda, genes estruturais constituintes de junções celulares (RND1, NKD1) que promovem a interface célula-célula e célula-matriz extracelular.

Os genes associados às mitocôndrias apresentaram um padrão heterogêneo de expressão acontecendo especialmente após 4 horas de infecção quando ocorreu redução em BDH1, ALDH1A1 e ALDH1A7 e aumento em ATP5H, citocromo B (MT-CYB), MT-ND4, MT-ND4L, ALD3HB1 e ALDH3A1.

4.3 Agrupamento dos genes

Nas metodologias em larga escala os sistemas de análises por agrupamento de genes permitem selecionar os dados de acordo com os seus padrões de expressão facilitando a visão dos mesmos; estes métodos organizam mas não alteram os dados primários (Eisen *et al.*, 1998).

Os genes foram agrupados em 24 clusters, conforme pode ser visto na Figura 4.7.

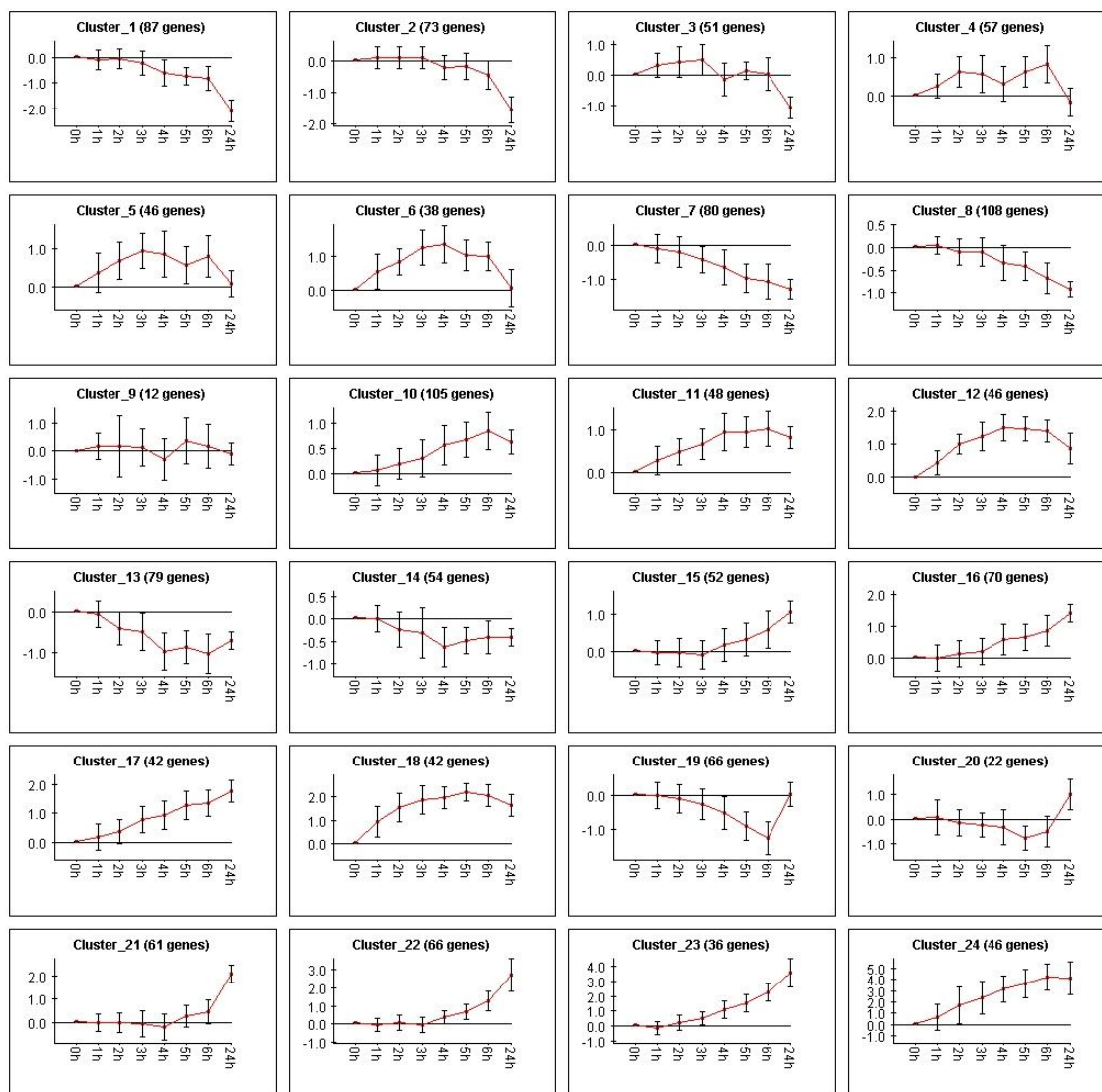


Figura 4.7 Padrão de Clusterização dos genes diferencialmente expressos
 Divididos em 24 clusters. Cada cluster está representado em log₂, eixo X e Y.

Os genes sobrerepresentados em cada um dos grupos foram identificados utilizando a classificação de termos *Gene Ontology*, usando o programa *Expander5*.

Passaremos agora a descrever os padrões gerais dos agrupamentos (*clusters*) de acordo com o seu padrão similar de expressão diferencial.

4.3.1 Clusters 12 e 18

A Figura 4.8 representa os clusters 12 e 18 que contém 46 e 42 genes, respectivamente, com padrão de aumento de expressão desde 1 hora de infecção com leve declínio no ponto de 24 horas.

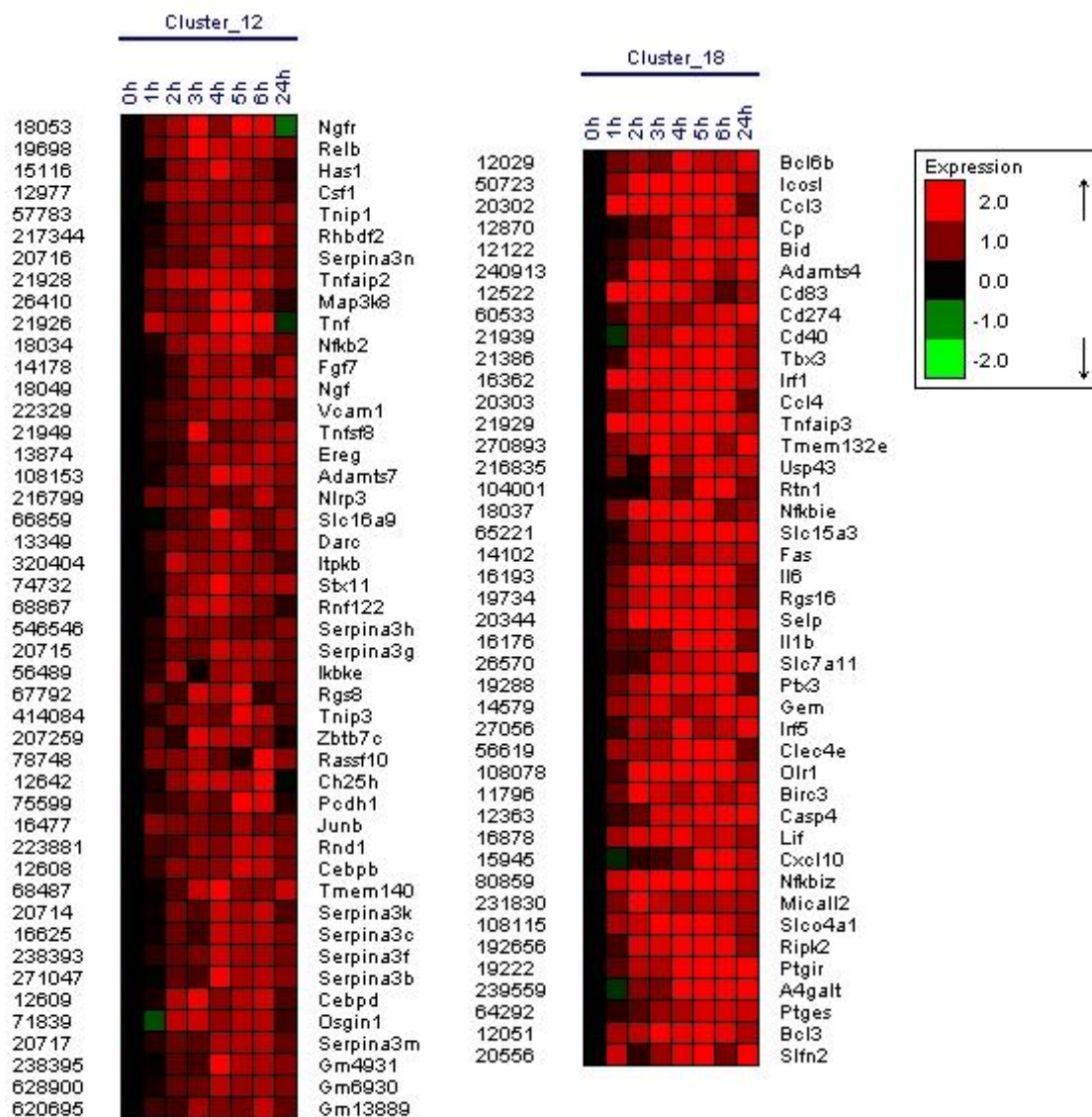


Figura 4.8 Representação gráfica dos clusters 12 e 18

O cluster 12 apresenta-se enriquecido em genes relacionados ao espaço extracelular ($n=12/46$, $p=0,002$), contendo especialmente genes relacionados à resposta ao estímulo por citocinas ($n=7/46$, $p=0,001$) e outro conjunto relacionado à regulação da comunicação celular ($n=7/46$, $p=0,049$).

Nos conjuntos associados ao espaço extracelular e à resposta ao estímulo por citocinas encontram-se parte dos membros da família das serpinas e entre os genes relacionados com a comunicação celular estão Ngf, Csf1, TNF, e RGS8 como exemplos.

No cluster 18 houve enriquecimento em genes associados à resposta imune ($n=16/42$, $p=0,001$), especialmente regulação de produção de citocinas ($n=8$, $p=0,001$) e ainda associados ao processo de apoptose ($n=7$, $p=0,007$). Genes associados à apoptose como FAS,

um indutor, e TNFAIP3, com função contrária, além de citocinas como IL6 e IL1 β e quimiocinas como CXCL10, estão neste cluster

4.3.2 Clusters 4 e 5

A

Figura 4.9 representa os clusters 4 e 5, que contem 57 e 46 genes, respectivamente, que apresentam expressão aumentada desde o tempo inicial da cinética de infecção, mas retornando ao estado basal ou apresentando leve aumento no estágio tardio de infecção (24 horas).

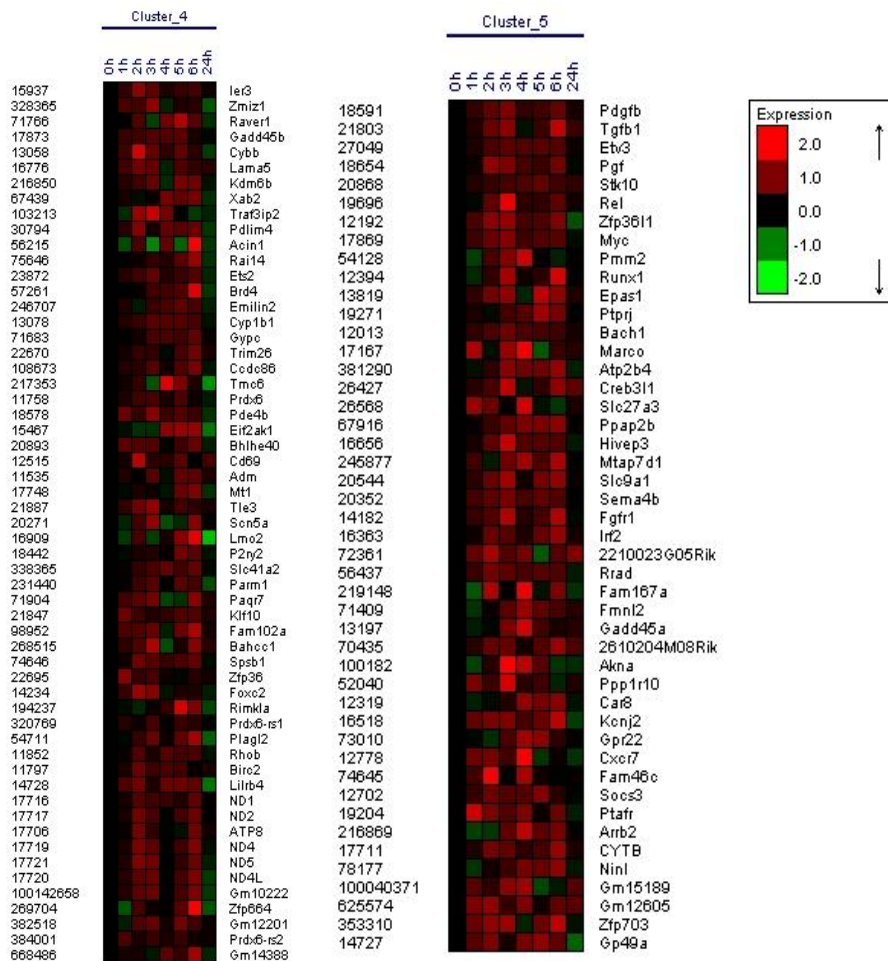


Figura 4.9 Representação gráfica dos clusters 4 e 5

No cluster 4 observa-se enriquecimento de genes associados às mitocôndrias (n=11/57, p= 0,021), especialmente associados à atividade de oxidoreductase (n=9, p=0,008) e NAD desidrogenase (n=5, p=0,001). Como exemplos de genes associados à atividade de oxidoreductase podemos citar ND4, ND4L, ND5 e Cybb.

No cluster 5, observou-se enriquecimento de genes associados à ligantes de DNA (n=12/46, p=0,007) e com atividade regulatória da transcrição (n=11/46, p=0,001). Os principais genes associados à estas funções foram Irf2, Rel, Myc e Runx1.

4.3.3 Cluster 6

O cluster 6 contém 38 genes, e apresenta padrão de expressão gênica similar ao cluster 4 e 5, sendo que seu perfil de expressão diferencial está representado na Figura 4.10

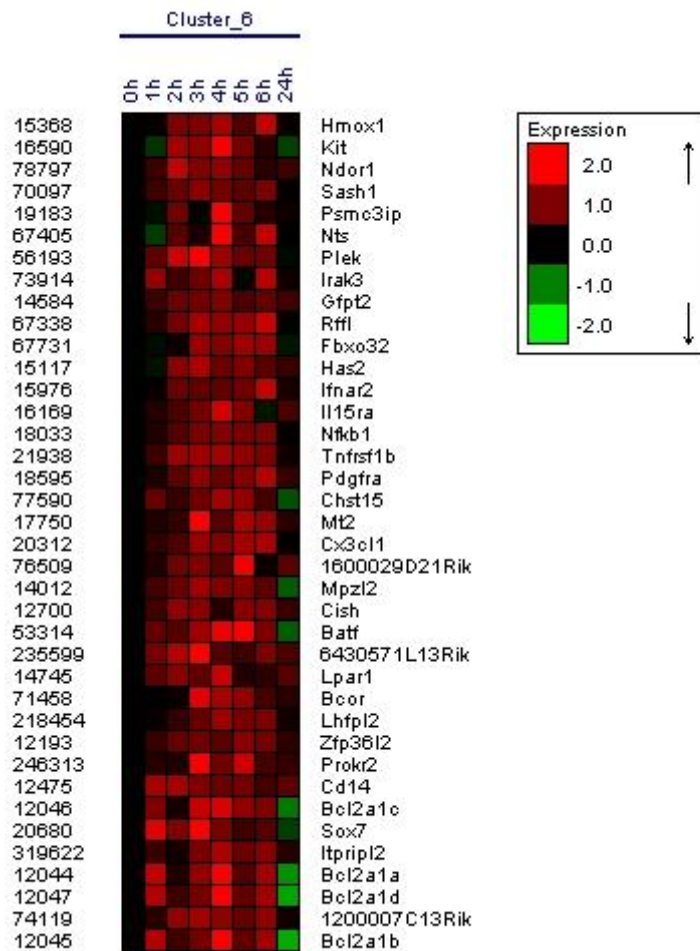


Figura 4.10 Representação gráfica do cluster 6

No cluster 6, encontrou-se maior enriquecimento de genes relacionados à regulação de processos metabólicos (n=12/38, p=0,018), além de, morte celular (n=6/38, p=0,044) e regulação da produção de citocinas (n=4/38, p=0,036). Um dos genes modulados é NF-kappa-B1, associado a regulação de produção de citocinas e morte celular, além de Irak3, que também associava-se aos dois últimos processos e ainda, um importante gene relacionado apenas à morte celular, Bcl2a1.

Nos genes do cluster 10 observa-se associação com os termos do *Gene Ontology* localização (n=26/105, p=0,001), resposta ao estímulo (n=23/105, p=0,001) e processo de apoptose (n=9/105, p=0,034). Os principais genes associados à localização foram Abcc4, Brdt, Cd47, Frr71, Grik4, Rab32 e Rab43. Dentre os genes relacionados a resposta ao estímulo encontramos Jak2, Fos, Cd47 e IFI47; e ao processo de apoptose, os genes Traf4, Traf2, Mnt, Pml e Trp53.

O cluster 11 não apresentou enriquecimento funcional dos genes.

4.3.5 *Clusters 16 e 17*

Os clusters 16 e 17, representados na Figura 4.12, contém 70 e 42 genes, respectivamente, apresentando aumentos de expressão gradativos durante a cinética de infecção, culminando no ponto de 24 horas.

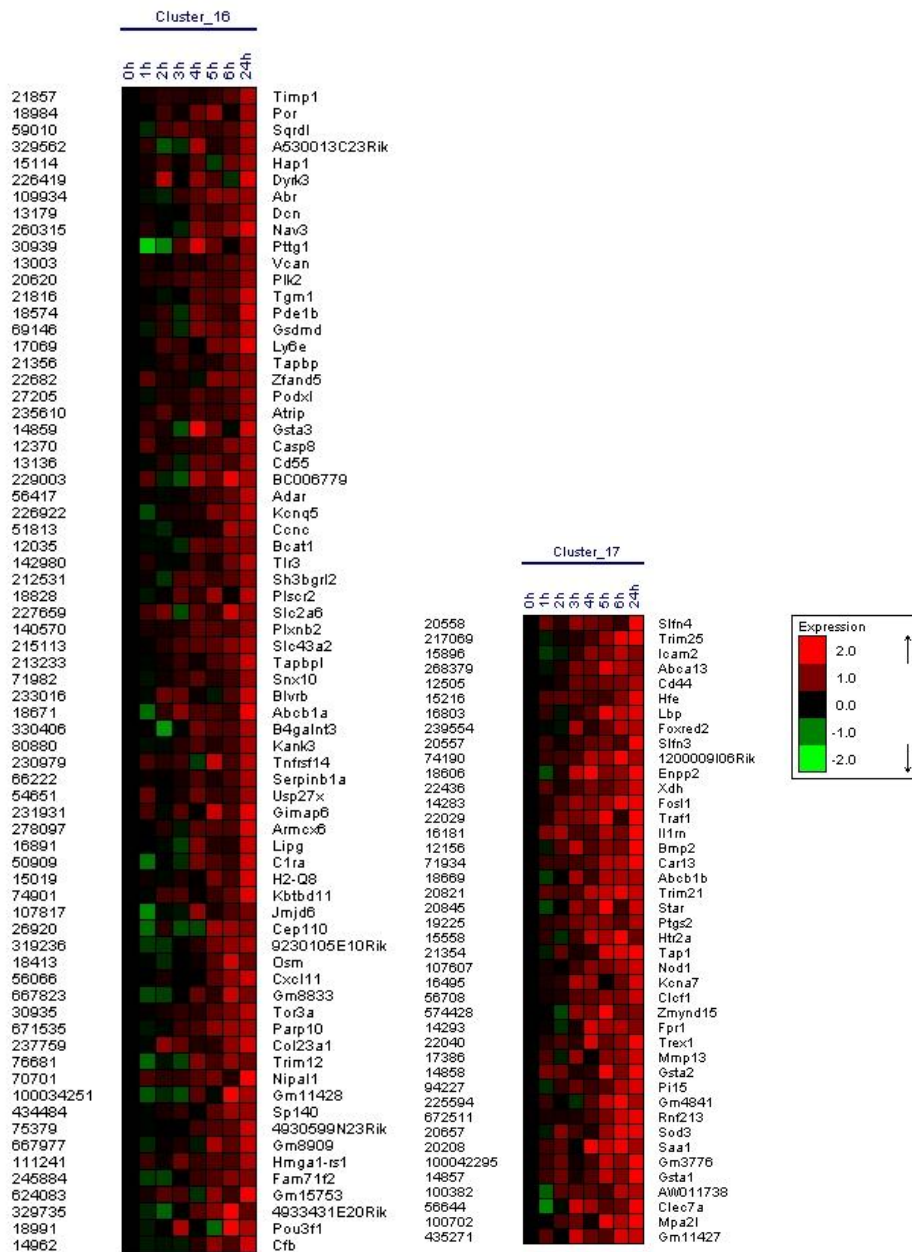


Figura 4.12 Representação gráfica dos clusters 16 e 17.

No cluster 16 observa-se enriquecimento em genes associados ao sistema imune ($n=15/70$, $p=0,001$) especialmente relacionados com apresentação de antígenos ($n=4/70$, $p=0,001$). Como exemplos de genes relacionados ao sistema imune, temos Cd55, CXCL11, Timp1, e dentre os genes relacionados à apresentação de antígenos, H2-Q8, Gm8909 e Tapbp.

O cluster de número 17 apresentou enriquecimento em genes associados à resposta aos estímulos ($n=14/42$, $p=0,001$) especialmente externos ($n=8/42$, $p=0,001$) e à defesa ($n=7/42$, $p=0,007$). Os principais exemplos de genes associados aos estímulos foram Saa1, Fosl1, Ptgs2, Cd44, Tap1 e Bmp2.

4.3.6 Clusters 23 e 24

Os clusters 23 e 24 contém 36 e 46 genes, respectivamente, e apresentam padrão muito similar ao cluster 16 e 17, sendo que sua representação está na Figura 4.13.

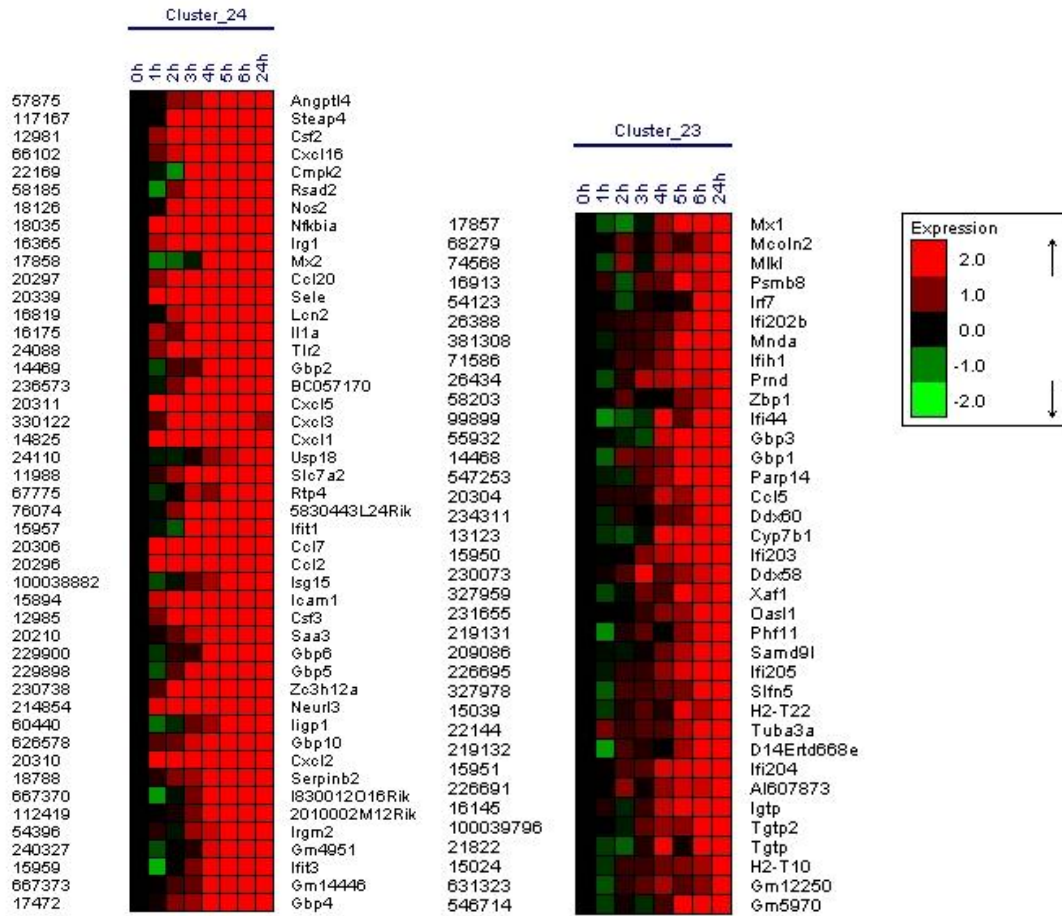


Figura 4.13 Representação gráfica dos clusters 23 e 24.

No cluster 23 observa-se enriquecimento em genes associados à resposta imune ($n=7/36$, $p=0,001$), atividade de GTPase ($n=6/36$, $p=0,001$) e resposta a vírus ($n=5/36$, $p=0,001$). Os principais genes associados à atividade de GTPase foram MX1, Gbp1 e Tgtp.

No cluster 24 o enriquecimento observado está relacionado à resposta aos estímulos ($n=23/46$, $p=0,001$) especialmente à resposta inflamatória ($n=12/46$, $p=0,001$), atividade de quimiocinas ($n=8/46$, $p=0,001$) e de citocinas ($n=11/46$; $p=0,001$). Os principais genes relacionados à resposta inflamatória modulados foram CXCL3, CCL7, CXCL12, NOS2, CXCL5, Slc7a2, IL1 α , CCL20, CXCL1, CCL2 e TLR2.

4.3.7 Clusters 15, 21 e 22

Os clusters 15, 21 e 22 apresentam 52, 61 e 66 genes, respectivamente, com perfil de aumento nos estágios finais da cinética de infecção e estão representados na Figura 4.14.

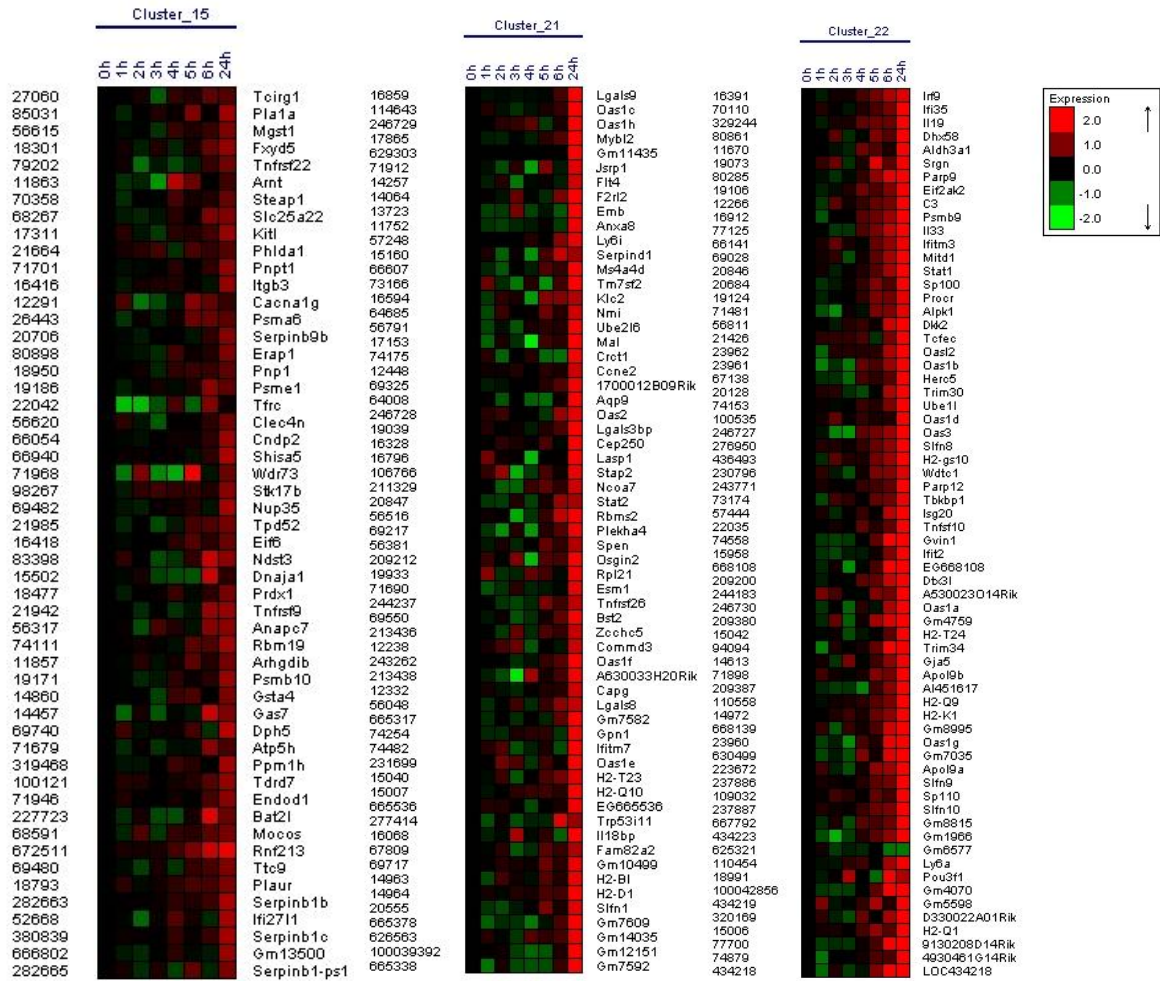


Figura 4.14 Representação gráfica dos clusters 15, 21 e 22.

No cluster 15, observa-se enriquecimento de genes associados a envelopes de organelas (n=7/52), como Mgts1, Shisa5, Pnpt1 e Nup35.

No cluster 22, há enriquecimento de genes associados à resposta imune (n=12/66, p=0,001) e processamento e apresentação de antígenos (n=5/66, p=0,001). Exemplos de genes relacionados à estas funções são OAS1b, H2-Q1, H2-K1, Sp110 e Stat1.

O cluster 21 não apresentou enriquecimento funcional de genes.

4.3.8 Clusters 7 e 8

Os clusters 7 e 8 contém 80 e 108 genes, respectivamente, representados na Figura 4.15, que apresentam diminuição gradativa no padrão de expressão até o ponto de 24 horas.

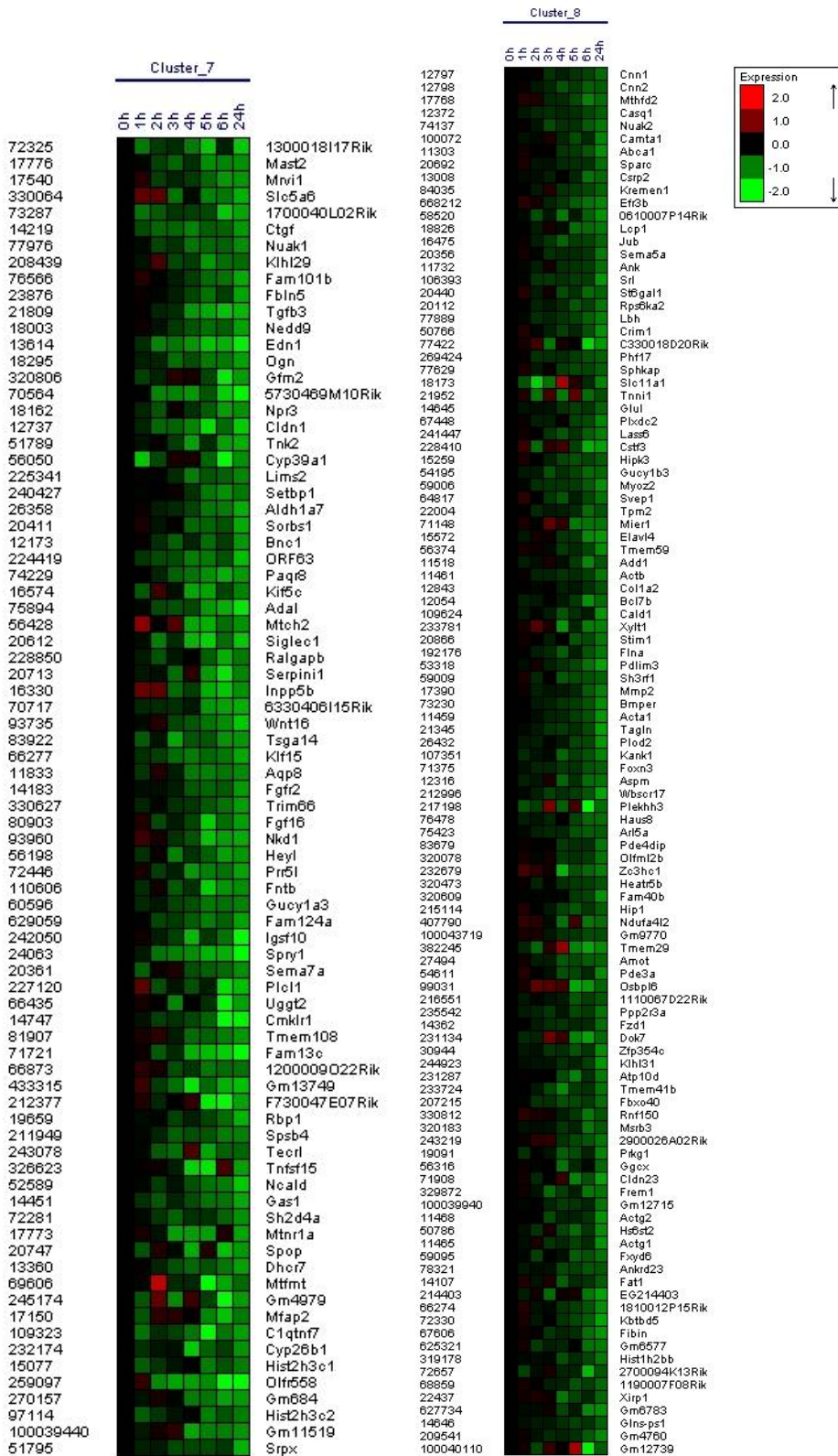


Figura 4.15 Representação gráfica dos clusters 7 e 8.

No cluster 7, observa-se enriquecimento de genes associados à região extracelular (n=15/80). Exemplos dos genes relacionados são Ctgf, Fgf16, Edn1, Serpini1, Wnt16 e Fln5.

No cluster 8, há enriquecimento funcional de genes associados à organização celular (n=22/108, p=0,001) e ao citoesqueleto (n=17/108, p=0,001).

Entre os exemplos de genes relacionados à organização celular podemos citar Prkg1, Hip1, Fat1, Cnn1, Cnn2 e Add1; e relacionados ao citoesqueleto estão Plekhh3, Cald1, Actb, Actg2, Actg1 e Acta1.

4.3.9 Clusters 1 e 2

Os clusters 1 e 2, representados na Figura 4.16, apresentam 87 e 73 genes, com expressão levemente reduzida até 6 horas de infecção, com forte acentuação em 24 horas.

No cluster 1, os genes enriquecidos associam-se à região extracelular (n=27/87, p=0,001) especialmente matriz extracelular (n=10/87, p=0,001) e membrana plasmática (n=21/87, p=0,008). Entre os genes associados à região extracelular, encontramos Wisp2, Trem2, Spon2, Apoe, Timp3; membrana plasmática, F2r, Diras2, Cx3Cr, Itgb11 e Itga8; e ainda genes associados à matriz extracelular, como Adamts12, Col6a3, Ccdc80 e Mfap4.

No cluster 2, os genes enriquecidos associam-se à região extracelular (n=23/73, p=0,001) especialmente à membrana plasmática (n=22/73, p=0,001) e relacionam-se à função de adesão biológica (n=13/73, p=0,001). Exemplos de genes corregulados associados à região extracelular especialmente relacionados com funções de membrana e adesão foram Aspnl, Col5a2, Col11a1, Col6a2, Col14a1, Col15a1, Adam12, Stab1 e Ptn.

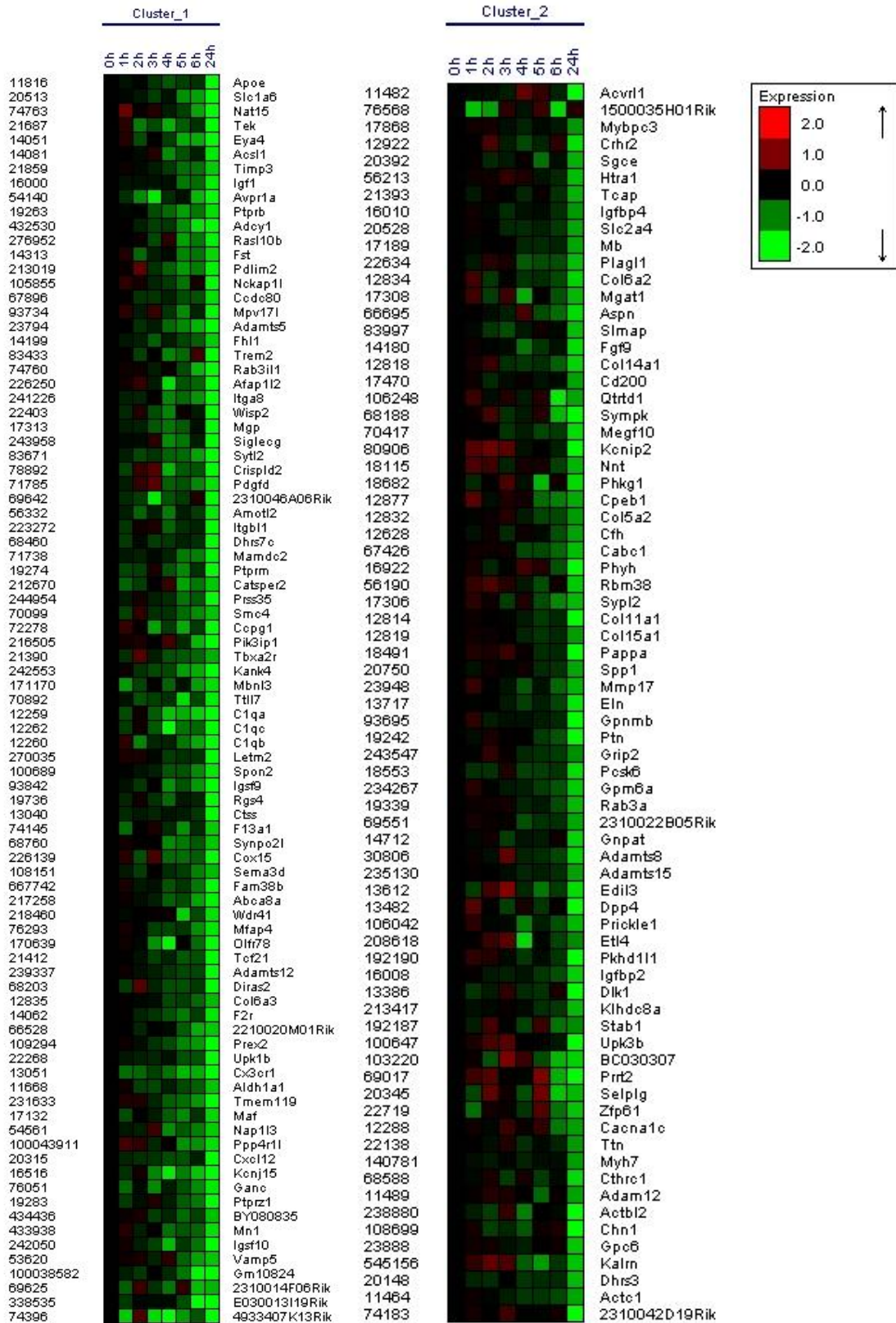


Figura 4.16 Representação gráfica dos clusters 1 e 2.

4.3.10 Clusters 13 e 14

A Figura 4.17 representa os clusters 13 e 14 que contém 79 e 54 genes, respectivamente, que apresentam diminuição preferencialmente em 4 horas de infecção, mantendo-se desta maneira nos estágios subsequentes.

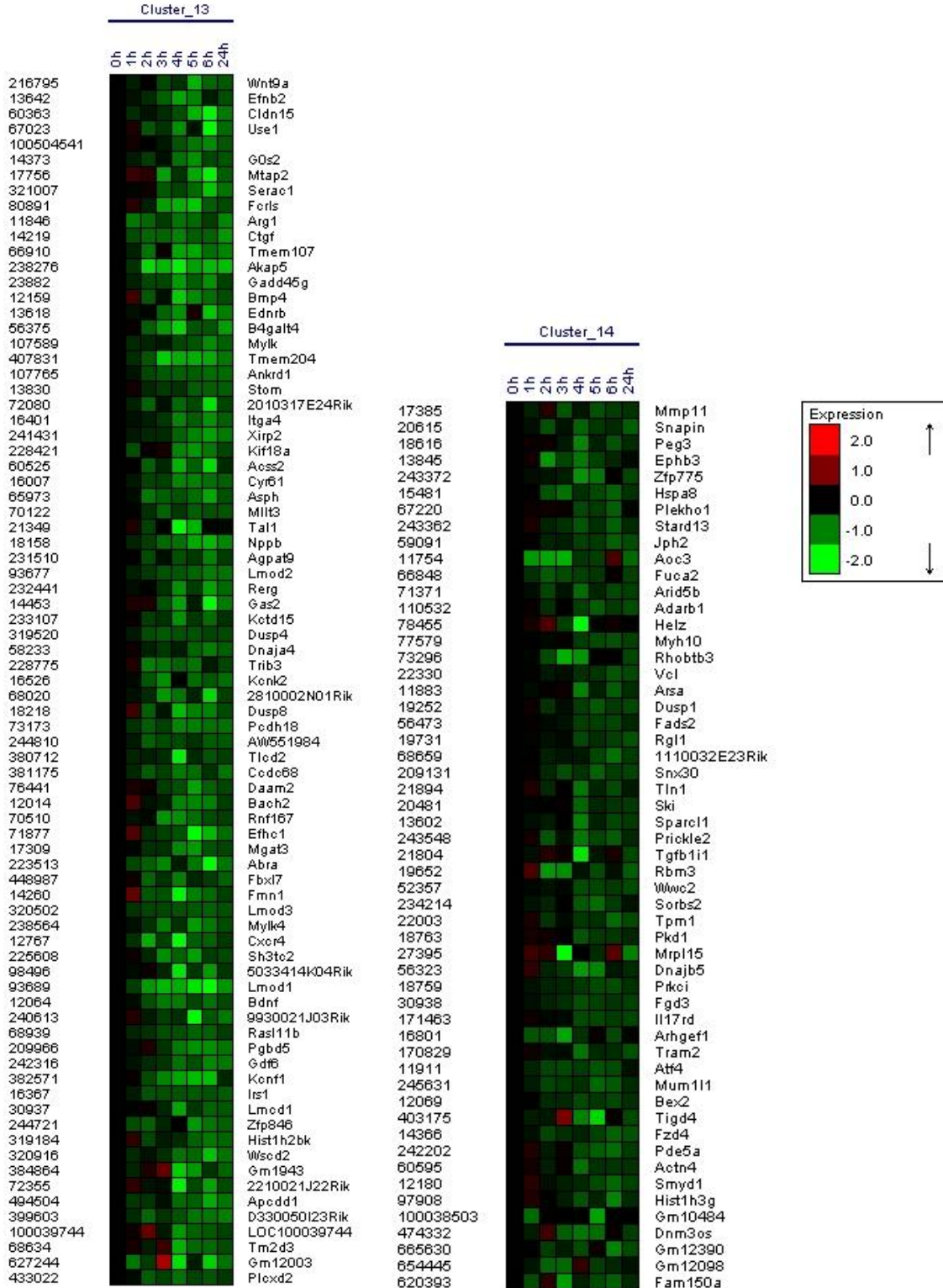


Figura 4.17 Representação gráfica dos clusters 13 e 14.

O cluster 13 apresenta-se enriquecido em genes que codificam proteínas ligadoras do citoesqueleto (n=8/79, p=0,008) como Xirp2, Daam2, Abra, Lmod2 e Lmod1.

Não foi identificado enriquecimento funcional nos genes constituintes do cluster 14.

4.3.11 Cluster 19

A Figura 4.18 representa o cluster 19 que apresenta 66 genes diminuídos até o estágio de 6 horas de infecção e no estágio intermediário de infecção (24 horas) apresentam a maior parte sem modulação.

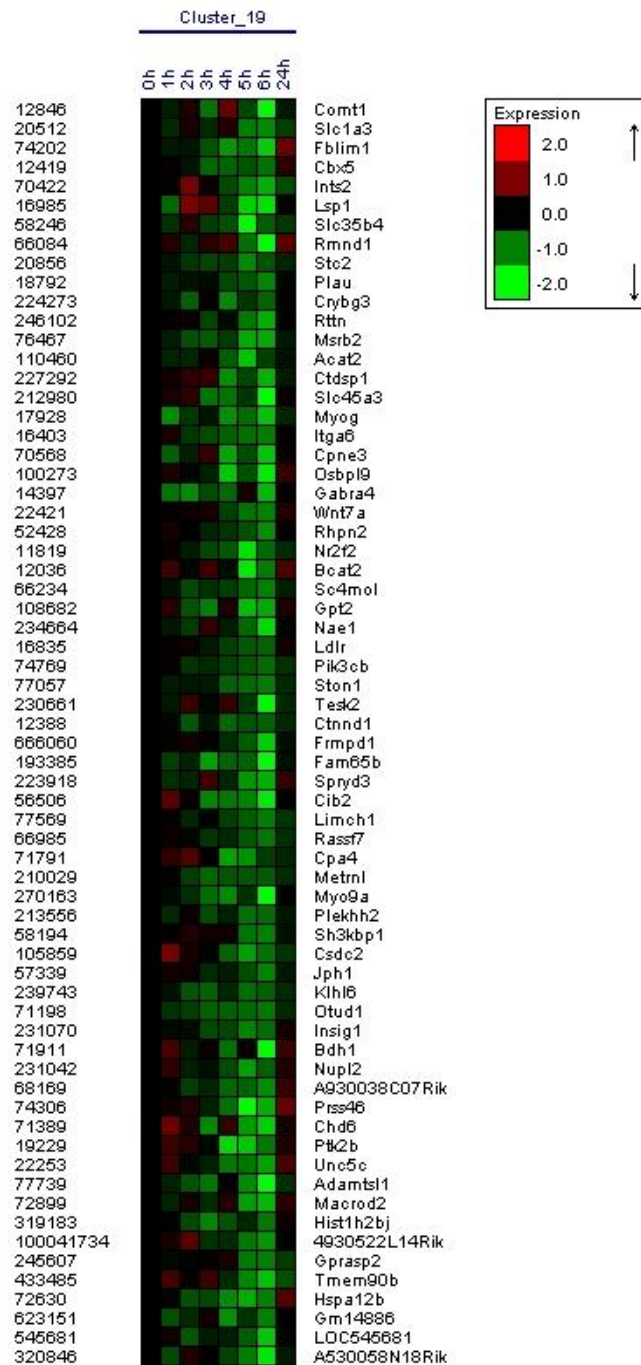


Figura 4.18 Representação gráfica do cluster 19.

4.3.12 Cluster 3

A Figura 4.19 representa o cluster 3 com 51 genes que apresentam padrão de expressão gênico oscilante por toda a cinética de infecção e diminuição no estágio intermediário de infecção (24 horas).

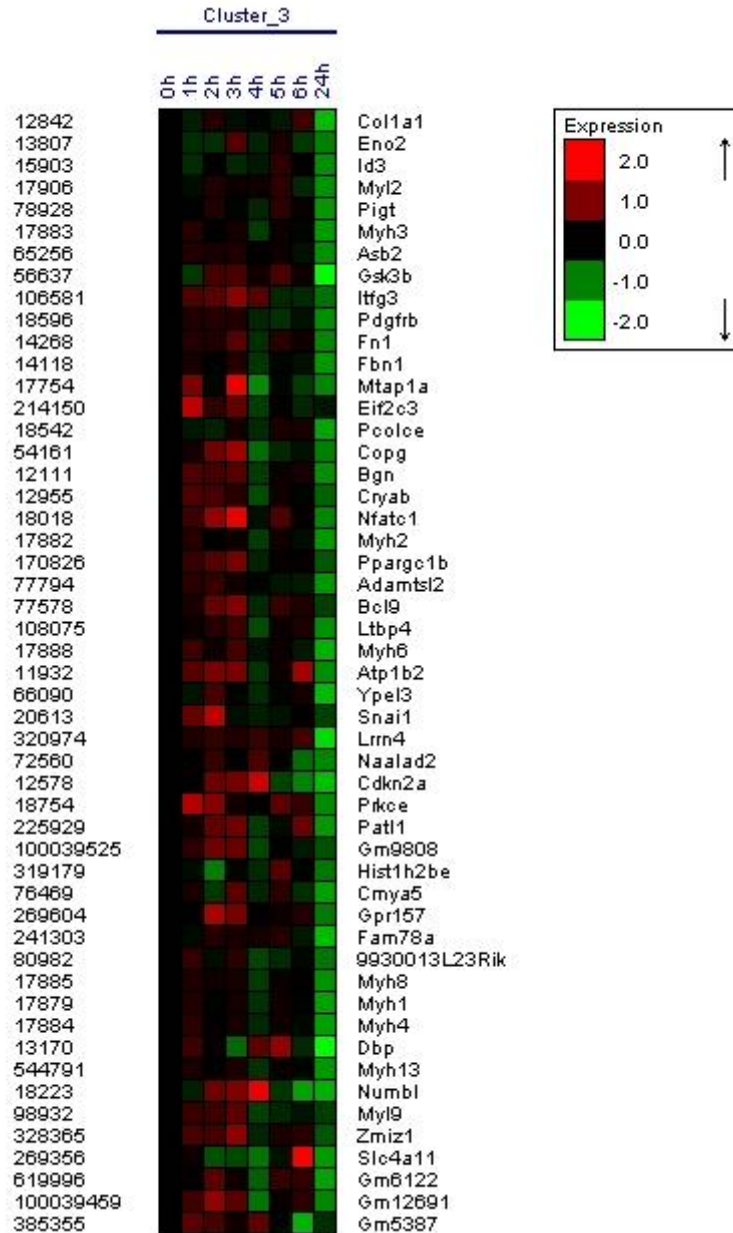


Figura 4.19 Representação gráfica do cluster 3.

O cluster 3 apresenta enriquecimento em genes associados às organelas ($n=14/51$, $p=0,012$), complexo de miosina ($n=8/51$, $p=0,001$) e matriz extracelular ($n=6/51$, $p=0,017$). Os genes associados às organelas neste cluster foram principalmente Copg e Pigt. Associados ao complexo do miosina podemos citar Myh2, Myh3, Myh4, Myh, Myh8, Myh1, Myl9. Além

disso, neste cluster também apresentaram-se agrupamentos com genes associados à matriz como Colla, FBN1, FN1.

4.3.13 Cluster 20

A Figura 4.20 representa o cluster 20 que apresenta padrão de diminuição da expressão gênica nos tempos intermediários da infecção e aumento em 24 horas, mas tendo grande heterogeneidade em seu padrão interno. Não foi identificada associação significativa com termos funcionais do *Gene Ontology* para esse cluster.

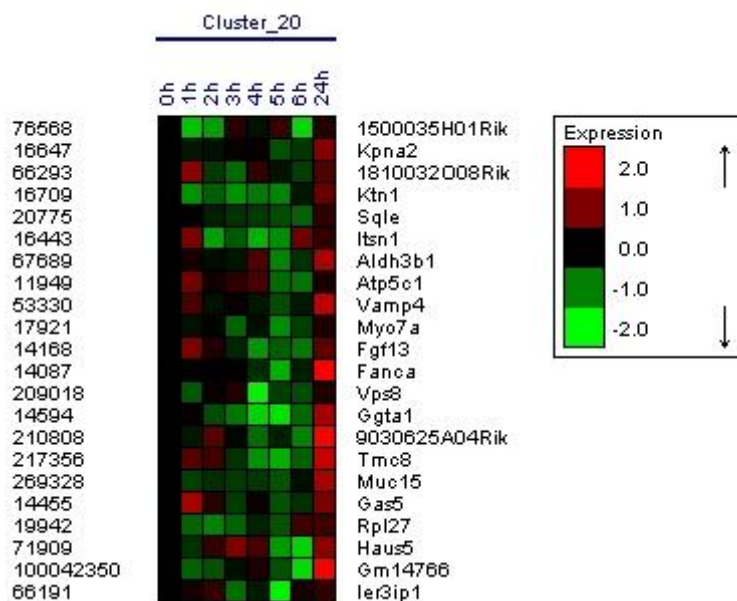


Figura 4.20 Representação gráfica do cluster 20.

4.3.14 Cluster 9

A Figura 4.21 é a representação do cluster 9 que apresenta padrão de expressão gênica oscilante por toda a cinética de infecção.

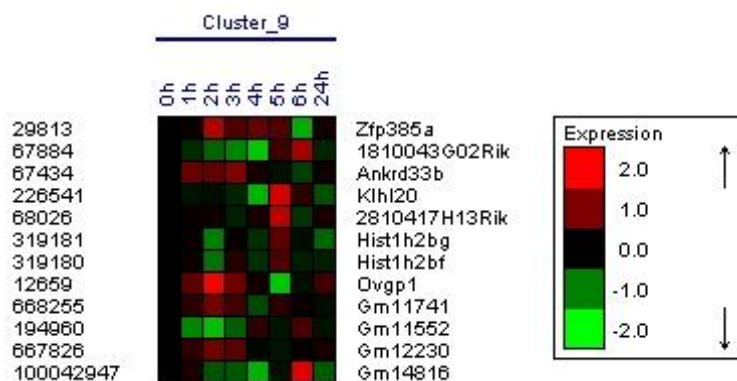


Figura 4.21 Representação gráfica do cluster 9

4.3.15 *Análise integrada de clusters*

De maneira geral, os clusters com expressão gênica aumentada (12, 16, 17, 18, 23, 24) apresentam enriquecimento de genes associados à resposta imune e à estímulos externos, como estresse ou infecção. Os clusters com padrão diminuído (1, 2, 3, 7, 8, 13, 14, 19 e 20) apresentam sobre-representação de genes relacionados à região extracelular, membrana plasmática e citoesqueleto.

Essa associação forte entre o sentido da modulação e a categoria funcional a qual os genes pertencem reforça a significância dessa associação para o melhor entendimento da resposta do cardiomiócito à infecção por *T. cruzi*.

4.4 Redes gênicas selecionadas no ponto de 24 horas pós-infecção.

Devido ao maior grau de informação associado ao ponto de 24 horas de infecção, fizemos uma análise mais detalhada de seu padrão de regulação. Esse maior grau de informação se refere a diversos fatores, como: o maior número de genes diferencialmente expressos, o que agrega robustez às análises estatísticas de associação funcional; maior número de células infectadas, o que torna as modulações obtidas mais uniformes e mais representativas da resposta média dos cardiomiócitos; o fato de que o processo infeccioso já encontra-se avançado e estamos avaliando, portanto, uma representação mais estabelecida da interação parasita-hospedeiro. Para os dados desse ponto temporal, construímos redes gênicas que permitem demonstrar as alterações ocasionadas na célula hospedeira deste processo.

Foram identificadas 16 redes de interações gênicas estatisticamente significativas no estágio intermediário de infecção (24 horas), as quais possuem conexões entre si conforme demonstrado na Figura 4.22.

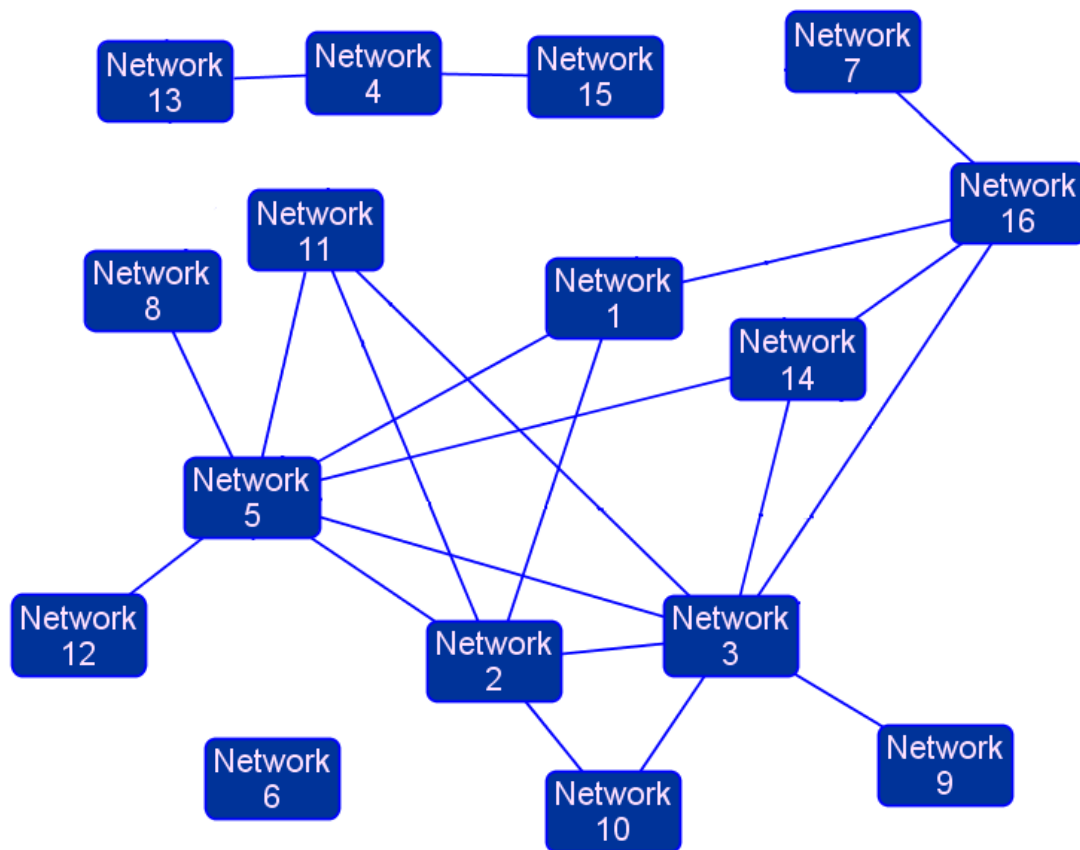


Figura 4.22 Representação esquemática da conexão entre as redes.

4.4.1 Rede gênica 1

A rede gênica 1 (Figura 4.23) associa-se à resposta imune e inflamatória onde grande parte dos genes encontra-se com expressão aumentada. No centro está o gene IRF1 e somente o complexo de NF-kappa-B, IFN-gama, Cbp e lymphotoxin-alpha1-beta-2 não estão modulados.

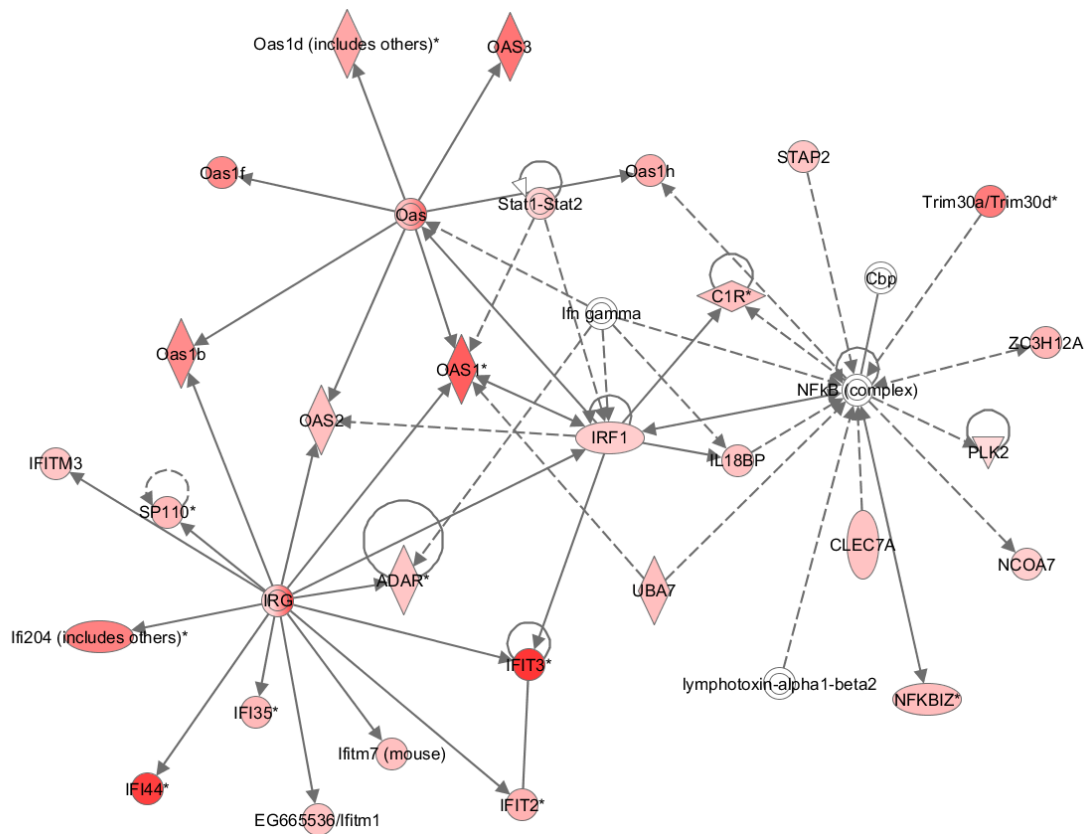


Figura 4.23 Rede gênica 1

4.4.2 Rede gênica 2

Na Figura 4.24 está a rede gênica 2 associada ao metabolismo de ácidos nucleicos. O gene central não se encontra modulado, entretanto a maior parte dos genes apresenta expressão aumentada com apenas 4 exemplos de expressão reduzida.

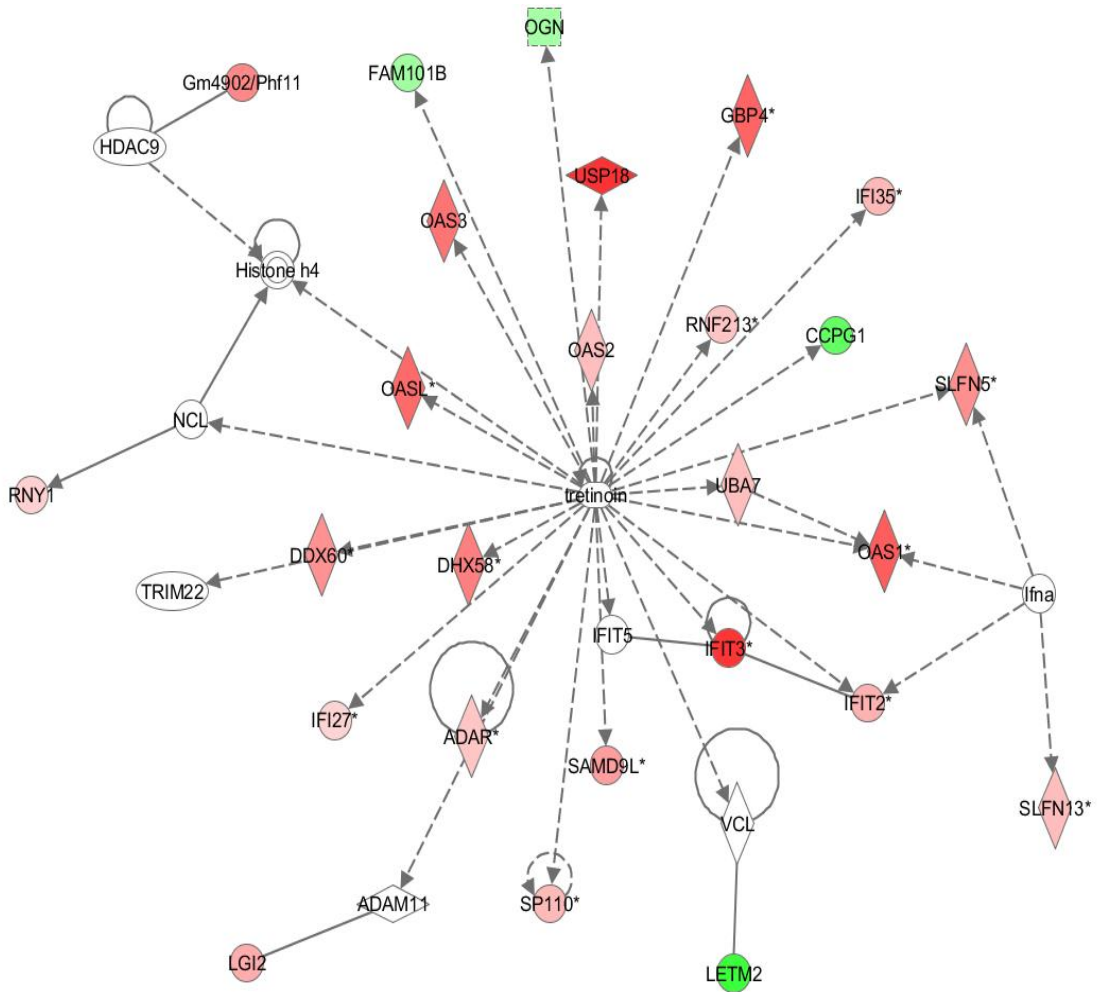


Figura 4.24 Rede gênica 2

4.4.3 Rede gênica 3

Na rede gênica 3, Figura 4.25, os genes associam-se preferencialmente à sinalização celular e a interação. O gene central não encontra-se modulado e existe alternância entre genes com expressão aumentada e não modulados com baixo número de genes com expressão reduzida.

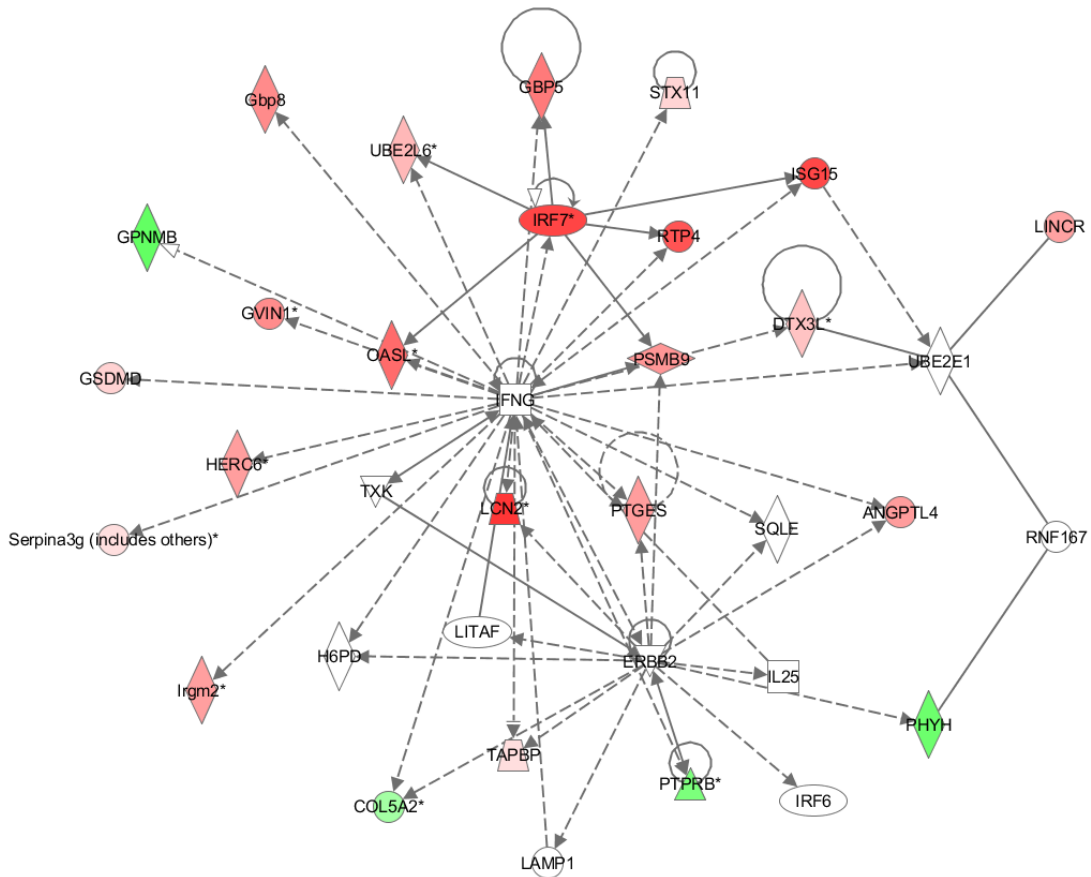


Figura 4.25 Rede gênica 3.

4.4.4 Rede gênica 4

Na Figura 4.26 está representada a rede gênica 4 com genes associados preferencialmente a desordens do tecido. O centro da rede não se encontra modulado e a grande maioria dos genes apresentam-se com expressão diminuída.

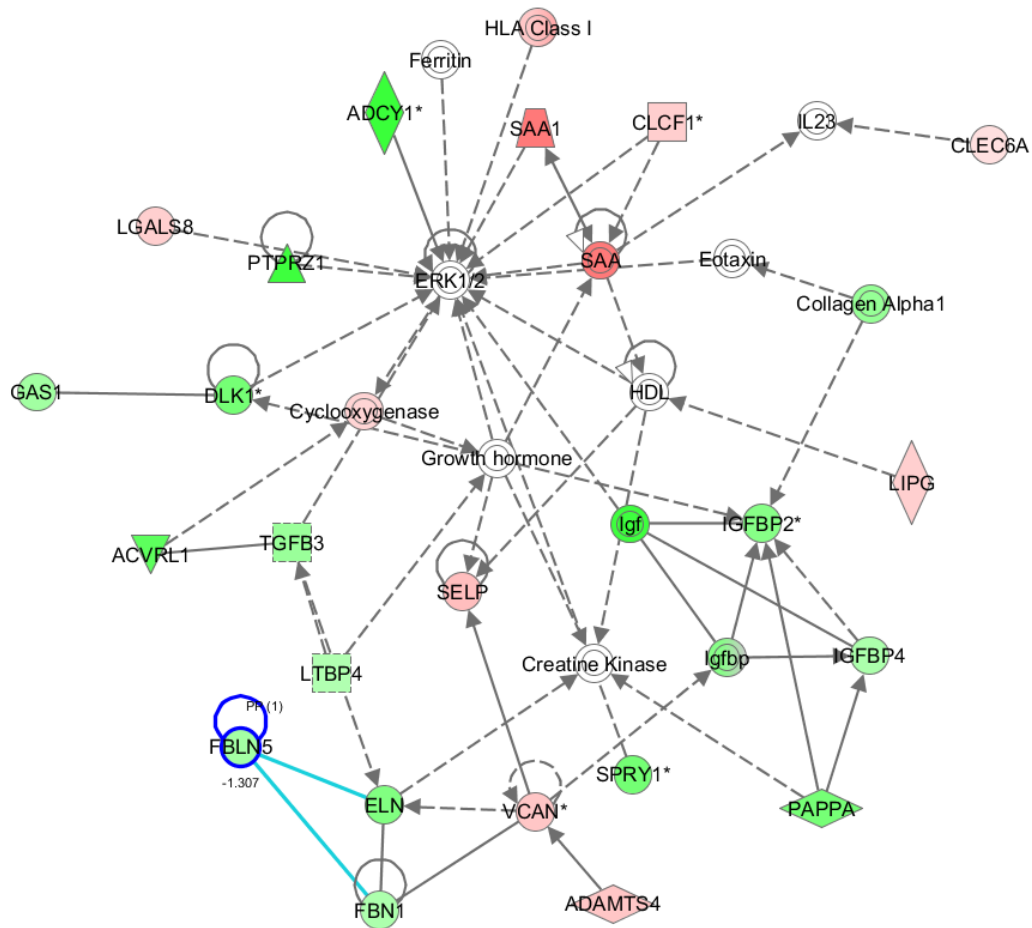


Figura 4.26 Rede gênica 4.

4.4.5 Rede gênica 5

A rede gênica 5, Figura 4.27, associa-se à desordens do tecido. O gene central é o TNF e percebemos a redução em genes associados ao colágeno e outros genes com expressão aumentada.

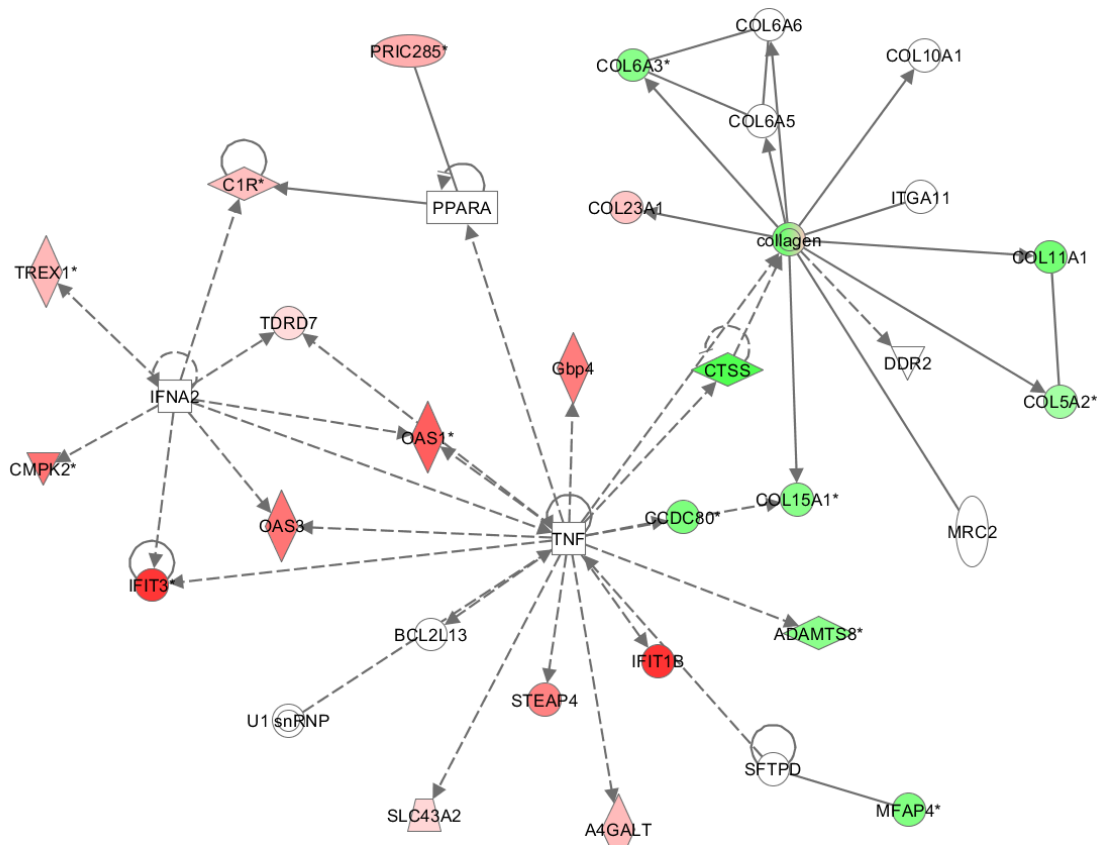


Figura 4.27 Rede Gênica 5.

4.4.6 Rede gênica 6

Na rede gênica 6, Figura 4.28, verificamos genes relacionados à sinalização, interação celular e pequenas moléculas associadas à bioquímica celular. Aumento na expressão de NF-kappa-B que está no centro e as pequenas moléculas sintetizadas podem estar associadas ao óxido nítrico sintetizado pela via de NOS2 que encontra-se aumentada.

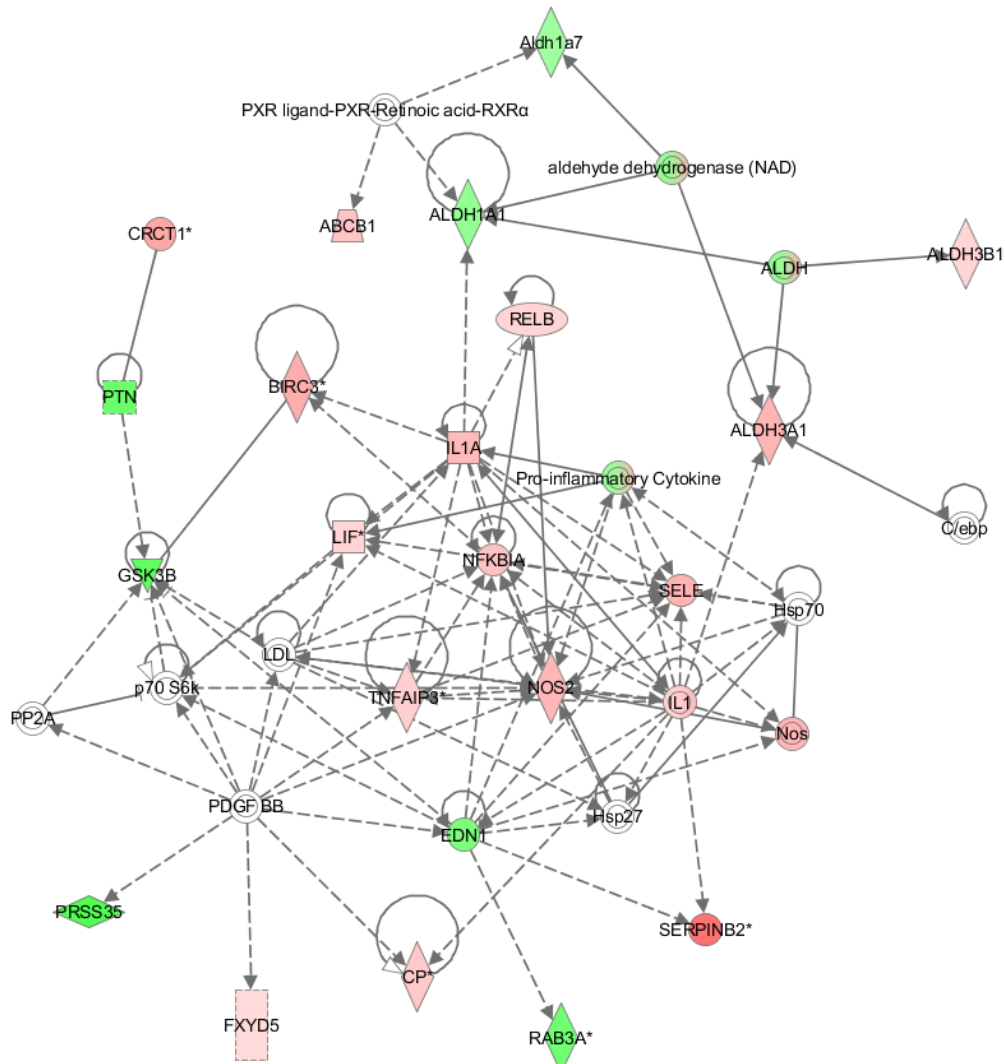


Figura 4.28 Rede gênica 6.

4.4.8 Rede gênica 8

A Figura 4.30 representa a rede gênica 8 responsável por genes envolvidos com a função do músculo cardíaco e doenças cardiovasculares. A miosina centraliza a rede e muitos genes da família apresentam expressão diminuída.

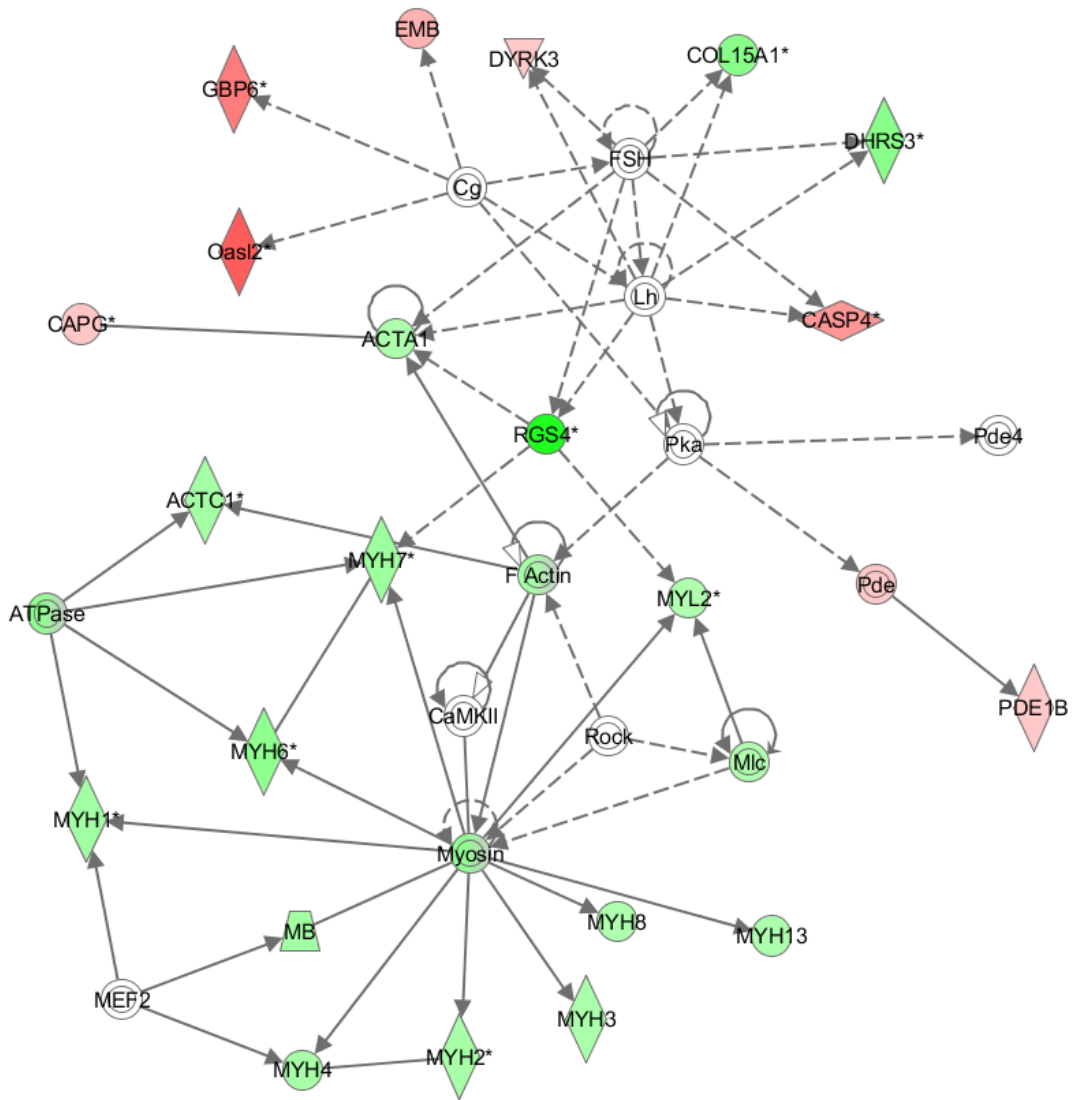


Figura 4.30 Rede gênica 8.

4.4.9 Rede gênica 9

A rede gênica 9 representada na Figura 4.31 apresenta genes associados ao metabolismo de carboidratos, organização celular e função muscular, apresentando genes aumentados como PTGES e PTGS2, diminuídos e não modulados.

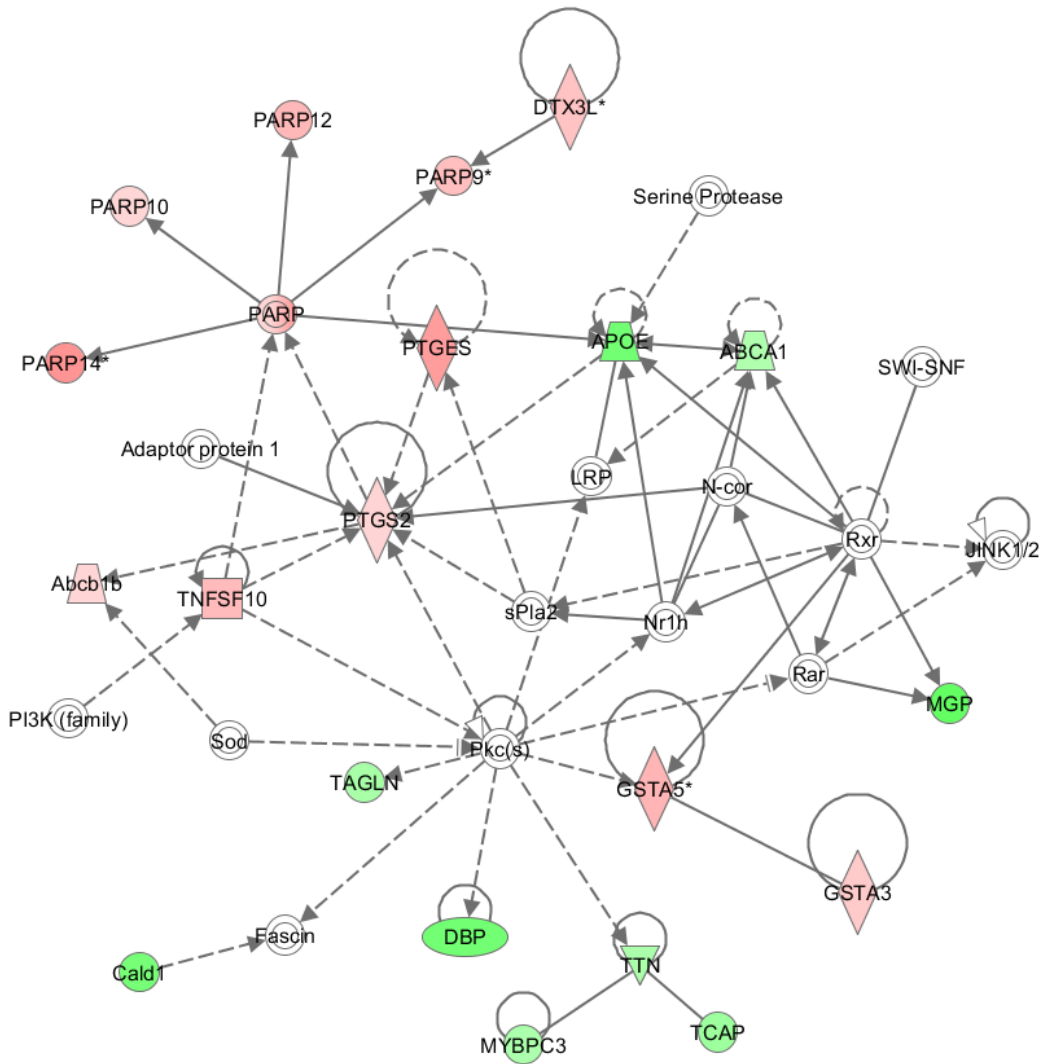


Figura 4.31 Rede gênica 9.

4.4.10 Rede gênica 10

A rede gênica 10, Figura 4.32, representa genes associados com resposta à infecção e expressão gênica. O gene central é Stat1 e encontra-se com expressão aumentada juntamente com a maior parte dos genes desta rede.

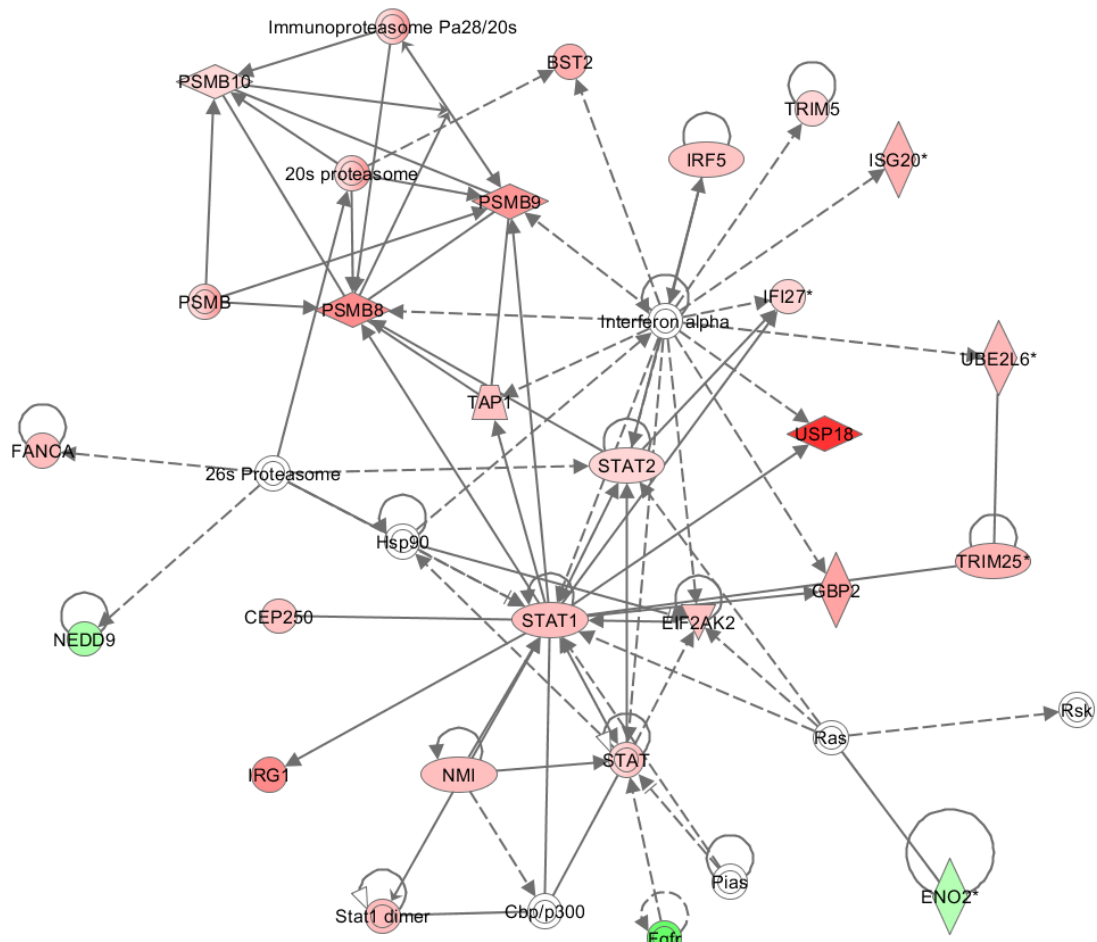


Figura 4.32 Rede gênica 10.

4.4.11 Rede gênica 11

A rede 11, Figura 4.33, apresenta genes associados à resposta inflamatória e mecanismo de infecção com a maior parte apresentando perfil aumentado.

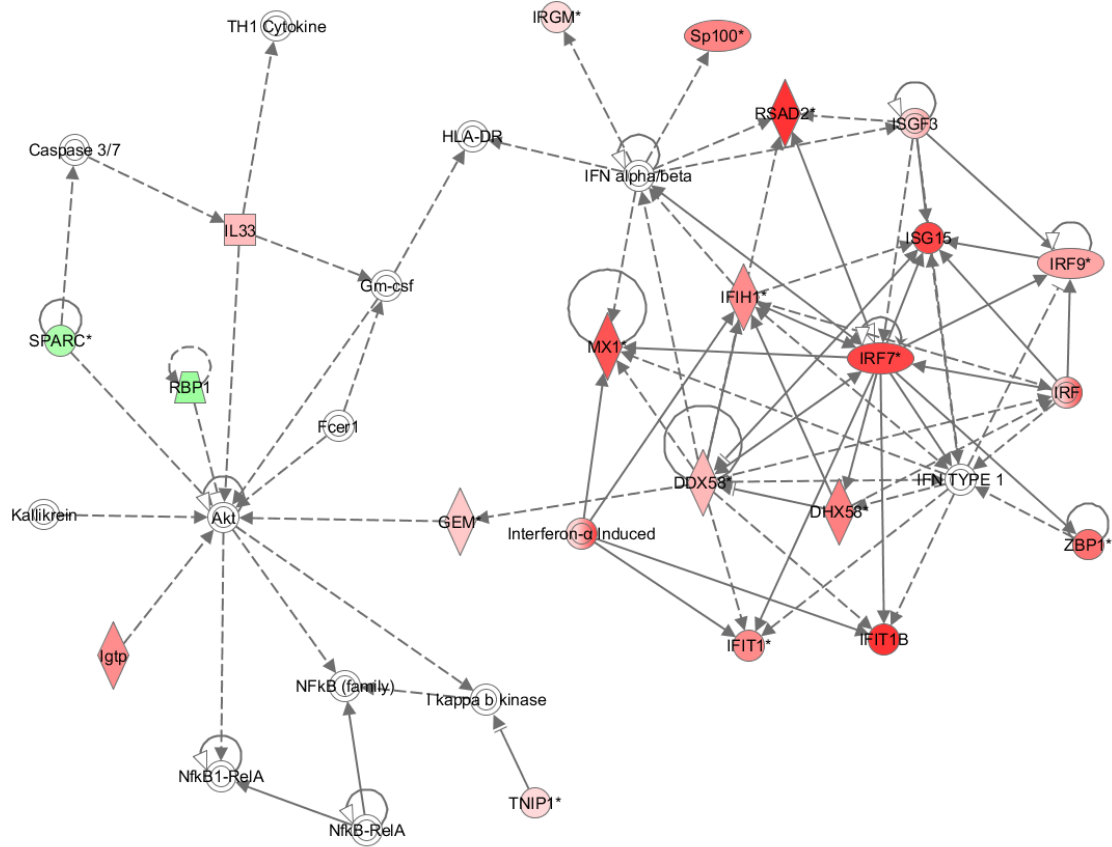


Figura 4.33 Rede gênica 11.

4.4.12 Rede gênica 12

A rede gênica 12 está representada Figura 4.34 e refere-se à forma, organização celular, sinalização e interação. A maior parte dos genes se apresenta com expressão diminuída, inclusive FN1 que está no centro da rede.

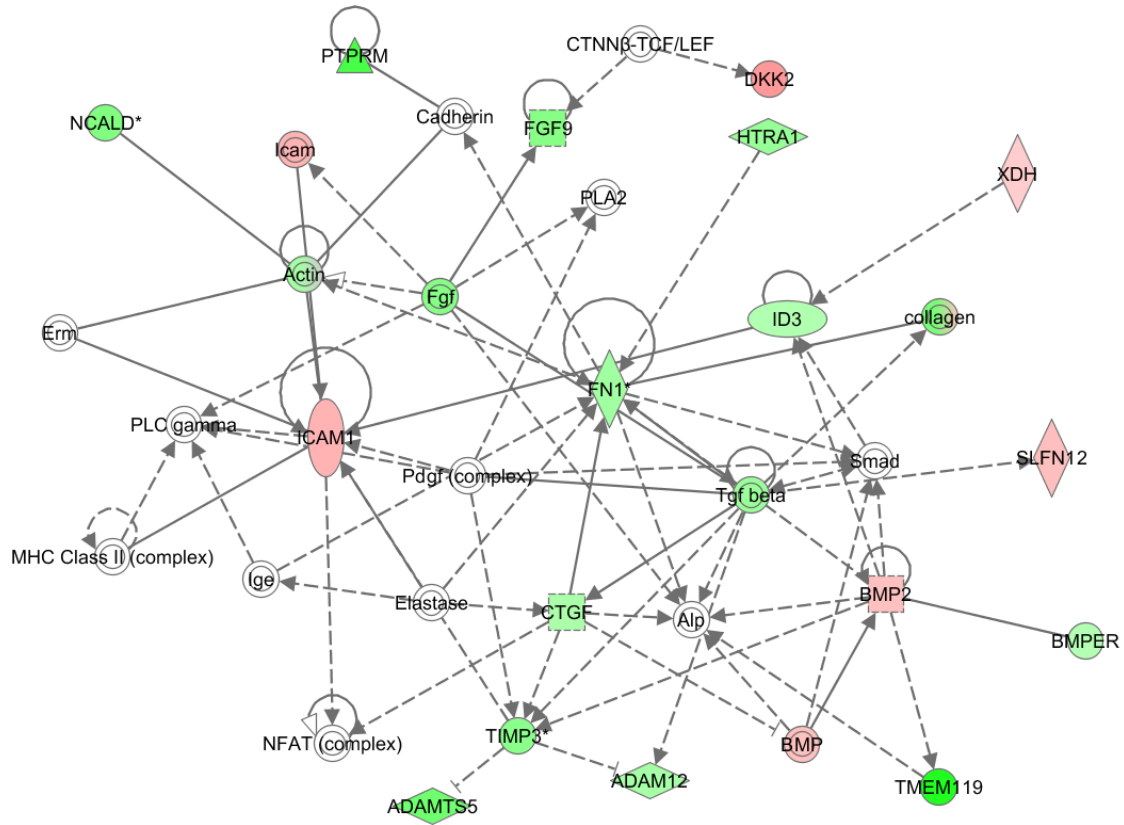


Figura 4.34 Rede gênica 12

4.4.13 Rede gênica 13

A Figura 4.35 refere-se à rede gênica 13 associada à genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos e à doenças cardiovasculares. Esta rede apresenta grande parte dos genes não modulados, e entre os que estão aumentados ou diminuídos localização principalmente nas extremidades.

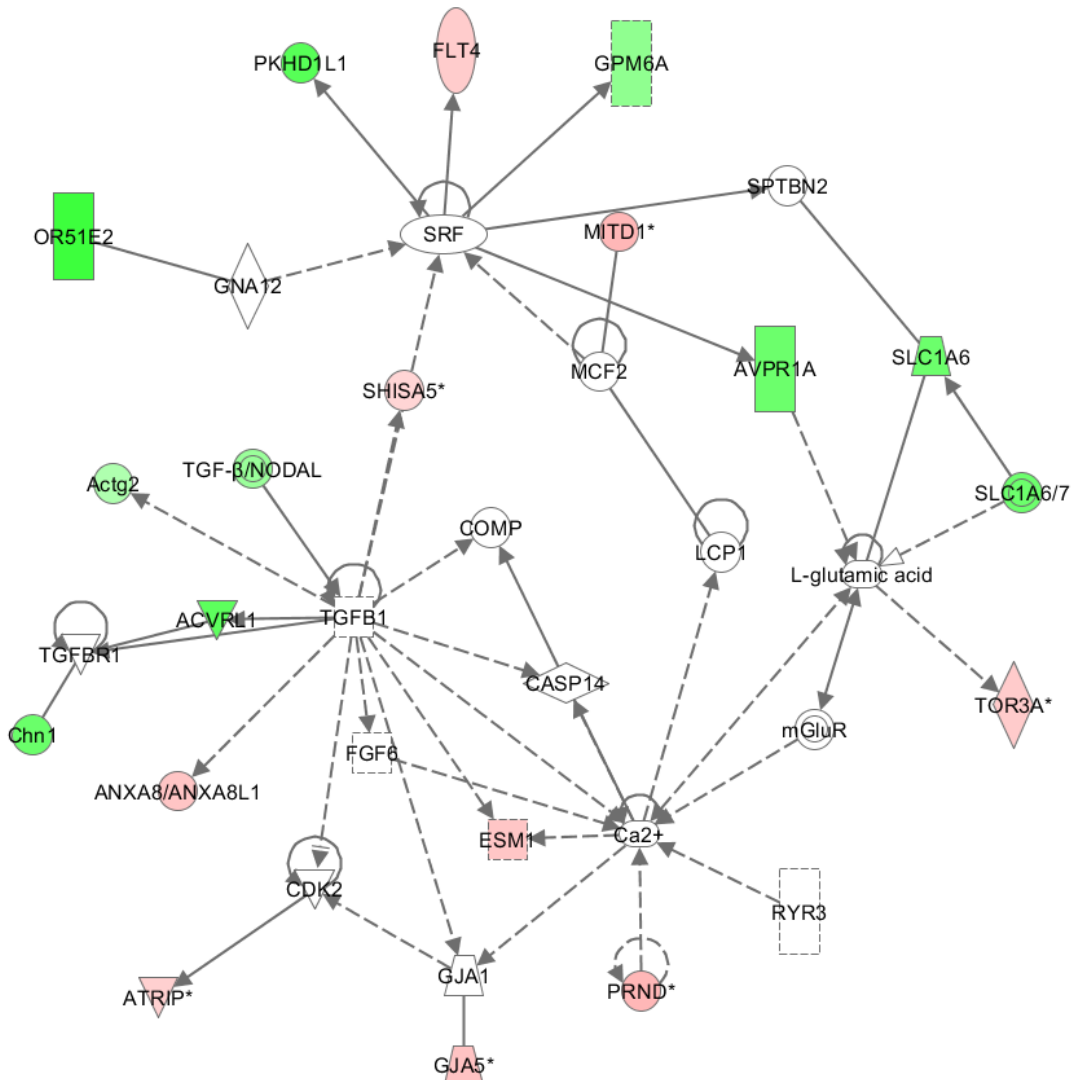


Figura 4.35 Rede gênica 13.

4.4.14 Rede gênica 14

A rede gênica 14, Figura 4.36, associa-se a morfologia, crescimento e proliferação celular. Os genes que apresentam-se modulados nesta rede encontram-se aumentados e estão nas extremidades.

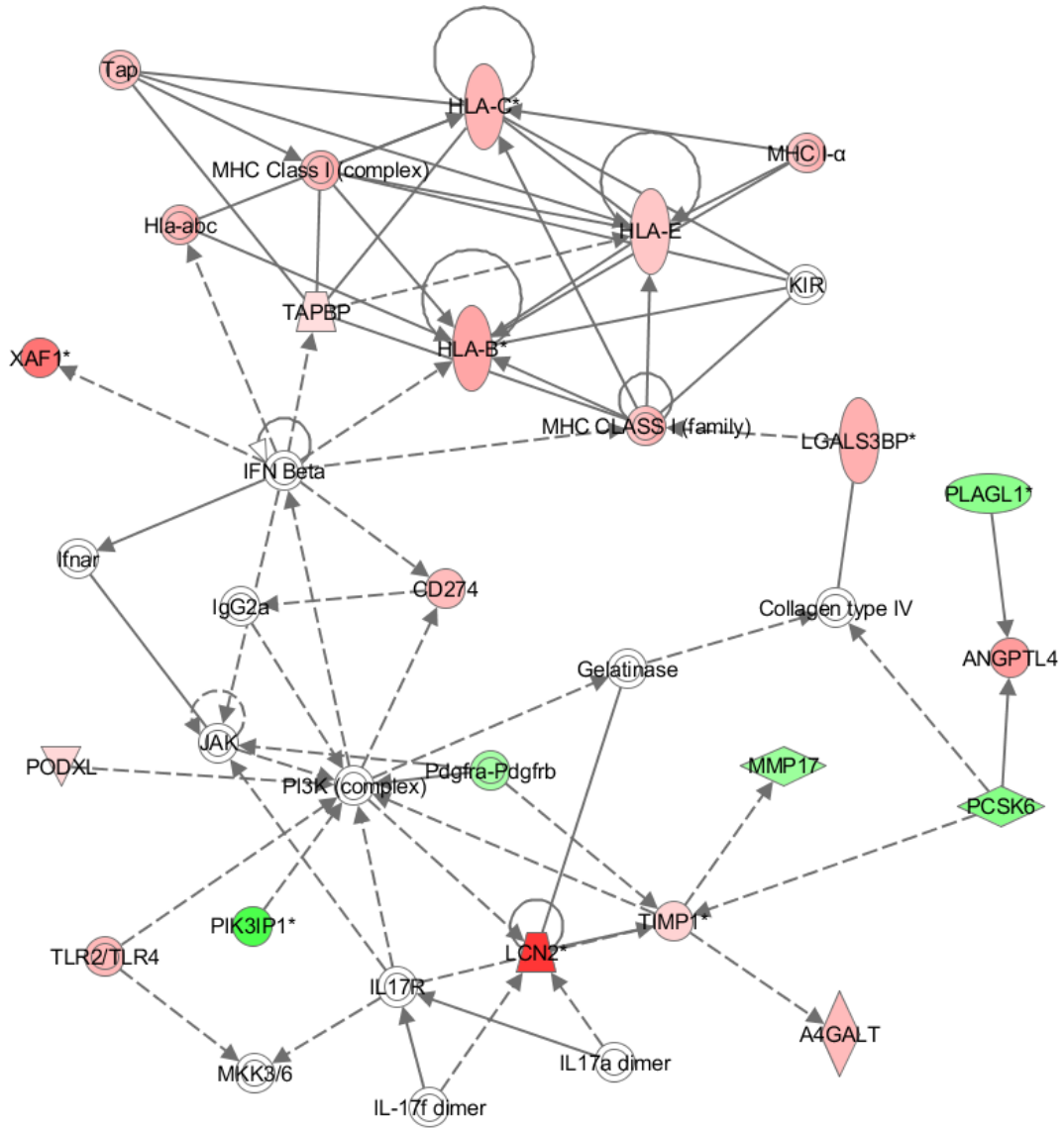


Figura 4.36 Rede gênica 14.

4.4.15 Rede gênica 15

A Figura 4.37 refere-se à rede gênica 15, relacionada à morte celular, desenvolvimento e morfologia tissular. Os genes modulados encontram-se na extremidade da rede com perfil de expressão reduzido.

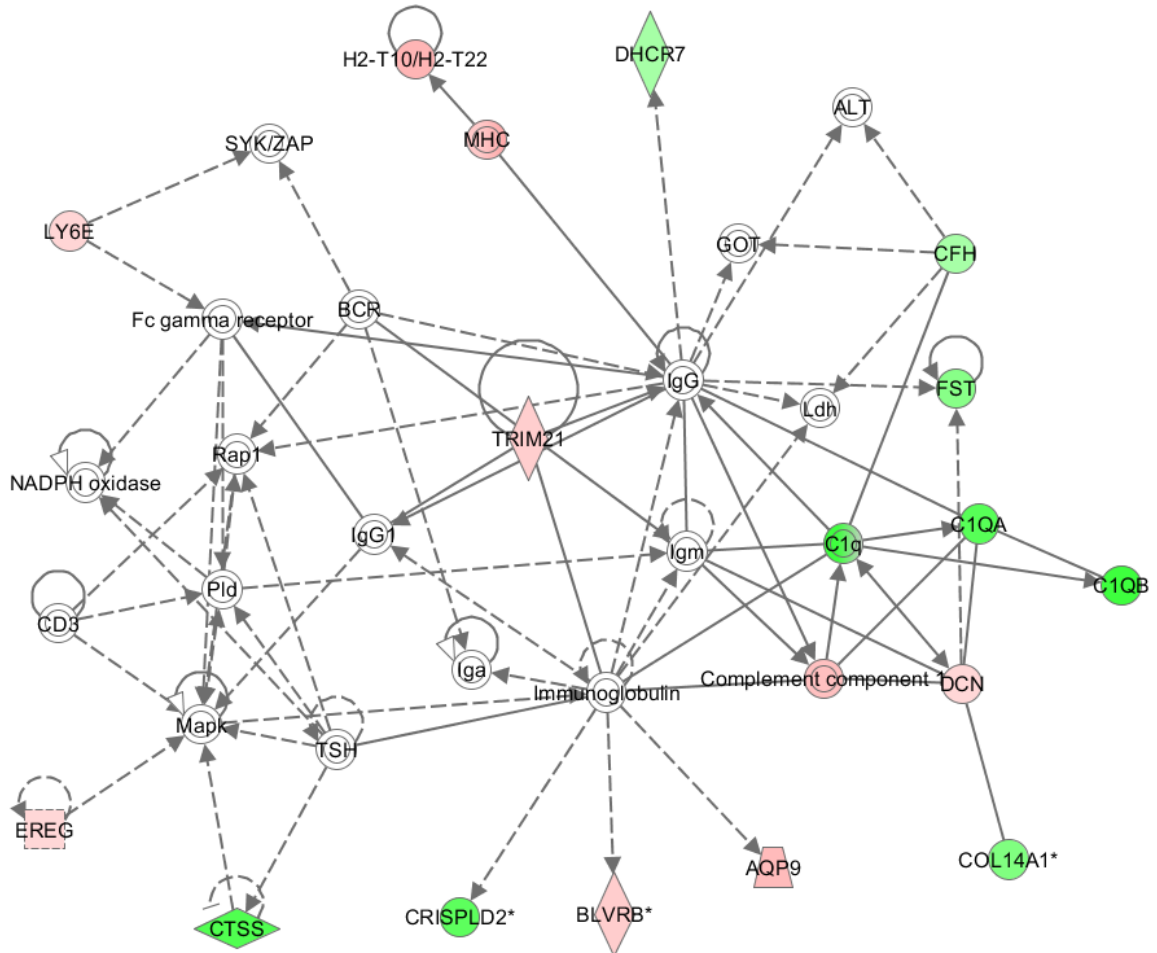


Figura 4.37 Rede gênica 15

4.4.16 Rede gênica 16

A Figura 4.38 refere-se à rede gênica 16, relacionada à forma e organização celular, desordens genéticas e doenças cardiovasculares. A IL6 é o centro de rede e não se apresenta modulada, da mesma maneira que a maior parte dos genes, os genes modulados estão na extremidade e se alternam entre apresentarem expressão aumentada e reduzida.

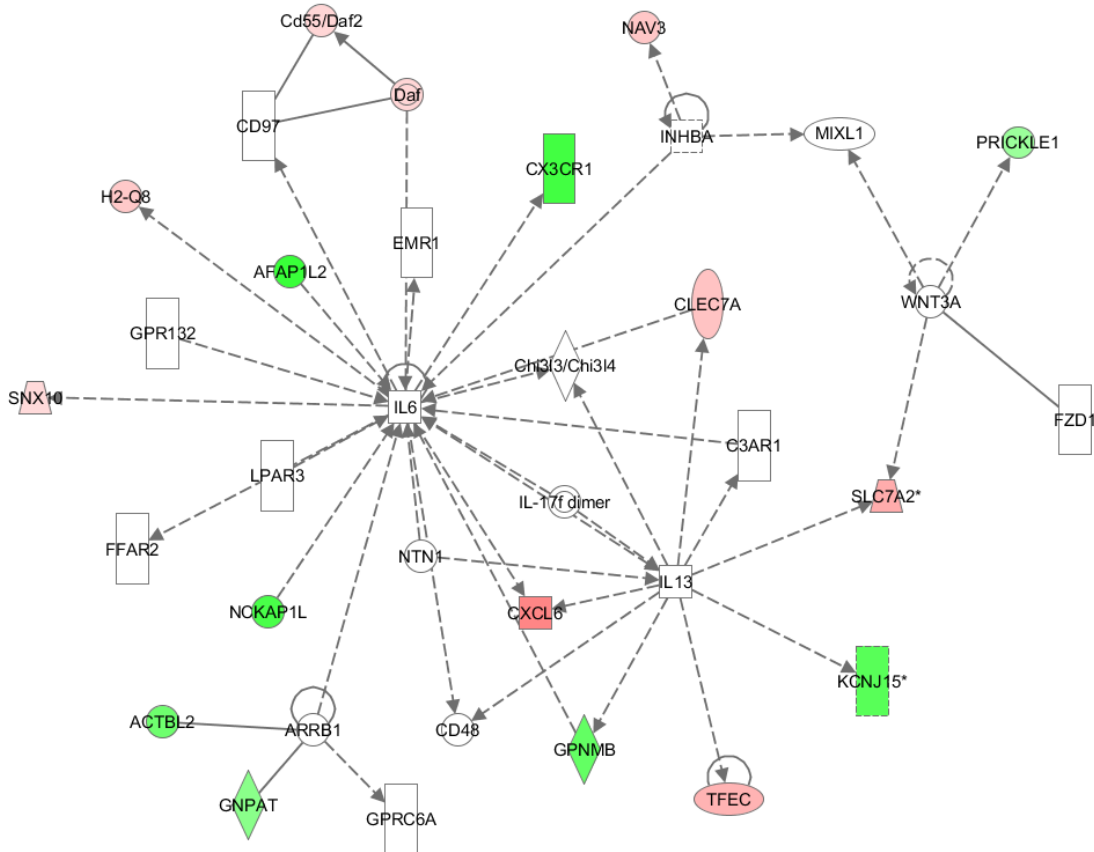


Figura 4.38 Rede gênica 16.

5 DISCUSSÃO

O transcriptoma é considerado um estratégia essencial para interpretar elementos funcionais do genoma e entender o desenvolvimento de células, tecidos e doenças. Com o advento da tecnologia de sequenciamento em larga escala e o desenvolvimento da metodologia de RNA-Seq, os estudos de análise de expressão gênica começaram a ser realizados de forma mais sensível e reprodutível (Wang *et al.*, 2009). Entretanto, o uso destas inovações em estudos que envolvam a interação protozoário-hospedeiro não foram descritos até o momento.

No caso da interação *T. cruzi*-hospedeiro, as análises em larga escala foram iniciadas em 2002 (Vaena de Avalos *et al.*, 2002) com 11 estudos realizados até 2011, aplicando os microarranjos como ferramenta de análise. O processo infectivo desencadeado por *T. cruzi* foi considerado “silencioso”, salientando poucas alterações no transcriptoma do hospedeiro infectado (Vaena de Avalos *et al.*, 2002; Garg *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2005; Shigihara *et al.*, 2008). Em fibroblastos infectados entre 2 e 6 horas, apenas 6 genes estavam reprimidos e 106 transcritos apresentaram elevação após 24 horas de infecção (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Imai e colaboradores (2005), analisando o mesmo tipo celular, fibroblastos, relataram 16 genes modulados após 8 dias de infecção. Ainda, em células HeLa infectadas com *T. cruzi* por 72 horas se identificou a modulação de 64 genes, sendo 41 genes induzidos e 23 genes com expressão reprimida (Shigihara *et al.*, 2008). No modelo de cardiopatia chagásica, alterações na transcrição de genes (186 genes totais) foram observadas na fase aguda, logo após 3 dias de infecção com 31 genes modulados e ainda 89 e 66 genes alterados após 37 e 110 dias pós-infecção, respectivamente. Quando se iniciaram os estudos infectando cardiomiócitos, este processo considerado “silencioso” demonstrou modulações na expressão gênica desde estágios iniciais desta interação, com a identificação de 353 genes em uma cinética detalhada consistindo de 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas de infecção (Manque *et al.*, 2011) e 420 genes modulados após 48 horas de infecção (Goldenberg *et al.*, 2009)

Entretanto, os dois trabalhos publicados analisando o transcriptoma de cardiomiócitos infectados por *T. cruzi in vitro* apresentavam cobertura reduzida do genoma murino (Goldenberg *et al.*, 2009; Manque *et al.*, 2011). Por esse motivo, nos propusemos à reavaliar as bases moleculares da interação parasita-célula cardíaca utilizando uma metodologia mais moderna, com cobertura completa do transcriptoma. O método de RNA-Seq propicia isso, e é mais específico, abrangente e sensível, em conjunto, que outras técnicas para analisar

transcritomas, como microarranjos, SAGE, PCR quantitativa, dentre outras. Enfocamos em nosso estudo o estágio inicial da infecção através de uma cinética detalhada que foi subdividida em 3 fases distintas para melhor compreensão do perfil de expressão gênica e correlação com os eventos biológicos desta interação: (i) estágio inicial recente (1 a 4 horas) onde adesão e interiorização do parasita são predominantes, (ii) estágio inicial tardio (5 a 6 horas) com prevalência dos eventos de escape do vacúolo parasitóforo e início da diferenciação do parasita e ainda um (iii) estágio intermediário (24 horas) com efetiva multiplicação de amastigotas intracelulares.

Detalhando a cinética de infecção dos cardiomiócitos por *T. cruzi* e cobrindo todo o genoma murino, identificamos o maior número de genes modulados descritos até o momento, 572 genes dos quais 371 se apresentaram com expressão aumentada e 201 reprimida, confirmando e estendendo de maneira bastante específica e sensível as análises de transcrito desta interação. Além do número de genes modulados identificados ser maior, a utilização de três réplicas e a cinética detalhada nos tempos iniciais da infecção, com pontos temporais regularmente espaçados de hora em hora permitiu visualizar os padrões de modulação com um grau de informação muito maior que os demais trabalhos focando na interação do cardiomiócito com *Trypanosoma cruzi*.

Nas modulações de expressão gênica evidenciamos interseções de genes na cinética temporal, sendo que grande parte dos genes modulados demonstrou um perfil bastante característico, ou seja, expressão aumentada ou diminuída nos diferentes estágios da infecção desde que se encontravam alterados. Em números absolutos de genes modulados no estágio inicial recente (1 a 4 horas), um número expressivo de genes já se mostrava alterado, alcançando um total de 117 genes, sendo 18 genes modulados com 1 hora de infecção, onde ocorre um processo inicial de reconhecimento celular e invasão, sugerindo que a ligação do *T. cruzi* com a matriz extracelular da célula hospedeira e/ou fatores secretados pelo parasita transduz sinais que irão culminar na modulação de genes que poderão disparar o processo de invasão. No estágio inicial tardio (5 a 6 horas) e intermediário (24 horas), 178 e 305 genes foram modulados, respectivamente. Interessantemente, o aumento na expressão de genes foi proporcional ao índice de infecção das culturas, sugerindo que parasitas intracelulares disparam uma modulação coordenada e temporal de genes essenciais para seu desenvolvimento intracelular.

A discussão a seguir se baseia em classes de genes e cinética de infecção tentando agregar informações para o melhor entendimento de uma doença que já ultrapassou os 100

anos de estudos e descobrimento, mas que ainda permanece com as alterações no transcrito tão pouco compreendidas. Alterações que poderão inclusive ser úteis para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, medicamentos auxiliares para o tratamento e até mesmo de uma vacina.

5.1 Modulação de genes da resposta imune induzidos pelo *T. cruzi*

A infecção de cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi* induz uma intensa resposta imune que é disparada desde os estágios iniciais da interação (1 hora), onde os genes predominantemente modulados se encontram associados à via de NF-kappa-B, moléculas de adesão e as quimiocinas.

As proteínas NF-kappa-B são uma família de fatores de transcrição composta por 5 membros [p65 (RelA), RelB, cRel, NF-kB1 (p50 e seu precursor p105) e NF-kappa-B2 (p52 e seu precursor p100)] predominantemente localizados no citoplasma e associados com a família de proteínas inibitórias IκB (IκB alfa, IκB beta, IκB epsilon, IκB gama) em células não estimuladas (revisito por Yamamoto e Gaynor, 2004). O NF-kappa-B está envolvido no controle de processos celulares, como resposta imune e inflamatória, processos de desenvolvimento, crescimento e apoptose (revisito por Yamamoto e Gaynor, 2004) e, ainda, encontra-se associado com a hipertrofia cardíaca (Petersen *et al.*, 2005; 2006). Entretanto, pouco ainda se conhece sobre o conjunto de genes envolvidos direta ou indiretamente com a ativação desta via.

No estágio inicial (1 hora), os genes associados diretamente à via de NF-kappa-B modulados positivamente foram os inibidores IκB alfa e IκB zeta. Clifton e colaboradores (2005) durante a infecção de células endoteliais por *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria intracelular que se desenvolve e multiplica no citoplasma assim como *T. cruzi*, descreveram uma via que culminou com a ativação e translocação de NF-kappa-B para o núcleo envolvendo a fosforilação e degradação dos inibidores IκB alfa e/ou IκB beta pelo 26S proteassomo, que envolve a subsequente ressíntese IκB alfa através de um mecanismo autoregulatório, evento que em nível transcricional aumentou o mRNA IκB alfa e não ocasionou modulação em IκB beta. Nos cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* ocorreu aumento nos níveis de mRNA de IκB alfa e não foi verificada modulação em IκB beta, sugerindo que a ativação de NF-kappa-B pode se assemelhar à via utilizada por *Rickettsia rickettsii* durante a infecção de células endoteliais. O inibidor IκB zeta é dependente da presença de NF-kappa-B ativo para ser expresso e relaciona-se à IL6 (Trinh *et al.*, 2008).

Durante a infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, os níveis de mRNA desse inibidor

e IL6 se encontravam elevados desde os tempos de 2 horas pós infecção; eventos que nos permitiram classificar IκB zeta como um possível ativador transcricional e ainda, indiretamente determinar ativo NF-kappa-B.

Em células endoteliais infectadas por *T. cruzi*, o NF-kappa-B ativo, juntamente com moléculas de adesão molecular (selectina E, ICAM1) e VCAM1, inicialmente relacionam-se com o controle do parasita, entretanto, com o decorrer da infecção associam-se à lesão vascular e ao comprometimento cardíaco (Huang *et al.*, 1999; Michailowsky *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram esse grupo gênico aumentado desde o tempo inicial (1 hora), salvo VCAM1 que foi selecionada como aumentada somente após 4 horas.

A ativação de genes envolvidos na resposta imune e integrados ao fenômeno inflamatório foi evidenciada no estágio inicial da cinética de infecção (1 hora) com o aumento de expressão de genes que codificam quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL5; LIF (Gradient e Patterson, 1999), CD83, gene associado à produção de citocinas inclusive durante a infecção por *T. cruzi* em outros tipos celulares (Ouaissi *et al.*, 2004), e citocinas, como IL1α e IRF1, corroborando os resultados de Machado e colaboradores (2000) que descreveram, a partir de um número reduzido de genes em tempos mais tardios de infecção (12 horas), a resposta inflamatória desencadeada pelos cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*. Este trabalho pioneiro de Machado e colaboradores (2000) ressaltou o papel de cardiomiócitos como célula ativa imunologicamente e participante da resposta tripanocida associada com a produção de óxido nítrico. Nossos dados recentes de microarranjo (Manque *et al.*, 2001) e os resultados apresentados neste trabalho destacam a elevada modulação de genes relacionados à resposta imune em cardiomiócitos desde os estágios iniciais da infecção. Em contraste, as análises com fibroblastos humanos não revelaram modulação significativa de genes no estágio inicial da infecção (1 a 6 horas) (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Assim, a complexa rede de genes, que dispara eventos biológicos distintos nos diferentes estágios de infecção: inicial (recente e tardio) e intermediário (24 horas), revelado neste estudo, poderão contribuir para o melhor entendimento da resposta imune e sua interface com o controle da infecção e a cardiomiopatia chagásica.

Com o avanço da infecção (2 horas), os fatores estimuladores de colônia 1, 2 e 3, que são expressos em níveis mais altos em sítios de inflamação e auto-imunidade (revisto por Hamilton, 2008) juntamente com as quimiocinas, CCL16, CCL20, e CXCL3, e a molécula de adesão selectina P, apresentaram-se com expressão gênica elevada e aliando-se aos genes

modulados desses mesmos grupos continuaram favorecendo o recrutamento de células do sistema imune e a resposta tripanocida relacionada ao óxido nítrico.

Ainda dentro desse contexto, destacamos a elevada expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios nestas primeiras horas de interação (1 a 3 horas), onde predomina o processo de adesão e invasão do parasita, podendo estar relacionados com o disparo de vias implicadas na produção de espécies reativas de oxigênio. Após 3 horas de infecção por *T. cruzi*, evidenciamos aumento na expressão de um gene regulador Slc7a2 que estimula a produção de iNOS (NOS2) (Thompson *et al.*, 2008), assim como, indução do gene que codifica esta enzima responsável pela produção de óxido nítrico, confirmando assim, a resposta tripanocida previamente evidenciada em cardiomiócitos infectados (Machado *et al.*, 2000) (Rede gênica 6). No entanto, embora ocorra ativação de genes relacionados ao estresse oxidativo, a modulação positiva de TNF α foi evidenciada apenas após 5 horas de infecção, sendo responsável pelo aumento expressivo de genes relacionados à resposta tripanocida.

Uma grande surpresa foi o aumento em genes associados ao metabolismo de radicais livres, uma vez que o efeito do estresse oxidativo destaca-se na infecção pelo *T. cruzi*. Em ataques súbitos de doenças neurológicas, o ferro livre pode amplificar o dano, catalisando a conversão de superóxido e peróxido de hidrogênio à radicais ainda mais reativos e tóxicos. A transferrina é a principal enzima que atua na conversão do ferro tóxico juntamente com a ceruloplasmina, uma proteína sérica que atua como antioxidante com propriedade de oxidar o ferro 2⁺ a ferro 3⁺, diminuindo a lesão (Altamura *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2002). Nos cardiomiócitos infectados, os genes que codificam essas enzimas, ceruloplasmina (após 4 horas) e a transferrina (após 5 horas), apresentaram-se aumentados, sugerindo uma proteção contra compostos oxidantes.

Neste contexto, houve indução de genes relacionados à enzimas do tipo glutathione-S-transferase como GSTA1 (que se localiza inclusive nas mitocôndrias), GSTA2, GSTA3, ativado no estágio intermediário de infecção (24 horas) (Raza *et al.*, 2002) e enzima Srxn1 (Kim *et al.*, 2010), provavelmente em busca do controle dos altos níveis de espécies reativas. Ressaltamos ainda, o aumento da expressão de Mt1 durante a infecção por *T. cruzi* (5 horas) aliando se ao grupo de genes que busca atenuar o grande estresse oxidativo decorrente da infecção. Recentemente, a função de genes da família Mt foi determinada em cardiomiócitos através de ensaios com expressão reduzida de genes Mt1 e Mt2, sendo evidenciado efeitos citotóxicos e danos de DNA decorrentes da exposição à micotoxina indutora de radicais tóxicos de oxigênio (Yang *et al.*, 2010). Assim, nossa hipótese é que a

modulação desses genes pode ser uma tentativa de controle da explosão oxidativa pela célula hospedeira ou ainda uma estratégia de sobrevivência do parasita.

Estudos têm demonstrado que patógenos desenvolveram diferentes mecanismos para controlar seus hospedeiros (vertebrados e invertebrados) e garantir sua transmissão (Matthews, 2011). Assim, é possível que o *T. cruzi* seja capaz de subverter a vigilância desempenhada pelo hospedeiro alterando os mecanismos de regulação das vias envolvidas no estresse oxidativo. Por outro lado, atuando na defesa do hospedeiro apresentaram-se com expressão aumentada os genes NF-kappa-B2, CX3CL1 e Ch25h, enzima associada ao metabolismo de lipídeos que também favorece a expressão do gene CCL5 (Diczfalusy *et al.*, 2009) aumentado após 5 horas de infecção.

Com o progresso da infecção, observamos indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Ressaltamos que no soro de pacientes na fase aguda da doença de Chagas foram identificadas as citocinas IL1 β , IL6 (Tanowitz *et al.*, 1992b), com as mesmas sendo expressas de forma aumentada em células endoteliais infectadas com *T. cruzi* aliadas ao fator estimulador de colônia 1, sugerindo que estas citocinas apresentavam relação direta inicialmente com o controle do parasita e sequencialmente com o desenvolvimento da cardiopatia (Tanowitz *et al.*, 1992b). Em cardiomiócitos infectados (2 horas) este perfil de expressão gênica relacionado à estas citocinas se repetiu salvo IL1 β , que se apresentou aumentada após 4 horas de infecção, demonstrando mais um grupo de genes que se relacionaram às anormalidades ocasionadas pela doença de Chagas modulados no estágio inicial da infecção.

O gene *Cebpd* pode ser ativado na fase aguda, principalmente por citocinas especialmente IL1 e IL6, em situações de lesão, inflamação e infecções atuando como um fator transcricional (Alam *et al.*, 1992). Após 3 horas de infecção, este gene, juntamente com as citocinas que se encontravam moduladas desde os pontos anteriores, funcionou como um estímulo adicional para a manutenção da resposta inflamatória e estímulo desencadeado principalmente por NF-kappa-B.

Durante a infecção por *Toxoplasma gondii* em fibroblastos, interferon gama (INF γ) orchestra uma potente resposta antimicrobiana em que a família de GTPases com mais de 10 membros apresenta-se envolvida, inclusive Gbp10, que pode ser estimulada por IL1 β (Degrandi *et al.*, 2007). Esta enzima apresentou-se com perfil de expressão gênica aumentada durante a infecção de cardiomiócitos por *T. cruzi* e se associa ao grande número de genes estimulados relacionados ao controle do parasita, sendo que os outros membros desta família,

como Gbp2, Gbp4, Gbp6, Gbp8, Gbp9, estão modulados no tempo inicial tardio (a partir de 4 horas), onde se inicia o escape do vacúolo parasitóforo e o processo de proliferação intracelular dos parasitas. Além disso, a expressão aumentada de genes fortemente relacionados à infecções virais como IFIH1(MDA5) ligado a produção de citocinas (Akira *et al.*, 2006) e as GTPases MX1 (início aumento após 5 horas) e MX2 com atividade antiviral (Lee e Vidal, 2002) foram resultados interessantes durante uma infecção por protozoários, sugerindo uma possível similaridade entre os organismos infectivos que estimule a transcrição e, ainda, demonstram que é imprescindível a necessidade de se caracterizar estes genes em relação a real atividade anti-parasitária.

Fortalecendo a resposta imune e inflamatória se apresentaram com expressão aumentada genes relacionados à citocina CXCL10, CD40, uma glicoproteína GP49 que pertence a superfamília das imunoglobulinas (Arm *et al.*, 1991) e, uma enzima que atua diretamente na síntese de prostaglandinas, Ptges (Rede gênica 9).

Um estímulo direto para a síntese de citocinas pró-inflamatórias, evidenciado no estágio inicial tardio (4 horas), foi o aumento na expressão do gene para o fator de transcrição da família IRF, IRF5, (Akira *et al.*, 2006) e MAP3K8 quinase (Eliopoulos *et al.*, 2006) que atuam na via que culmina com a ativação de NF-kappa-B. De forma interessante a resposta imune e inflamatória pode estar associada à via de sinalização Jak-Stat com a indução de genes estimulados por interferon durante a infecção por *T. cruzi* (5 horas) onde se apresentaram com expressão aumentada o gene ISG 15 aliado a UBP43 e as proteínas induzidas por interferon que fazem parte da via e regulação da mesma (Malakhova *et al.*, 2003). Interessantemente, o gene CISH pertence à família SOCS, que de acordo com a revisão de Kile e colaboradores (2002) atua na resposta imune, principalmente no controle da expressão de citocinas induzidas pela via Jak-Stat levando a degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo, apresentou-se aumentado e provavelmente desempenha um papel importante durante a infecção atuando na homeostase.

Os principais genes colaboradores da resposta imune ativados após 5 horas de infecção foram um ativador da via de NF-kappa-B (SQT1), TAP1, que estimula a produção de IFN γ e se relaciona com a apresentação de epítomos de MHC da classe 1 (Goldszmid *et al.*, 2007; Burgevin *et al.*, 2008), NF-kappa-B1, citocinas (CCL4, CCL5, CCRL2), GTPases (GBP1, GBP3, GBP5, GBP7), GTPases induzidas por interferon (IGTP e IRGM2), um gene associado à adesão PTPRB, serpina J e genes que participam da inflamação como CLEC4E,

Ereg (Sugiyama *et al.*, 2005) e PTGS2 associado a biossíntese de prostaglandinas (Rede gênica 9).

Ao final da fase inicial tardia (6 horas), a resposta imune e a inflamação destacavam-se na predominância de genes modulados. Entre os que apresentaram expressão aumentada neste estágio da infecção (6 horas) estavam três GTPases Irgm1, GVIN1 que é semelhante à família MX (Klamp *et al.*, 2003) e Gm12250, IFI35 (Zhang *et al.*, 2007) e o gene H2-K1 relacionado à apresentação de epítomos de MHC da classe 1 (Mitaksov e Fremont 2006) e H2-Q8, H2-Gs10 e TAP2 pertencentes à mesma classe, IRF7, IRF9 e mais genes da família TRIM (5, 34, 56 e PML) (McNab *et al.*, 2011) e ainda, genes estimulados por interferon que não possuem função conhecida como Tor3a (Dron *et al.*, 2003), PARP14 associada a ativação de STAT6 (Goenka *et al.*, 2007) (Rede gênica 3). Ainda neste tempo de infecção, ressaltamos a ativação do gene syntaxina 11 (STX11), que em células do tipo natural killer participa da via de exocitose de citocinas e quimiocinas juntamente com as alterações em níveis de cálcio (Brycesson *et al.*, 2011), sugerindo que a ativação de STX11 desempenhe papel importante na secreção destes fatores solúveis em cardiomiócitos infectados.

No estágio intermediário da infecção (24 horas), a grande maioria dos genes relacionados à resposta imune e inflamatória evidenciados nos estágios anteriores persistiu e, como no estágio inicial de infecção (1 a 6 horas), foi a classe gênica que apresentou o maior número de genes modulados. Como exemplos dos novos integrantes e fortalecendo essa resposta apresentaram-se aumentados: os genes que codificam para moléculas de adesão como CD44, quimiocina CCL9, um gene estimulado por citocinas ESM1 e detectado em carcinomas hepatocelulares como marcador de angiogênese e invasão (Chen *et al.*, 2010), um gene supressor da resposta inflamatória, Cd274, (Uceyler *et al.*, 2010) e, provavelmente em busca do equilíbrio, vários genes relacionados ao MHC classe 1 e 2.

Os genes relacionados à resposta imune discutidos anteriormente representam o maior conjunto descrito na literatura e complementam os trabalhos em larga escala previamente publicados (Manque *et al.*, 2011; Goldenberg *et al.*, 2009), contribuindo com informações relevantes sobre o processo de infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos e gerando avanços para o entendimento da patogênese da cardiopatia chagásica em nível molecular.

5.2 Alterações associadas a apoptose

A apoptose, conhecida como morte celular programada, é um processo fisiológico de renovação e manutenção tissular, sendo também evidenciado como estratégia de defesa do

sistema imune em células infectadas por microorganismos patogênicos (Vaux *et al.*, 1994). Protozoários parasitas, por exemplo, interferem na maquinaria celular e podem inibir ou induzir o processo de apoptose em seus hospedeiros, como perspectiva para sua sobrevivência e replicação (revisito por Bruchhaus *et al.*, 2007).

Neste contexto, os dados da literatura relacionados à indução de apoptose pelo *T. cruzi* são bastante controversos e parecem depender do tipo celular e biodema do parasita (de Souza *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2006). Nossos resultados refletem as alterações transcricionais em genes associados à apoptose durante a infecção de cardiomiócitos por *T. cruzi*, clone Dm28c, na cinética inicial recente (1 a 4 horas), inicial tardia (5 a 6 horas) e intermediária (24 horas).

No tempo inicial recente, em que os parasitas preferencialmente se encontram no vacúolo parasitóforo, os genes relacionados à inibição da apoptose encontram-se positivamente modulados e grande parte associada ao NF-kappa-B, provavelmente estimulado pelo aumento na expressão do fator de transcrição IRF5 (Akira *et al.*, 2006) e quinase MAP3K8 (Eliopoulos *et al.*, 2006). As alterações transcricionais associaram-se ao aumento de genes relacionados diretamente à via de NF-kappa-B: I-kappa-B-alfa, I-Kappa-B-zeta, RELB, NF-kappa-B2, I-kappa-B-epsilon e BCL3, que é um co-ativador transcricional dos inibidores, e ainda TNFAIP3 associado à inibição da via extrínica de apoptose. Outros genes que não estão diretamente ligados à via, mas que ativam o NF-kappa-B e apresentaram perfil aumentado foram o cIAP2, que se associa aos receptores TNFR1 e é imprescindível para a sobrevivência das células induzidas à apoptose por TNF α (Varfolomeev *et al.*, 2008), e RIP2 que se associa aos receptores TNFR1 e CD40 e interage com cIAP1 (McCarthy *et al.*, 1998). Inibição da apoptose foi reportada por Petersen e colaboradores (2006) durante infecção de cardiomiócitos com a cepa Y de *T. cruzi*, demonstrando a importância do fator transcricional NF-kappa-B neste processo mediado por caspase 3 e insignificância da via PI3K-AKT envolvida em outros tipos celulares.

Ainda, evidenciamos neste período (1 a 4 horas) ativação de outros genes envolvidos na inibição da apoptose, incluindo os genes pertencentes à família Bcl2 (Bcl2a1a, Bcl2a1b e Bcl2a1d) (Adams e Cory, 1998), além do receptor TNFRS1B associado ao gene cIAP2 (Varfolomeev *et al.*, 2008), NGF, um gene anti-apoptótico presente em neurônios do sistema nervoso central e periférico, descrito em cardiomiócitos submetidos à hipóxia em um modelo de infarto (Caporali *et al.*, 2008), e, finalmente, as serpinas (Serpina3a, Serpina3b Serpina3c Serpina3f Serpina3g Serpina3h Serpina3i Serpina3j Serpina3k Serpina3m Serpina3n

Serpinb2) que atuam na inibição de proteases e impedem o dano tecidual e morte prematura de células do sistema imune (Mangan *et al.*, 2008).

Em contraste, é importante ressaltar que um grupo bastante reduzido de genes relacionados à indução do processo de apoptose foi identificado com expressão aumentada, como IRF1 (Mamane *et al.*, 1999; Schroder *et al.*, 2004), ZC3H12A, um fator transcricional associado a CCL2 e relacionado ao desenvolvimento da doença isquêmica cardíaca (Zhou *et al.*, 2006), e um membro da família Bcl2, o Bid, que é um gene pró-apoptótico (Adams e Cory, 1998). Entretanto, provavelmente a ativação desses genes não seja suficiente para subverter a estratégia anti-apoptótica induzida pelo parasita. Além disso, o gene pentraxina 3, que se liga às células em processo de apoptose e impede que sejam removidas por células dendríticas (revisto por Mantovani *et al.*, 2008), apresentou-se com expressão aumentada, podendo estar atuando como um mecanismo protetor.

No tempo inicial tardio (5 a 6 horas), genes relacionados à inibição da apoptose permaneceram modulados positivamente. Os aumentos relacionados à via de NF-kappa-B associavam-se a um ativador SQT1 e NF-kappa-B1. Além disso, o conjunto de genes associados à inibição de apoptose inclui aumento da expressão de genes induzidos por interferon da família p200 (IFI202b, IFI203, IFI204 e IFI205) e MDA5 que em outros tipos celulares se associam a reguladores negativos do crescimento celular e a efeitos antivirais, tumorais e anti-apoptóticos (Asefa *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2006); DDX3L (Yan *et al.*, 2009) e PAF (2810417H13Rik) (Turchi *et al.*, 2009) que estão envolvidos no reparo e integridade do DNA e outros anti-apoptóticos como STAR (Ning *et al.*, 2009), XIAP, TNFAIP3, CYR61 (Rho *et al.*, 2009).

No entanto, destaca-se nesta fase da infecção (5 a 6 horas), genes associados a FAS e CD47, relacionados à indução da apoptose, que encontravam-se induzidos (Manna *et al.*, 2005). FAS é considerado um gene indicativo de falência em pacientes na fase crônica da doença de Chagas juntamente com aumento na expressão de FASL e TNF α (Rodrigues Jr *et al.*, 2008). Além de FAS e CD47, aumento da expressão foi verificado nos seguintes genes: NG2TR75, que em neurônios sob injúria transmite sinais para apoptose (Nykjaer *et al.*, 2005), ACIN1, que atua favorecendo o dano do material genético (Hasegawa *et al.*, 2009), reticulon 1, que provoca danos na membrana do retículo endoplasmático (Di Sano *et al.*, 2007), caspase 4, IFIT2 (Stawowczyk *et al.*, 2011), ZFP36L2 (Jackson *et al.*, 2006) e as enzimas do tipo OAS (OASL1, OASL2, OAS1) normalmente aumentadas em infecções virais ativando RNaseL que inibem a proteína anti-apoptótica Bcl2 (Eskildsen *et al.*, 2002; 2003)

(Rede gênica 1). O número crescente de genes indutores de apoptose nesta fase da interação (5 a 6 horas) e sua permanência no tempo intermediário (24 horas), quando formas amastigotas se multiplicam livremente no citoplasma, sugere o disparo da cascata de sinalização de apoptose. Estes resultados apóiam os dados obtidos por de Souza e colaboradores (2003) que relataram a indução de apoptose durante a infecção de cardiomiócitos por *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro*. Neste estudo foi demonstrado que este evento depende do tipo celular, uma vez que fibroblastos são refratários enquanto cardiomiócitos sofrem apoptose em níveis moderados e macrófagos são altamente suscetíveis. Além disso, o processo apresenta relação com o biotipo do parasita, assim cardiomiócitos infectados com Dm28c, uma cepa que histologicamente leva menores prejuízos ao coração que Y e CL e, quando comparados, desenvolveu níveis elevados e progressivos de apoptose nos tempos iniciais de interação (2 a 6 horas).

Em nosso trabalho inicial em larga escala (Manque *et al.*, 2011) muitos genes associados à apoptose estavam modulados ativando a via extrínica e a intrínica, com aumento de BID e FAS. Entretanto, a ativação de genes inibidores também foi evidenciada, dentre eles, o GADD45B, que controla o reparo de DNA, IFIH1 e com destaque a via de NF-kappa-B. Ainda, Mukherjee e colaboradores (2008) analisando em larga escala as alterações transcricionais em corações de camundongos infectados por *T. cruzi* verificaram aumentos de expressão na fase aguda dos genes que codificam caspase 1 e 11, FAS e repressão de FASL, além de indução de genes anti-apoptóticos como Bcl2 e outros que interagem com o mesmo, indicando que a infecção não perturba a homeostase do Ca^{++} mitocondrial e a apoptose associada à essa organela está em parte prevenida, fazendo com que a doença atinja a fase crônica. Assim, é possível que genes relacionados à apoptose sejam modulados diferencialmente nas diferentes fases da infecção, favorecendo a dispersão do parasita, controle da carga parasitária no hospedeiro e/ou escape da resposta imune.

5.3 Alterações na expressão de genes envolvidos com a dinâmica do citoesqueleto

As primeiras alterações evidenciadas correspondem às vias de sinalização envolvidas com o remodelamento do citoesqueleto. Destacamos o aumento na expressão do gene IP3KB, uma enzima que participa de mecanismos de invasão dependente (Procópio *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002) e independente do citoesqueleto (Woolsey *et al.*, 2003), no estágio inicial recente da infecção (2 horas). A ativação de PI3K nas culturas de cardiomiócito pode ser disparada

pelo contato direto com moléculas na superfície do parasita, como descrito por Wilkowsky e colaboradores (2001), ou pela liberação de fatores solúveis pelo *T. cruzi*, promovendo a internalização do parasita. Interessantemente, uma pequena modulação de genes relacionados à proteínas do citoesqueleto foi revelada no estágio inicial de infecção (1 a 2 horas), sugerindo que um rápido remodelamento do citoesqueleto ocorra durante o processo de invasão sem prejuízo da integridade da arquitetura celular. A manutenção do citoesqueleto intacto em condições de rigidez celular inalteradas parece favorecer o processo de invasão e retenção do parasita na célula hospedeira (Mott *et al.*, 2009).

Em contraste, mudanças na modulação dos genes GEM e Plek foram observadas após 3 horas de interação. O aumento na expressão do gene GEM, relacionado com a inibição da via Rho (Hatzoglou *et al.*, 2007), está fortemente associado à dinâmica do remodelamento do citoesqueleto e perda de rigidez celular. Ainda, células transfectadas com o gene Plek, em que a expressão pode ser controlada, o aumento da expressão deste gene induziu a reorganização do citoesqueleto e dissolução de feixes de actina com reaparecimento de F-actina na região periférica da célula (Ma e Abrams, 1999). Assim, o aumento da expressão destes genes em cardiomiócitos infectados sugere o início do “remodelamento do ambiente intracelular” para abrigar a multiplicação e desenvolvimento dos amastigotas. Estudos demonstraram redução na rigidez celular associado à progressão da infecção de modo a alojar os amastigotas intracelulares e favorecer a multiplicação intracelular destes parasitas (Mott *et al.*, 2009). Dando suporte à redução, ainda que inicial, da propriedade mecânica do citoesqueleto, a expressão do gene Kank4, associado com a formação de fibras de estresse de actina (Zhu *et al.*, 2008), se encontra reprimido após 6 horas de interação, sugerindo que o escape do vacúolo parasitóforo e início da replicação do *T. cruzi* acarrete remodelamento do citoesqueleto para acomodação destes parasitas no citoplasma, domínio perinuclear, da célula hospedeira. No entanto, este evento parece envolver um intenso remodelamento no citoesqueleto de actina, uma vez que evidenciamos modulação positiva e negativa de genes diretamente ou indiretamente envolvidos com a organização desta proteína na cinética temporal de infecção. Curiosamente, indução do gene RAI14, que não possui função determinada, mas de acordo com os aspectos da localização da proteína expressa por este gene, associa-se à manutenção e organização das fibras de actina (Peng *et al.*, 2000), foi também evidenciada no tempo de 6 horas de infecção.

Ainda identificamos, após 5 horas de infecção, a modulação positiva dos genes RND1, membro da família Rho que regula a organização do citoesqueleto de actina acarretando

prejuízo das junções intercelulares (Nobes *et al.*, 1998), e NKD1, um regulador negativo da via de β catenina (Hahn *et al.*, 2006). Alterações em junções aderentes, com redução de β catenina e N-caderina, foram reportadas em cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi*, prejudicando a tensão cardíaca por distúrbios na associação de miofibrilas com a membrana plasmática (Melo *et al.*, 2008). Por outro lado, dados complementares obtidos na análise de microarranjo, revelaram inibição de genes envolvidos na manutenção de junções celulares, incluindo junções aderentes e comunicantes, após 48 horas de infecção (Manque *et al.*, 2011), sugerindo que possa ocorrer modulação sequencial de redes gênicas com efeito em estágios avançados da infecção.

A grande maioria dos genes modulados neste trabalho apresentou-se com expressão aumentada desde os tempos iniciais da cinética, e persistiu até o estágio intermediário, 24 horas, onde as formas amastigotas já se multiplicam livremente no citoplasma. Surpreendentemente, a grande redução na expressão de genes ocorreu nos estágios intermediários de infecção e estão associadas ao citoesqueleto. Um evento importante nesse estágio da cinética se refere aos danos na arquitetura do citoesqueleto, que acarreta efeito nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, relacionando-se com a integridade do tecido e comunicação intercelular. Neste contexto, dados do nosso grupo revelaram que a infecção pelo *T. cruzi* induz alterações relevantes na organização do citoesqueleto de cardiomiócitos, como destruição de miofibrilas, desorganização de filamentos intermediários e microtúbulos (Pereira *et al.*, 1993). Ainda, estas mudanças são acompanhadas de alterações na distribuição espacial e expressão de mRNA de isoformas de actina induzidas pelo *T. cruzi* que impossibilitam a reconstituição dos danos em miofibrilas causados pela infecção (Pereira *et al.*, 2000).

Assim, estendendo os conhecimentos na dinâmica de ativação e repressão de genes durante interação *T. cruzi*-cardiomiócito, nossos resultados apontaram para a diminuição da expressão de muitos genes relacionados com a arquitetura do citoesqueleto, especificamente membros da família de actina ou miosina, e com outros genes que se associam a essas famílias. Como exemplos, podemos citar: Actb12, Adam12, Afap12, Acta1, Actc1, Actg2, Mybpc3, Myh1, Myh2, Myh3, Myh4, Myh6, Myh7, Myh8, Myh13, Myl2, Itga8, Itgb1 (Rede gênica 8 e 12). Repressão de genes do citoesqueleto, incluindo miosina (Myl2, Myh10 e Myh11), proteínas associadas à miofibrila (Mfap4) e α -actinina-2 (Actn2), também foram relatadas em cardiomiócitos 48 horas pós infecção *in vitro* (Goldenberg *et al.*, 2009),

corroborando o efeito drástico da infecção pelo *T. cruzi* na organização de miofibrilas (Pereira *et al.*, 1993; Melo *et al.*, 2006; Taniwaki *et al.*, 2006).

Nos trabalhos em larga escala, usando microarranjos, as infecções experimentais de camundongos com *T. cruzi* descreveram poucas alterações no citoesqueleto. Garg e colaboradores (2003) analisando camundongos infectados após 3, 37 e 110 dias identificaram alterações no citoesqueleto apenas na fase crônica, neste caso considerado 110 dias pós-infecção (dpi), com redução em troponinas (T1 e T2). Sequencialmente, Mukherjee e colaboradores (2008) em uma cinética de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dpi descreveram alterações preferencialmente na fase aguda (30 dpi) com aumentos em miosina 5a, 1c, cabeça e cauda, além de tropomiosina 5, alfa actinina 2, tubulina beta 2 e 5, tubulina alfa 2 e ainda redução em miosina 1b. Embora as análises de microarranjo tenham contribuído com novas informações sobre as modulações de genes do citoesqueleto, o número limitado de genes dos arranjos usados pode representar apenas a identificação parcial dos genes alterados na infecção, refletindo a necessidade de se realizar novos experimentos *in vivo* usando, por exemplo, o sequenciamento em larga escala, a fim de expandir e descrever os genes modulados durante a infecção.

5.4 Alterações associadas à hipertrofia e matriz extracelular

Nossos dados apontam para sinais precoces de ativação de genes relacionados à hipertrofia cardíaca. Desde tempos iniciais (1 a 4 horas), os genes relacionados à hipertrofia com expressão aumentada associavam-se à via de NF-kappa-B, que aparece como elo entre diferentes redes gênicas (resposta imune e apoptose) e, ainda associado ao receptor toll-like 2 e IL1 β . Uma novidade foi a contribuição de IL6, que estimula as vias Jak-Stat, MAPK e PI3K, neste processo (Rohini *et al.*, 2010). Relato de hipertrofia induzida pelo *T. cruzi* foi previamente reportado com a progressão e estabelecimento da infecção (24 e 48 horas), onde cardiomiócitos atingiram o dobro de seu tamanho original (Petersen e Burleigh 2003; Petersen *et al.*, 2005). A hipertrofia cardíaca também foi evidenciada em modelo de cultivo tridimensional (3D), esferóides cardíacos, que reproduziram os aspectos da cardiopatia chagásica, demonstrando que a infecção pelo *T. cruzi* (144 horas) acarreta aumento de área e volume da célula juntamente com decréscimo da densidade celular (Garzoni *et al.*, 2008).

Elevada expressão do gene que codifica para metaloprotease, ADAMTS7B, associado à degradação de matriz extracelular, superfície celular e proteínas solúveis (Somerville *et al.*, 2004) e do receptor da via PTGIR foi evidenciada com 1 a 4 horas de infecção, sugerindo

uma modulação negativa de componentes de matriz extracelular neste período, uma vez que este gene atua na supressão de colágeno do tipo 1 e outros genes relacionados ao TGF β (Chan *et al.*, 2010).

No tempo inicial tardio (5 a 6 horas) ocorreram aumentos na expressão do gene que codifica para o fator transcricional Cebpb, que quando é reduzido através de exercícios físicos, por exemplo, pode inibir a falência cardíaca, sendo alvo em medicina regenerativa (Boström *et al.*, 2010), sindecam 4 (SDC4), que pode ser uma estratégia favorável à invasão do parasita mediada por proteoglicanos de heparam sulfato (Calvet *et al.*, 2003; Oliveira Jr *et al.*, 2008; Bambino-Medeiros *et al.*, 2011) e um gene da via AP1, JunB, que está envolvido com a ativação de metaloproteinase 2 (MMP2), um componente central na resposta ao dano (Alfonso-Jaume *et al.*, 2006), IL33 (Choi *et al.*, 2009) e FGR1 (Finetti *et al.*, 2008), que participam da angiogênese e, além disso, redução na expressão do gene Adamts5, uma agrecanase.

No tempo intermediário (24 horas pós-infecção) destaca-se a redução em GSK3B confirmando a hipertrofia, uma vez que este gene regula negativamente este evento e os estímulos hipertróficos o inibem (Hardt *et al.*, 2002). Interessantemente, a maior parte de novos genes com perfil alterado se associou à matriz extracelular, sendo evidenciado com expressão reprimida os genes BGN, elastina, fibronectina 1, Fbln5, Mgp, Mmp17, genes associados ao colágeno (CTHRC1, Col1A1, Col5A2, Col6A3, Col11A1, Col14A1, Col15A1, Col22A1) e, ainda, poucos genes com expressão aumentada, incluindo Dcn, Fbn, Muc15 e Srgc (Rede gênica 4 e 5).

Estudos anteriores, utilizando microarranjo como ferramenta, também revelaram modulação negativa de genes relacionados aos componentes de matriz extracelular durante infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi in vitro* (Goldenberg *et al.*, 2009; Manque *et al.*, 2011). No entanto, as alterações foram evidenciadas principalmente em tempos tardios de infecção (48 horas) com redução na expressão dos genes Adamts5, Mmm12, Mmp23, elastina Timp23, C1ga, colágenos (Col4A2, col6A1), catepsina S (Ctss), CxCL12, FkL12, laminina- γ -1, lisozima e seu precursor, Pcolce2, Pmp22, Pss11, Psap, Fbln5 e genes induzidos H2B1, H2-T23, Lgals3, Timp1 (Goldenberg *et al.*, 2009). Recentemente, demonstramos, através de uma cinética sequencial detalhada (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 horas pós infecção), que as alterações nos componentes de matriz ocorrem preferencialmente nos estágios avançados da infecção (24 a 48 horas) com redução em fibronectina 1, ITM2A, genes associados ao colágeno (ColA1, ColA2, Col3A1, Col5A1, Col8A1, Col15A), LiMS1, NEDD9, CYR61, ITGA5,

NID2 (Manque *et al.*, 2011). Em conjunto, estes resultados reforçam que a infecção pelo *T. cruzi* induz uma redução na expressão de componentes de matriz extracelular em culturas de cardiomiócitos.

Em contraste, ensaios de microarranjo com corações infectados *in vivo* demonstraram alterações na fase aguda (37° dpi) com aumento na expressão de componentes da matriz extracelular associados a diferentes tipos de colágeno, ditrofidistrofina, fibronectina, trombosponbina 2, osteoglicana e debrina e a marcadores da resposta hipertrófica como amilóide sérica, sialoforina, ANF, anexinas (Garg *et al.*, 2003).

Embora a fibrose seja uma importante manifestação da cardiopatia chagásica (Andrade *et al.*, 1989), este evento parece ser regulado por elevados níveis de mediadores solúveis, incluindo TGF β (Araújo-Jorge *et al.*, 2002). Ressaltamos ainda, que estudos evidenciaram aumento na expressão de matriz extracelular no final da fase aguda e, principalmente, fase crônica da doença, onde ninhos de amastigotas são raros com intensa inflamação do tecido (Andrade *et al.*, 1989; Calvet *et al.*, 2004). No modelo *in vitro*, cardiomiócitos altamente infectados pelo *T. cruzi* apresentam uma drástica redução da matriz de fibronectina e alteração na distribuição de laminina (Calvet *et al.*, 2004). O estímulo de culturas de cardiomiócitos infectados com TGF β induz remodelamento de fibronectina em cardiomiócitos não infectados, mas não é capaz de promover aumento na expressão de fibronectina e reorganizar sua distribuição na superfície de cardiomiócitos infectados (Calvet *et al.*, 2009), sugerindo que outros fatores como expressão de receptor de TGF β (TGF β RII) ou mesmo o remodelamento do citoesqueleto nas células infectadas podem interferir neste processo.

5.5 Efeito da infecção na expressão de genes mitocondriais

A sobrevivência celular se relaciona diretamente às mitocôndrias que atuam principalmente no metabolismo energético e produção de ATP, entretanto, apresentam outras funções associadas ao metabolismo de lipídeos e aminoácidos, a biossíntese de heme e ferro-enxofre, sinalização celular e apoptose (Meisinger *et al.*, 2008). Alterações no perfil de expressão gênica nessa organela foram identificadas em muitas doenças desde fatalidades neonatais até danos neurodegenerativos (Pagliarini *et al.*, 2008).

Na cinética temporal da interação *T. cruzi*-cardiomiócito avaliada em nosso estudo (1 a 6 horas e 24 horas), os distúrbios na modulação de genes mitocondriais foram discretos e evidenciados principalmente a partir do tempo de infecção intermediário (24 horas de infecção). Apenas 2 genes foram identificados como diferencialmente expressos no tempo

inicial recente (1 a 4 horas), sendo observado redução na expressão do gene Mrpl15, que codifica uma proteína ribossomal mitocondrial, e indução do gene da quinase CMPK2, envolvida com a síntese de DNA, reportado em níveis de expressão elevados em células leucêmicas e macrófagos durante a resposta inflamatória (Xu *et al.*, 2008). Com a progressão da infecção (5 a 6 horas), ocorreu redução na expressão do gene BDH1, que codifica uma enzima participante do metabolismo de ácidos graxos, e aumento na expressão do gene ATP5H, envolvido na síntese de ATP, citocromo B (MT-CYB) e genes associados à cadeia respiratória como MT-ND4 e MT-ND4L. No tempo intermediário (24 horas pós-infecção) os genes modulados se relacionavam ao metabolismo de etanol, onde ALD3HB1 e ALDH3A1 encontravam-se aumentados e ALDH1A1 e ALDH1A7 foram reprimidos. Assim, nossos resultados apontam para distúrbios na transcrição de genes envolvidos em vias metabólicas mitocondriais que podem ocasionar deficiência energética e disfunção mitocondrial.

Alterações associadas à mitocôndrias em cardiomiócitos não foram percebidas nos estágios iniciais de infecção pelo *T. cruzi* (1, 2, 4 e 6 horas) em nossos ensaios de microarranjo recentemente publicado (Manque *et al.*, 2011). Evidências de mudanças na expressão de genes mitocondriais foram detectadas apenas após 12 horas de infecção com repressão na expressão do gene que codifica para proteína ribossomal Mrpl16, indução da expressão de um gene membro da família de citocromo P450 (CYP1B1) e um gene codificador de uma proteína de membrana (IMMT). As maiores alterações transcricionais foram reveladas na fase tardia de infecção (24 horas e 48 horas) e se tratavam de reduções nos genes ATP5C1, uma subunidade de ATP sintase, citocromo B5 (CYB5), isocitrato desidrogenase (IDH1), CCT7, que codifica uma proteína ligadora de ATP, transferase OXCT1 e Peci envolvido com β oxidação de lipídeos. Em contraste, aumento na expressão do gene de citocromo c oxidase subunidade VIII (COX8A) e para uma proteína ribossomal, Mrpl49, foi observado neste tempo avançado da infecção. Assim, nossos resultados atuais complementam os dados iniciais de microarranjo e destacam que distúrbios mitocondriais podem ter início nos estágios iniciais da infecção com agravamento dos danos cardíacos nas fases aguda e crônica da doença.

Intensa modulação de transcritos mitocondriais foi evidenciada na doença de Chagas experimental. Garg e colaboradores (2003) realizando ensaios *in vivo* com microarranjos em uma cinética de 3, 37 e 110 dias pós-infecção (dpi) verificaram que nos corações infectados o surgimento de alterações mitocondriais ocorre a partir do 37^o dpi e permanecem relacionados à repressão do complexo de fosforilação oxidativa inicialmente com 8 genes modulados (37^o

dpi) e sequencialmente com 26 genes alterados (110° dpi), onde este evento se associou a outras modulações indicativas de remodelamento cardíaco. Através da análise de “mitoarray”, um arranjo específico para genes mitocondriais, foi demonstrado indução de genes associados à via de β oxidação de ácido graxo que compensam as reduções no complexo piruvato desidrogenase relacionadas ao abastecimento de acetil-CoA para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ainda, os níveis reduzidos de complexos da cadeia respiratória e modulação de genes da via metabólica oxidativa sugerem um importante distúrbio na homeostase cardíaca na doença de Chagas.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu verificar que:

- A infecção pelo *T. cruzi* induz uma resposta imediata dos cardiomiócitos contra este parasita, acarretando uma intensa modulação de genes nos estágios iniciais da infecção (1 a 4 horas) envolvidos majoritariamente com a resposta pró-inflamatória, estresse oxidativo e metabolismo de radicais livres;
- A infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos induz a expressão de genes relacionados à resposta hipertrófica desde o tempo inicial recente (1 a 4 horas);
- Ocorre modulação negativa de genes relacionados à proteínas do citoesqueleto preferencialmente no estágio intermediário da infecção (24 horas), quando formas amastigotas se multiplicam no citoplasma dos cardiomiócitos, corroborando dados de desorganização do citoesqueleto durante o desenvolvimento intracelular do *T. cruzi*;
- Genes pró- e anti-apoptóticos alternam sua expressão durante a cinética de interação com *T. cruzi*. Em estágios de infecção tardios (5 a 6 horas) e intermediário (24 horas) ocorre prevalência de genes indutores de apoptose, sugerindo que o processo de morte celular programada atue na regulação da dispersão do parasita, controle de carga parasitária no hospedeiro e/ou escape da resposta imune;
- Repressão de genes envolvidos com o remodelamento da matriz extracelular, incluindo componentes de matriz extracelular e inibidores de metaloproteinases, se destaca em tempos avançados da infecção (24 horas);
- A maior modulação de genes relacionados às mitocôndrias acontece no estágio intermediário de infecção (24 horas).

7 PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu aprofundar as alterações no transcrito durante a interação *T. cruzi*-cardiomiócito analisando a célula hospedeira. Em uma primeira etapa buscaremos validar biologicamente estes dados e a partir desta validação poderemos aprofundar nossos estudos para melhorar o entendimento sobre genes modulados durante a diferenciação, escape do vacúolo parasitóforo e multiplicação dos amastigotas.

Doenças complexas como a de Chagas não podem ser completamente explicadas usando tecnologias reducionistas, ou mesmo, apenas uma tecnologia em larga escala. Com base nisto estamos desenvolvendo outros experimentos em larga escala (associados à metodologia de análise proteômica usando espectrometria de massas) e desta forma, esperamos poder integrar estes resultados buscando novos avanços no entendimento da interação patógeno-hospedeiro. Neste sentido o conjunto de dados apresentados neste trabalho, somados aos disponíveis na literatura, podem se constituir nos alicerces destes trabalhos, onde estaremos abordando o processo de interação parasita hospedeiro sob a ótica da interação dos programas de expressão gênica do parasita e da célula hospedeira.

Outro desdobramento interessante do presente trabalho foi o fato de que, ao utilizar a técnica de RNA-Seq, também identificamos os transcritos do parasita e, conseqüentemente, as suas modulações. Até o presente momento, não há nenhum relato da modulação do transcrito do parasita concomitantemente com a modulação do transcrito da célula hospedeira, o que reforça a importância dos dados gerados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 114: 143-150.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281 (5381): 1322-1326.
- Adesse D, Garzoni LR, Huang H, Tanowitz HB, Meirelles MN, Spray DC. *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. *Microbes Infect* 2008; 10 (1): 21-28.
- Adesse D, Iacobas DA, Iacobas S, Garzoni LR, Meirelles MN, Tanowitz HB, Spray DC. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82 (5): 846-854.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124 (4): 783-801.
- Alam T, An MR, Papaconstantinou J. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 1992; 267 (8): 5021-5024.
- Alfonso-Jaume MA, Bergmann MR, Mahimkar R, Cheng S, Jin ZQ, Karliner JS, Lovett DH. Cardiac-ischemia reperfusion injury induces matrix metalloproteinase-2 expression through the AP-1 components FosB and JunB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291 (4): H1838-H1846.
- Altamura C, Squitti R, Pasqualetti P, Gaudino C, Palazzo Tibuzzi F, Lupoi D, Cortesi M, Rossini PM, Vernieri F. Ceruloplasmin/Transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke* 2009; 40 (4): 1282-1288.
- Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life* 2007; 59 (4-5): 274-279.
- Alves MJ, Mortara RA. A century of research: what have learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 4 (1): 76-88.
- Amer AO, Swanson MS. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Current Opinion Microbiol* 2002; 5: 56-61.
- Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cell. *J Exp Med* 2004; 200 (9): 1135-1143.
- Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi* - host cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiol* 2005; 3 (10): 819-823.

Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40 (3): 252-260.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (1): 71-80.

Andrews NW. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biology* 2002; 158 (3): 389-394.

Araújo-Jorge TC, Barbosa HS, Meirelles MNL. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: Perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 (5): 43-56.

Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi ML, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Implication of transforming growth factor-beta 1 in Chagas disease myocardial pathology. *J Infect Dis* 2002; 186 (12): 1823-1828.

Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro MN, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardial pathology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19 (5-6): 405-413.

Araya JE, Cano MI, Yoshida N, Franco-da-Silveira J. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 161-169.

Arm JP, Gurish MF, Reynolds Ds , Scott HC, Gartner CS, Austen KF, Katz HR. Molecular cloning of gp49, a cell-surface antigen that is preferentially expressed by mouse mast cell progenitors and is a new member of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 1991; 266 (24): 15966-15973.

Asefa B, Klarmann KD, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Keller JR. The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32 (1): 155-167.

Aufderheide AC. *The scientific study of mummies*. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.

Auger A, Storino R, De Rosa M, Caravello O, Gonzalez M, Botaro E, Bonelli L, Rossini O. Chagas y SIDA, la importancia del diagnostico precoz. *Rev Argent Cardiol* 2005 73: 439-445.

Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2010; 285 (15): 11596-11606.

Baida RCP, Santos MRM, Carmo MF, Yoshida N, Ferreira D, Ferreira AT, El Sayed NM, Andersson B, Silveira JF. Molecular characterization of serine -, alanine -, and alanine rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. *Infection Immun* 2006; 74 (3): 1537-1546.

Bambino-Medeiros R, Oliveira FO, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA, Meirelles MN, Pereira MC. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 2011 138 (5): 593-601.

Barbosa HS, Meirelles MNL. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct Funct* 1995; 20 (4): 275-284.

Barbosa HS, Meirelles MNSL. Ultrastructural detection *in vitro* of WGA-, RCAI-, and ConA-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1992; 78 (5): 404-409.

Barbosa HS. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; Suppl 1: 153-154.

Barrias ES, Dutra JMF, de Souza W, Carvalho TMU. Participation of macrophage rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363 (3): 828-834.

Barrias ES, Reignault LC, de Souza W, Carvalho TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS One* 2010; 5 (1): e7764.

Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* 2008; 8 (6): 510-518.

Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, Gupta RK, Xiao C, MacRae CA, Rosenzweig A, Spiegelman BM. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* 2010; 143 (7): 1072-1083.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev of Microbiology* 1973; 27: 347-382.

Briggs RC, Shults KE, Flye LA, McClintock-Treep SA, Jagasia MH, Goodman SA, Boulos FI, Jacobberger JW, Stelzer GT, Head DR. Dysregulated human myeloid nuclear differentiation antigen expression in apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66 (9): 4645-4651.

Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 2007; 23 (8): 376-383.

Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, Wood SM. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun* 2011; 3 (3): 216-226.

Buates S, Matlashewski G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 2001; 166 (5): 3416-3422.

Burgevin A, Saveanu L, Kim Y, Barilleau E, Kotturi M, Sette A, van Endert P, Peters B. A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity. *PloS One* 2008; 3 (6): e2402.

Burleigh BA, Andrews NW. A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in generation of a novel Ca²⁺ signalling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* 1995b; 270: 5172-5180.

Burleigh BA, Andrews NW. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 461-465.

Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 1995a; 49: 175-200.

Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews NW. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cell. *J Cell Biol* 1997; 136: 609-620.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiol* 2002; 4 (11): 701-711.

Burleigh BA. Probing *Trypanosoma cruzi* biology with DNA microarrays. *Parasitology* 2004; 128: S3-S10.

Cabrine-Santos M, Silva EL, Chapadeiro E, Ramírez LE. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Experimental Parasitol* 2001; 99: 160-167.

Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 1998; 17 (17): 4975-4986.

Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC. *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.

Calvet CM, Oliveira Jr FO, Araújo-Jorge TC, Pereira MC. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol* 2009; 299 (4): 301-312.

Calvet CM, Toma L, De Souza FR, Meirelles M de N, Pereira MC. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50 (2): 97-103.

Campos de Carvalho AC, Tanowitz HB, Wittner M, Dermietzel R, Roy C, Hertzberg EL, Spray DC. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. *Circulation Research* 1992; 70 (4): 733-742.

Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Grajani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ* 2008; 15 (2): 299-311.

Cazzulo JJ, Cazzulo Franke MC, Martínez J, Franke de Cazzulo BM. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1037 (2): 186-191.

Chagas C. Nova tripanozoniase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1 (2): 159-218.

Chan EC, Dusting GJ, Guo N, Peshavariva HM, Taylor CJ, Dilley R, Narumiya S, Jiang F. Prostacyclin receptor suppresses cardiac fibrosis: role of CREB phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49 (2): 176-185.

Chen LY, Liu X, Xang SL, Qin CY. Over-expression of the endocan gene in the endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumor invasion. *J Int Med Res* 2010; 38 (2): 498-510.

Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim YM, Kwon YG. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood* 2009; 114 (14): 3117-3126.

Clifton DR, Rydkina E, Freeman RS, Sahni SK. NF- κ -B activation during *Rickettsia rickettsii* infection of endothelial cells involves the activation of catalytic I- κ -B kinases IKK α and IKK β and phosphorylation-proteolysis of the inhibitor protein IKB α . *Infection and Immunity* 2005; 73 (1): 155-165.

Colli W, Alves MJM. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (1): 37-49.

Cordova E, Boschi A, Ambrosioni J, Cudos C, Corti M. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. *International J Infect Dis* 2008; 12: 587-592.

Cortez M, Atayde V, Yoshida N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes and Infection* 2006; 8: 1502-1512.

Costa V, Angelini C, de Féis I, Ciccodicola A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 853916.

Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(1): 3-24.

Coura JR. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. *Rev Soc Bras de Med Trop* 2006; 39 (4): 113-117.

Cullum R, Alder O, Hoodless PA. The next generation: using new sequencing technologies to analyze gene regulation. *Respirology* 2011; 16 (2): 210-222.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005; 167 (2): 305-313.

de Souza EM, Araújo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, Soeiro MN. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell Tissue Res* 2003; 314 (2): 223-235.

de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 295394.

de Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. (2002). *Kinetoplastid Biol Dis* 2002; 1: 3.

Degrandi D, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Wurrthner J, Kurig S, Pfeffer K. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 2007; 179 (1): 7729-7740.

Di Noia JM, D'Orso I, Aslund L, Sanchez DO, Frasch AC. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem* 1998; 273: 10843-10850.

Di Sano F, Fazi B, Tufi R, Nardacci R, Piacentini M. Reticulon-1C acts as a molecular switch between endoplasmic reticulum stress and genotoxic cell death pathway in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2007; 102 (2): 345-353.

Dias JCP. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas: 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Diczfalusy U, Olofsson KE, Carlsson AM, Gong M, Golenbock DT, Rooyackers O, Flaring U, Bjorkbacka H. Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *J Lipid Res* 2009; 50 (11): 2258-2264.

Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SNJ. The role of Ca²⁺ in the process of the cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today* 1996; 12: 61-65.

Dron M, Meritet JF, Dandoy-Dron F, Meyniel JP, Maury C, Tovey MG. Molecular cloning of ADIR, a novel interferon responsive gene encoding a protein related to the torsins. *Genomics* 2002; 79 (3): 315-325.

Dvorak JA. New *in vitro* approach to quantification of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research Scientific Publication* 1975; 318: 109-120.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (25): 14863-14868.

El Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Hass B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, Silveira JF, De Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch, AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Aken SV, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005; 309 (5733): 409-415.

Eliopoulos AG, Das S, Tsihchlis PN. The tyrosine kinase Syk regulates TPL2 activation signals. *J Biol Chem* 2006; 281 (3): 1371-1380.

Elizari MV. La miocardiopatía chagásica. Perspectiva histórica. *Medicina Buenos Aires* 1999; 59: 25-40.

Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2010; 126 (3): 283-291.

Eskildsen S, Hartmann, Kieldgaard NO, Justesen J. Gene structure of the murine 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell Mol life Sci* 2002; 59 (7): 1212-1222.

Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R. Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic Acids Res* 2003; 31 (12): 3166-3173.

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Mendonça de Souza SMF, Ferreira LF, Vicente ACP, Jansen AM. Pre-columbian Chagas disease in Brasil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103 (5): 514-516.

Fernandes MC, Cortez M, Yoneyama KAG, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication and host cell microdomains. *Int J Parasitol* 2007; 37: 1431-1441.

Fernández MA, Muñoz-Fernández MA, Fresno M. Involvement of β_1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *European J Immunology* 1993; 23 (2): 552-557.

Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect Immun* 2006; 74 (10): 5522-5528.

Finetti F, Solito R, Morbidelli L, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J Biol Chem* 2008; 283 (4): 2139-2146.

Florian Sanz F, Gomes Navarro C, Castrillo Garcia N, Pedrote Martinez A, Lage Garcia E, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 1991; 7: 240-244.

Garg N, Gerstner A, Bhatia V, DeFord J, Papaconstantinou J. Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways. *Biochem J* 2004; 381 (Pt 3): 743-752.

Garg N, Vsevolod LP, Papaconstantinou 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* 2003; 1683: 106-120.

Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, Meirelles MN. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis* 2008; 197 (6): 906-915.

Garzoni LR, Masuda MO, Capella MM, Lopes AG, Meirelles MNSL. Characterization of [Ca²⁺] responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (4): 487-493.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop 2010; 115 (1-2): 22-27.

Gironès N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? Trends Parasitol 2003; 19 (1): 19-22.

Goenka S, Cho SH, Boothby M. Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly (ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription. J Biol Chem 2007; 282 (26): 18732-18739.

Goldenberg RC, Iacobas DA, Iacobas S, Rocha LL, da Silva de Azevedo Fortes F, Vairo L, Nagajyothi F, Campos de Carvalho AC, Tanowitz HB, Spray DC. Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. Microbes Infect 2009; 11 (14-15): 1140-1149.

Goldszmid RS, Bafica A, Jankovic D, Feng CG, Caspar P, Winkler-Pickett R, Trinchieri G, Sher A. TAP-1 indirectly regulates CD4⁺ T cell priming in *Toxoplasma gondii* infection by controlling NK cell IFN-gamma production. J Exp Med 2007; 204 (11): 2591-2602.

Gradient RA, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. Stem Cells 1999; 17 (3): 127-137.

Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, Teixeira AR, Schrevel J, Davioud-Charved E, Sergheraert C, Santana JM. *Trypanosoma cruzi* proliloligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. J Biol Chem 2001; 276: 47078-47086.

Gupta S, Bhatia V, Wen J, Wu Y, Huang M, Garg N. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. Free Radic Biol Med 2009; 47 (10): 1414-1421.

Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunology 2009; 31: 673-685.

Hahn JY, Cho HJ, Bae JW, Yuk HS, Kim KI, Park KW, Koo BK, Chae IH, Shin CS, Oh BH, Choi YS, Park YB, Kim HS. Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. J Biol Chem 2006; 281 (41): 30979-30989.

Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8 (7): 533-544.

Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Cir Res* 2002; 90 (10): 1055-1063.

Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Yoshita K, Aizawa S, Kitagawa M. A novel role for acinos and MCM2 as host-specific signaling enhancers of DNA-damage-induced apoptosis in association with viral protein gp70. *Leuk Res* 2009; 33 (8): 1100-1107.

Hatzoglou A, Ader I, Splingard A, Flanders J, Saade E, Leroy I, Traver S, Aresta S, Gunzburg J. Gem associates with Ezrin and acts via Rho-GAP protein Gmp1 to down regulate the Rho pathway. *Mol Biol Cell* 2007; 18 (4): 1242-1252.

Hotez PJ, Botazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. (2008). The neglected tropical diseases of Latin American and The Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Disease* 2 (9): e300.

Huang H, Caldern TM, Berma JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF- κ B and induces vascular adhesion molecule expression. *Infection and Immunity* 1999; 67 (10): 5434-5440.

Imai K, Tatsuyuki M, Kawai M, Koga H. Microarray analysis of host gene-expression during intracellular nests formation of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbiol Immunol* 2005; 49 (7): 623-631.

Jackson RS, Cho YJ, Liang P. TIS11D is a candidate pro-apoptotic p53 target gene. *Cell Cycle* 2006; 5 (24): 2889-2893.

Jackson Y, Chappuis F, Loutan L. Chagas disease in Switzerland: managing an emerging infection and interrupting its transmission. *Rev Med Suisse* 2008; 4 (157): 1212-1217.

Jenner RG, Young RA. Insights into hosts responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature* 2005; 3: 281-294.

Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 2002; 27 (5): 235-241.

Kim H, Jung Y, Shin BS, Kim H, Song H, Bae SH, Rhee SG, Jeong W. Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2. *J Biol Chem* 2010; 285 (45): 34419-34428.

- Kima PE, Burleigh B, Andrews NW. Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 2000; 2 (6): 477-486.
- Kirchhoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejia M, Pena-Munoz JG. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion* 2006; 46 (2): 298-304.
- Klamp T, Boehm U, Schenk D, Pfeffer K, Howard JC. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J Immunol* 2003; 171 (3): 1255-1265.
- Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 435-441.
- Lee SH, Vidal SM. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res* 2002; 12 (4): 527-530.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigbert BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom F, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljanzy G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool* 1980; 27: 37-58.
- Ley V, Robbins ES, Nessenweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* 1990; 171: 401-413.
- Ma AD, Abrams CS. Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via Rac-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; 274 (40): 28730-28735.
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxid-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 2000; 102 (24): 3003-3008.
- Malakhova OA, Yan, M, Malakhov MP, Yuan Y, Ritchie KJ, Kim KI, Peterson LF, Shuai K, Zhang DE. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev* 2003; 17 (4): 455-460.
- Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 1999; 237: 1-14.
- Mangan MS, Kaiserman D, Bird PI. The role of serpins in vertebrate immunity. *Tissue Antigens* 2008; 72 (1): 1-10.

Manna PP, Dimitry J, Oldenborg PA, Frazier WA. CD47 augments FAS/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280 (33): 29637-29644.

Manque PA, Probst C, Pereira MCS, Rampazzo RCP, Ozaki LS, Pavoni DP, Silva Neto DT, Carvalho MR, Xu P, Serrano MG, Alves JMP, Meirelles MN, Goldenberg S, Krieger MA, Buck GA. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect Immun* 2011; 79 (5): 1855-1862.

Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2008; 28: 1-13.

Marguerat S, Bähler J RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010; 67: 569-579.

Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today* 1995; 11 (1): 30-32.

Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics* 2009; 64 (12): 1219-1224.

Matthews KR. Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. *Science* 2011; 331 (6021): 1149-1153.

McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998; 273 (27): 16968-16975.

McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol* 2011; 23 (1): 46-56.

Meirelles MN, de Araújo Jorge TC, de Souza W, Moreira AL, Barbosa HS. *Trypanosoma cruzi*: phagolysosomal fusion after invasion into non professional phagocytic cells. *Cell Struct Funct* 1987; 12 (4): 387-393.

Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N. The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* 2008; 134 (1): 22-24.

Melo TG, Almeida DS, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol* 2004; 83 (10): 531-540.

Melo TG, Almeida DS, Meirelles MNSL, Pereira MCS. Disarray of sarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2006; 133 (2): 171-178.

Melo TG, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* alters adherens junctions in cardiomyocytes. *Microbes Infect* 2008; 10 (12-13): 1405-1410.

Michailowsky V, Celes MRN, Marino AP, Silva AA, Vieira LQ, Rossi MA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J, Silva JS. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired

recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 2004; 173: 463-470.

Ming M, Ewen ME, Pereira MEA. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. Cell 1995; 82: 287-296.

Mitaksov V, Fremont DH. Structural definition of the H-2kd peptide-binding motif. J Biol Chem 2006; 281 (15): 10618-10625.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin América and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104 (1): 17-30.

Monteón VM, Furuzawa-Carbadella J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL, Reyes PA. American trypanosomosis: *in situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. Exp Parasitol 1996; 83 (3): 267-274.

Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics 2008; 92 (5): 255-264.

Mortara RA, Silva S, Araguth MF, Blanco AS, Yoshida N. Polymorphism of 35 and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. Infect Immun 1992; 60: 4673-4678.

Mott A, Lenormand G, Costales J, Fredberg JJ, Burleigh B. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. J Cell Physiol 2009; 218 (2): 315-322.

Mukherjee S, Belbin TJ, Spray DC, Iacobas DA, Weiss LM, Kitsis RN, Wittner M, Jelicks LA, Scherer PE, Ding A, Tanowitz HB. Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. Parasitol Res 2003 91 (3): 187-196.

Mukherjee S, Nagajyothi F, Mukhopadhyay A, Machado FS, Belbin TJ, Campos de Carvalho A, Guan F, Albanese C, Jelicks LA, Lisanti MP, Silva JS, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Genomics 2008; 91 (5): 423-432.

Neira I, Ferreira AT, Yoshida N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. Int J Parasitol 2002; 32: 405-414.

Nijar SS, Del Bigio MR. Cerebral trypanosomiasis in an incarcerated man. CMAJ 2007; 176: 448.

Ning Y, Bai Q, Lu H, Li X, Pandak WM, Zhao F, Chen S, Ren S, Yin L. Overexpression of mitochondrial cholesterol delivery protein, StAr, decreases intracellular lipids and inflammatory factors secretion in macrophages. *Atherosclerosis* 2009; 204 (1): 114-120.

Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 1998; 141(1): 187-197.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araújo WT. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 653-655.

Nowicki MJ, Chinchilla C, Corado L, Matsuoka L, Selby R, Steurer F, Mone T, Mendez R, Aswad S. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among solid organ donors in Southern California: a population at risk. *Transplantation* 2006; 81: 477-479.

Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The clinical and diagnostic significance of anti-myosin autoantibodies in cardiac disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011a.

Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The diagnostic and clinical significance of anti-muscarinic receptor autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011b.

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR-live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15 (1): 49-57.

Oliveira Jr FO, Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Castro Cortês LM, Krieger MA, Meirelles MN, Souza Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparin sulfate-binding domain. *Microb Pathog* 2008; 44 (4): 329-338.

Opperdoes FR. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. 1 ed New York: Academic Press Harcourt Brace & Company, Publishers; 1995.

Ortega-Barria E, Pereira ME. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 1991; 67 (2): 411-421.

Ouaissi A, Ouaissi M, Tavares J, Silva AC. Host cell phenotypic variability induced by trypanosomatid-parasit-releases immunomodulatory factors: Physiopathological implications. *Journal of Medicine and Biotechnology* 2004; 3: 167-174.

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth AS, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneth A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr AS, Mootha VK. A

mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 2008; 134 (1): 112-123.

Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin* 2011; 29 (1): 53-62.

Patel BN, Dunn RJ, Jeong, SY, Zhu Q, Julien JP, David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci* 2002; 22 (15): 6578-6586.

Peng YF, Mandai K, Sakisaka T, Okabe N, Yamamoto S, Yokoyama S, Mizoguchi A, Shiozaki H, Monden M, Takai Y. Ankycorbin: a novel actin cytoskeleton-associated protein. *Genes Cells* 2000; 5 (12): 1001-1008.

Pereira MC, Costa M, Chagas Filho C, Meirelles MN. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993; 25 (4): 559-569.

Pereira MC, Singer RH, Meirelles MN. *Trypanosoma cruzi* infection affects actin mRNA regulation in heart muscle cells. *J Eukaryot Microbiol* 2000b; 47 (3): 271-279.

Pereira MCS, Singer RH, Meirelles MNSL. Ultrastructural distribution of poly (A)⁺ RNA during *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction *in vitro*: A quantitative analysis of the total mRNA content by in situ hybridization. *J Eukaryot Microbiol* 2000a; 47 (3): 264-270.

Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun* 2003; 71 (8): 4441-4447.

Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 beta dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2005; 73 (10): 6974-6980.

Petersen CA, Krumholz KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA. *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infection and Immunity* 2006; 74 (3): 1580-1587.

Pitella JEH. Central nervous system involvement in Chagas ` disease. An updating. *Rev Inst Med Tropical* 1993; 35 (2): 111-116.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001; 1 (2): 92-100.

Procópio DO, da Silva S, Cunningham CC, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 1998; 90 (1): 1-13.

Ramirez MI, Ruiz RC, Araya JE, Franco-da-Silveira J, Yoshida N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun* 1993; 61: 3636-3641.

Rassi AJ, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375: 1388-1402.

Rassi AJ, Rassi A, Little WC. Chagas` heart disease. *Clin Cardiol* 2000; 23: 883-889.

Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002; 366 (Pt1): 45-55.

Rho SB, Woo JS, Chun T, Park SY. Cysteine-rich 61 (CYR61) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Biotechnol Lett* 2009; 31 (1): 23-28.

Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*: 26 (1): 139-140.

Rodrigues Jr V, Agrelli GS, Leon SC, Silva Teixeira DN, Tostes SJr, Rocha-Rodrigues DB. Fas/Fas-L expression apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas`disease. *Microbes Infect* 2008; 10 (1): 29-37. *Microbes Infect* 2008; 10 (1): 29-37.

Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. cAMP regulates Ca²⁺ dependent exocytosis of lysosomes and lysosome mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem* 1999; 274: 16754-16759.

Rodríguez A, Samoff E, Riolt MG, Chung A, Andrews NW. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* 1996; 134 (2): 349-362.

Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* 2010; 61 (4): 269-280.

Romaña C. Dos casos agudos más de enfermedad de Chagas en el Norte Santafesino. *MEPRA* 1935; 21: 14-18.

Rosestolato CT, Dutra JM, de Souza W, de Carvalho TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27 (2): 91-98.

Ruiz RC, Rigoni VL, Gonzalez J, Yoshida N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol* 1993; 15: 121-123.

Sanchez J, Milei J, Zu-Xi Y, Storino R, Wenthold R, Ferrans V. Immunohistochemical localization of laminin of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: Relationship to thickening of basement membranes. *Am Heart J* 1993; 126 (6): 1392-1401.

Santana JM, Grellier P, Schrevel J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen type I and IV. *Biochem J* 1997; 325 (Pt 1): 129-137.

Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Muller-Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J Exp Med* 2000; 192: 1289-1300.

Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* and cell invasion. *Parasitol Today* 1993; 9: 218-222.

Schenkman S, Jiang M, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 1991; 65: 1117-1125.

Schenkman S, Mortara RA. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Science* 1992; 101: 895-905.

Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Nussenzweig V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med* 1992; 175: 567-575.

Schenkman, S.; Ferguson, M. A. J.; Heise, N.; Cardoso-de-Almeida, M. L.; Mortara, R. A.; Yoshida, N. (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 59: 293-304.

Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas: 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Schroder K, Hertzog, PJ, Ravasi, T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms, and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 163-189.

Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, Linhart C, Steinfeld I, Sharan R, Shiloh Y, Elkon R. Expander-an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 232.

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* 2008; 102 (4): 715-722.

Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Barreto AC, Higaki Y, Moreira AA, Funayama G, Barone AA, Duarte A, Odone V, Cerri GC, Sato M, Pozzi D, Shiroma M. Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990; 32 (1): 16-27.

Silva AA, Roffe E, Lannes-Vieira J. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Méd Biol Res* 1999; 32 (5): 593-600.

Somerville RP, Longpré JM, Apel ED, Lewis RM, Wang LW, Sanes JR, Leduc R, Apte SS. ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain. *J Biol Chem* 2004; 279 (34): 35159-35175.

Stawowczyk M, Van Scoy S, Kumar KP, Reich NC. The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem* 2011; 286 (9): 7257-7266.

Sugiyama S, Nakabayashi K, Baba I, Sasazuki T, Shirasawa S. Role of epiregulin in peptidoglycan-induced proinflammatory cytokine production by antigen presenting cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337 (1): 271-274.

Taniwaki NM, Andreoli WK, Calabrese KS, da Silva S, Mortara RA. Disruption of myofibrillar proteins in cardiac muscle of *Calomys callosus* chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with immunosuppressive agent. *Parasitol Research* 2005; 97: 323-331.

Taniwaki NN, Machado FS, Massensini AR, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi* disrupts myofibrillar organization and intracellular calcium levels in mouse neonatal cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* 2006; 324 (3): 489-496.

Tanowitz HB, Gumprecht JP, Calderon TM, Ventura MC, Reventos-Suarez C, Kellie S, Factor SM, Hatcher VB, Wittner M, Berman J. Cytokine gene expression of endothelial infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1992b; 166 (3): 598-603.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris AS, Weiss LM, Wittner M. Chagas' Disease. *Lin Microbiol Reviews* 1992a; 5 (4): 400-419.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 1992; 71: 1117-1130.

Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, Rickefs SW, Porcella SF, Li L, Ellies LG, Wynn TA. *PLoS Pathog* 2008; 4 (3): e1000023.

Trinh DV, Zhu N, Farhang G, Kim BJ, Huxford T. The nuclear I κ B protein I κ B ζ specifically binds NF- κ B p50 homodimers and forms a ternary complex on κ B DNA. *J Mol Biol* 2008; 379: 122-135.

Turchi L, Fareh M, Aberdem E, Kitajima S, Simpson F, Wicking C, Aberdam D, Virolle T. ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV stress. *Cell Death Differ* 2009; 16 (5): 728-737.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-81.

Uceyler N, Göbel K, Meuth SG, Ortler S, Stoll G, Sommer C, Wiendl H, Kleinschnitz C. *Exp Neurol* 2010; 222 (1): 153-160.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* 2003; 19 (11): 495-501.

Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothroyd JC, Burleigh BA. Immediate/ early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* 2002; 277 (1): 639-644.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes Jr S, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 2000; (156): 1805-1809.

Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshaves K, Fairbrother WJ, Vucic D. cIAP1 and cIAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNF α)-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2008; 283 (36): 24295-24299.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76 (5): 777-779.

Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-García C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res* 2003; 89: 480-486.

Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padrón T, Souza W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol* 2002; 118 (6): 491-500.

Vieira MC, de Carvalho TU, de Souza W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 15 (2): 967-971.

Villalta F, Madison MN, Kleshchenko YY, Nde PN, Lima MF. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Front Biosci* 2008; 13: 3714-3734.

Vitale D. Interpreting mRNA electropherograms. www.agilent.com/chem/labonachip, número de publicação: 5988-3001EN, 2001.

Waghabi MC, Coutinho-Silva R, Feige J, Higuchi ML, Becker D, Burnstock G, Araújo-Jorge TC. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- β and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (8): 1083-1090.

Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, Soeiro MNC, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feije JJ, Bailly S. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51 (8): 2905-2910.

Waghabi MC, Keramidas M, Feije JJ, Araújo-Jorge TC, Bailly S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 2005; 7 (4): 511-517.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Ver Genet* 2009; 10 (1): 57-63.

WHO - World Health Organization. (2000). Weekly epidemiology record 2. 10-12.

WHO - World Health Organization. (2002). Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series 905.

WHO - World Health Organization. (2007). Grupo de Trabajo Científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09, Geneve.

Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res* 2001; 264 (2): 211-218.

Wold B, Myers RM. Sequence census methods for functional genomics. *Nature Methods* 2008; 5: 19-21.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SN, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase -dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Science* 2003; 116: 3611-3622.

Xu Y, Johansson M, Karlsson A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem* 2008; 283 (3): 1563-1571.

Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB-kinases: key regulators of NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004; 29 (2):72-79.

Yan Q, Dutt S, Xu R, Graves K, Juszczynski P, Manis JP, Shipp MA. BBAP monoubiquitylates histone H4 at lysine 91 and selectively modulates the DNA damage response. *Mol Cell* 2009; 36 (1): 110-120.

Yang HY, Wang YM, Peng SQ. Metallothionein-I/II null cardiomyocytes are sensitive to Fusarium mycotoxin butenolide-induced cytotoxicity. *Toxicol* 2010; 55 (7): 1291-1296.

Yoshida N, Cortez M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signalling during the invasion process. *Subcell Biochem* 2008; 47: 82-91.

Yoshida N, Favoreto JRS, Ferreira AT, Manque PM. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 269-278.

Yoshida N, Mortara RA, Araguth MF, Gonzalez JC, Russo M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1989; 57: 1663-1667.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais Acad Bras Ciências* 2006; 78 (1): 87-111.

Zeledon, R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999, 94 (1): 217-218.

Zhang L, Tang Y, Tie Y, Wang J, Dong Y, Sun Z, He F. The PH domain containing protein CKIP-1 binds to IFP35 and Nmi and is involved in cytokine signaling. *Cell Signal* 2007; 19 (5): 932-944.

Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 1999; 180: 480-486.

Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Yonce C, Binkley PF, Kolattukudy PE. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Cir Res* 2006; 98 (9): 1177-1185.

Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: Global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 14470-14475.

Zhu Y, Kakinuma N, Wang Y, Kiyama R. Kank proteins: a new family of ankyrin-repeat domain containing proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780 (2): 128-133.

9 ANEXOS

9.1 Artigos publicados

9.1.1 *Infection and Immunity: Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes.*

9.1.2 *Molecular and Biochemical Parasitology: Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein (KAP3) in Trypanosoma cruzi: Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation.*

9.2 Artigos submetidos

9.2.1 *FEMS Microbiology Letters: The zinc finger TcZFP2 regulates the abundance of its target mRNAs during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.*

9.2.2 *PLoS ONE: Profiling the Trypanosoma cruzi phosphoproteome.*



9.11.pdf



9.12.pdf



9.21.pdf



9.22.pdf