

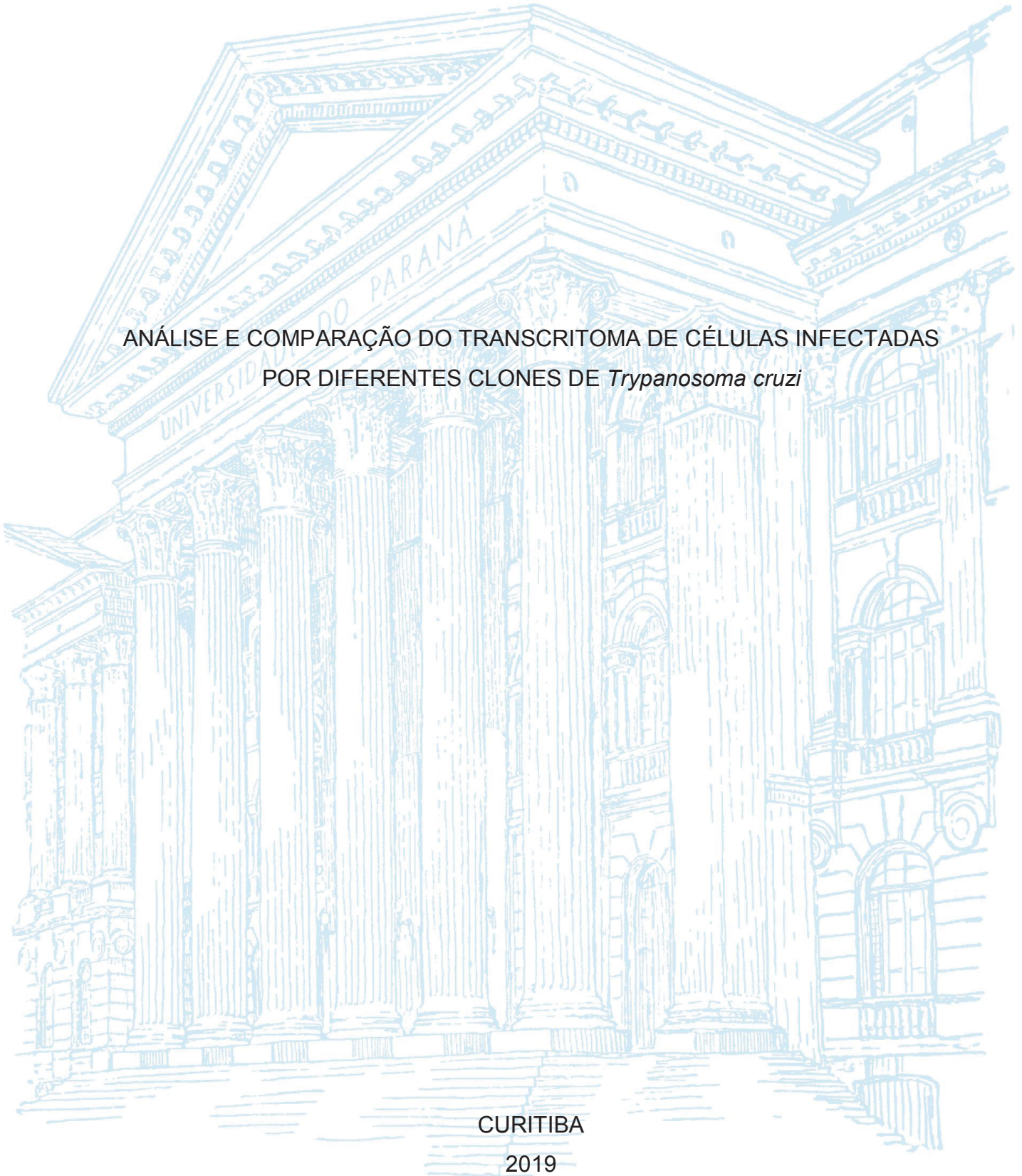
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENZO JONÁS PUNIL LUCIANO

ANÁLISE E COMPARAÇÃO DO TRANSCRITOMA DE CÉLULAS INFECTADAS
POR DIFERENTES CLONES DE *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2019



RENZO JONÁS PUNIL LUCIANO

ANÁLISE E COMPARAÇÃO DO TRANSCRITOMA DE CÉLULAS INFECTADAS
POR DIFERENTES CLONES DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Punil Luciano, Renzo Jonás

Análise e comparação do transcrito de células infectadas por diferentes clones de *Trypanosoma cruzi*. / Renzo Jonás Punil Luciano. – Curitiba, 2019.

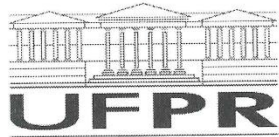
112 p.: il.

Orientadora: Daniela Parada Pavoni

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Células clonais 3. Linhagem celular 4. Genes I. Título II. Pavoni, Daniela Parada III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 614.533



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RENZO JONAS PUNIL LUCIANO** intitulada: **ANÁLISE E COMPARAÇÃO DO TRANSCRITOMA DE CÉLULAS INFECTADAS POR DIFERENTES CLONES DE *Trypanosoma cruzi***, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Março de 2019.

DANIELA PARADA PAVONI
Presidente da Banca Examinadora

WANDERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Externo (UFPR)

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho a minha mãe e irmã,
por serem a minha principal motivação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, paciência e resiliência para enfrentar cada um dos inconvenientes que se apresentam na vida, especialmente nessa etapa de pós-graduação.

À minha mãe, por todo o apoio que sempre me deu, sem importar as circunstâncias, pelas lições aprendidas e por ser minha principal motivação. À minha irmã por me ensinar a nunca me dar por vencido. Ao meu pai por sempre confiar em mim. À minha família toda.

À minha namorada Gloria por sempre estar no meu lado nos momentos de felicidade e me apoiando nos momentos difíceis.

À minha orientadora Dra. Daniela Parada Pavoni, por me dar a oportunidade de desenvolver o projeto, por sua amizade e pelo auxílio no meu processo de adaptação a Curitiba.

À Dra. Saloe Bispo pela disposição e ajuda com a análise dos dados que foi fundamental para esse trabalho.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst por compartilhar seu conhecimento e pelas discussões que alimentaram a minha curiosidade.

Ao Dr. Rafael Kessler e à Luz Helena pelas dicas e apoio na realização do projeto, principalmente das infecções e as imagens de alto conteúdo.

Aos meus amigos Rafael Almeida, Junior Alberti, Vinicius e Eric pela amizade, pelas risadas e por aqueles papos dos almoços.

Ao pessoal do laboratório de biologia molecular pela parceria e por compartilhar bons momentos.

Aos meus amigos peruanos Kim e Daniel pela parceria, risadas e todos os bons momentos.

Aos meus amigos: David, Luis, Juan, Sebastian e Jorge. Muito mais que amigos, meus irmãos.

Ao pessoal do futebol pelo futebol de “alta qualidade” e os churrascos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e CAPES pela bolsa de estudos. Ao Instituto Carlos Chagas pelo apoio financeiro.

Todos contribuíram de diferentes formas para que pudesse realizar esse trabalho da melhor forma possível.

RESUMO

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, constitui um problema de saúde pública na América Latina. Esse parasito tem um ciclo de vida que envolve um vetor invertebrado e um hospedeiro mamífero. Células nucleadas como macrófagos, células musculares lisas e estriadas, fibroblastos e células nervosas podem ser infectados por esse parasito. *T. cruzi* está distribuída em cepas que apresentam genomas, patogênese, virulência, ciclo de transmissão e imunidade diferentes. O processo de infecção de *T. cruzi* nas células hospedeiras é necessário para o estabelecimento do parasito no hospedeiro mamífero, no qual gera diferentes sintomas. Esse processo envolve mudanças estruturais, funcionais e bioquímicas tanto na célula hospedeira, quanto no parasito. O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar as mudanças transcricionais de duas linhagens celulares de espécies diferentes (HeLa e H9c2), em resposta à infecção por dois clones de grupos diferentes (CL Brener e Dm28c). As mudanças da célula hospedeira podem ser detectadas pela mudança no seu transcrito, por meio da tecnologia de RNA-seq. O perfil de transcrição do processo de infecção foi avaliado em dois tempos, 6 e 24 horas pós-infecção (hpi), comparando-os com a célula sem infecção (0 horas). Ao todo, foram detectados 448 genes diferencialmente expressos em HeLa e 1.812 em H9c2. Em ambos tempos avaliados foi observado um padrão de similaridade, quer dizer, os genes modulados e compartilhados em resposta a ambos clones, tanto na célula HeLa, quanto na célula H9c2, foram semelhantes, sendo esses genes, ou regulados positivamente ou negativamente em resposta a ambos clones. Os resultados sugerem que, pelo menos nas primeiras 24 hpi, a modulação do transcrito da célula hospedeira parece ser independente do ciclo intracelular do *T. cruzi* e que pode ser influenciada principalmente pela interação por contato com os parasitos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Clones. Linhagens celulares. Genes diferencialmente expressos. Padrão de similaridade.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is a public health problem in Latin America. This parasite has a life cycle involving an invertebrate vector and a mammalian host. Cells nucleated as macrophages, smooth and striated muscle cells, fibroblasts and nerve cells can be infected by this parasite. *T. cruzi* is distributed in strains that present different genomes, pathogenesis, virulence, transmission cycle and immunity. The infection process of *T. cruzi* in host cells is necessary for the establishment of the parasite in the mammalian host, in which it generates different symptoms. This process involves structural, functional and biochemical changes both in the host cell and in the parasite. The objective of this work was to evaluate and compare the transcriptional changes of two cell lines of different species (HeLa and H9c2) in response to infection by two clones from different groups (CL Brener and Dm28c). Changes in the host cell can be detected by the change in its transcriptome, through the RNA-seq technology. The transcription profile of the infection process were evaluated at two points, 6 and 24 hours post-infection (hpi), comparing them with the uninfected cell (0 hours). In all, 448 genes differentially expressed in HeLa and 1,812 in H9c2 were detected. In both evaluated times a similarity pattern was observed, that is, the genes modulated and shared in response to both clones, both in the HeLa cell and the H9c2 cell, were similar, these genes being either regulated positively or negatively in response to both clones. The results suggest that, for at least the first 24 hpi, host cell transcriptase modulation appears to be independent of the intracellular cycle of *T. cruzi* and can be influenced primarily by parasite contact interaction.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Clones. Cell lines. Differentially expressed genes. Similarity pattern.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DIFERENTES FORMAS DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DOS <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
FIGURA 3. MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE INTERAÇÃO <i>T. cruzi</i> - CÉLULA HOSPEDEIRA.	26
FIGURA 4. MECANISMOS DE INVASÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS SEIS DTUs	34
FIGURA 6. FRAGMENTO DE cDNA COM OS ADAPTADORES	41
FIGURA 7. PROCESSO DE CLUSTERIZAÇÃO.....	42
FIGURA 8. SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE (SBS)	43
FIGURA 9. FLUXO DE TRABALHO DO PREPARO DAS BIBLIOTECAS	53
FIGURA 10. GEL DE AGAROSE DAS EXTRAÇÕES DE DNA	55
FIGURA 11. ELETROFEROGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES.....	57
FIGURA 12. PROCESSO DE INFECÇÃO EM H9c2	62
FIGURA 13. PROCESSO DE INFECÇÃO EM HeLa	63

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. GRÁFICO DE BARRAS DA DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma</i> spp.....	56
GRÁFICO 2. EXEMPLO DO ELETROFEROGRAMA DO RNA TOTAL OBTIDO	66
GRÁFICO 3. EXEMPLO DO ELETROFEROGRAMA DOS FRAGMENTOS DE cDNA.....	68
GRÁFICO 4. EXEMPLO DE ESCORE DE QUALIDADE DE PHRED NO FastQC ...	69
GRÁFICO 5. GRÁFICO DE BARRAS DO NÚMERO DE LEITURAS POR AMOSTRA	70
GRÁFICO 6. LEITURAS MAPEADAS NO PARASITO EM CADA TEMPO	75
GRÁFICO 7. PCA DA CÉLULA HeLa INFECTADA COM CL Brener	77
GRÁFICO 8. PCA DA CÉLULA HeLa INFECTADA COM Dm28c	77
GRÁFICO 9. PCA DA CÉLULA H9c2 INFECTADA COM CL Brener.....	78
GRÁFICO 10. PCA DA CÉLULA H9c2 INFECTADA COM Dm28c.....	78
GRÁFICO 11. MAPA DE CALOR DE HeLa INFECTADA COM CL Brener	79
GRÁFICO 12. MAPA DE CALOR DE HeLa INFECTADA COM Dm28c	79
GRÁFICO 13. MAPA DE CALOR DE H9c2 INFECTADA COM CL Brener.....	80
GRÁFICO 14. MAPA DE CALOR DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c.....	80
GRÁFICO 15. VOLCANO HeLa - CL Brener (0 hpi vs 6 hpi)	83
GRÁFICO 16. VOLCANO HeLa - CL Brener (0 hpi vs 24 hpi)	83
GRÁFICO 17. VOLCANO HeLa - CL Brener (6 hpi vs 24 hpi)	84
GRÁFICO 18. VOLCANO HeLa – Dm28c (0 hpi vs 6 hpi)	84
GRÁFICO 19. VOLCANO HeLa – Dm28c (0 hpi vs 24 hpi)	85
GRÁFICO 20. VOLCANO HeLa – Dm28c (6 hpi vs 24 hpi)	85
GRÁFICO 21. VOLCANO H9c2 - CL Brener (0 hpi vs 6 hpi)	86
GRÁFICO 22. VOLCANO H9c2 - CL Brener (0 hpi vs 24 hpi)	86
GRÁFICO 23. VOLCANO H9c2 - CL Brener (6 hpi vs 24 hpi)	87
GRÁFICO 24. VOLCANO H9c2 – Dm28c (0 hpi vs 6 hpi).....	87
GRÁFICO 25. VOLCANO H9c2 – Dm28c (0 hpi vs 24 hpi).....	88
GRÁFICO 26. VOLCANO H9c2 – Dm28c (6 hpi vs 24 hpi).....	88
GRÁFICO 27. NÚMERO DE GENES COMPARTILHADOS DETECTADOS EM HeLa	91
GRÁFICO 28. NÚMERO DE GENES COMPARTILHADOS DETECTADOS EM H9c2.....	91

GRÁFICO 29. COMPARAÇÃO DE HeLa INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (6 hpi)	92
GRÁFICO 30. COMPARAÇÃO DE HeLa INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (24 hpi)	92
GRÁFICO 31. COMPARAÇÃO DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (6 hpi)	94
GRÁFICO 32. COMPARAÇÃO DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (24 hpi)	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR CANALETA	52
TABELA 2. CICLO DE LIBERAÇÃO E QUANTIDADE DE PARASITOS LIBERADOS	58
TABELA 3. QUANTIDADE DO RNA TOTAL OBTIDO	60
TABELA 4. ANÁLISE DAS IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO	64
TABELA 5. QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA TOTAL OBTIDO DE CADA AMOSTRA.....	65
TABELA 6. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA	67
TABELA 7. NÚMERO E TAMANHOS DAS LEITURAS POR AMOSTRA	71
TABELA 8. MAPEAMENTOS DAS LEITURAS NOS SEUS GENOMAS	73
TABELA 9. NÚMERO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEG)	82
TABELA 10. GENES REGULADOS EM HeLa EM 6 hpi.....	93
TABELA 11. DEG REGULADOS POSITIVAMENTE EM H9c2 COM 6 E 24 hpi	96
TABELA 12. DEG REGULADOS NEGATIVAMENTE EM H9c2 COM 6 E 24 hpi.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Cq	- Ciclo de quantificação
DAPI	- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
Dm	- <i>Didelphis marsupialis</i>
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	- Deoxinucleotídeos
dsDNA	- DNA de dupla fita
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético
EtOH	- Etanol
<i>g</i>	- Aceleração de gravidade
HEPES	- Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
LIT	- <i>Liver Infusion Tryptose</i>
NaCl	- Cloreto de sódio
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PCA	- Análise de Componentes Principais
PCR	- Reação em Cadeia pela Polimerase
rpm	- Revoluções por minuto
rRNA	- RNA ribossomal
SFB	- Soro Fetal Bovino
ssDNA	- DNA de única fita
TAU	- <i>Triatomine Artificial Urine</i>
β -ME	- β -mercaptoetanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	19
2.2 CICLO DE VIDA DOS <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2.3 INTERAÇÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> – CÉLULA HOSPEDEIRA.....	25
2.4 GENOMA E BIOLOGIA MOLECULAR DOS <i>T. cruzi</i>	29
2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DO <i>T. cruzi</i>	32
2.6 TRANSCRITOMA DA CÉLULA HOSPEDEIRA INFECTADA POR <i>T. cruzi</i>	35
2.7 SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA.....	41
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAS E MÉTODOS	45
4.1 CULTIVO CELULAR	45
4.2 CULTIVO DO PARASITO	45
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS CELULARES	46
4.4 DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL	46
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES	47
4.6 METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i>	48
4.7 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DAS CÉLULAS	48
4.8 OBTENÇÃO DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA.....	49
4.9 INFECÇÃO DOS HOSPEDEIROS	49
4.10 IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO DAS CÉLULAS INFECTADAS	50
4.11 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	50
4.12 PREPARO DAS BIBLIOTECAS	51
4.13 ANÁLISES DOS DADOS DE RNA-SEQ	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS CELULARES	55
5.2 DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL	55
5.3 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES	57
5.4 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DAS CÉLULAS	58
5.5 IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO DAS CÉLULAS INFECTADAS	61

5.6 AVALIAÇÃO DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	64
5.7 PREPARO DAS BIBLIOTECAS	66
5.8 ANÁLISE E MAPEAMENTO DOS DADOS DE RNA-SEQ	68
5.9 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS	76
5.10 ANÁLISES DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEG)	81
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
7. CONCLUSÕES	101
8. PERSPECTIVAS	102
REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Trypanosoma cruzi* é um parasito da família Trypanosomatidae que apresenta um único flagelo e um cinetoplasto. Este último é uma porção especializada da mitocôndria que contém uma parte do genoma. Este parasito tem um ciclo de vida complexo que engloba um inseto vetor (invertebrado) e um mamífero (vertebrado), causando a doença de Chagas no homem. Estima-se que aproximadamente 6-7 milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na América Latina com cerca de 25 milhões de pessoas sob risco de transmissão (WHO, 2018a).

Duas drogas são utilizadas no tratamento da doença de Chagas: Benznidazol e Nifurtimox. Ambas as drogas foram desenvolvidas na década de 1970. No Brasil, a única aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é a Benznidazol, que demonstrou uma efetividade de 72 % na fase aguda e 6 % na fase crônica da doença (Guedes *et al.*, 2011). Ambas as drogas desencadeiam efeitos colaterais graves e desagradáveis, além de terem uma administração complicada, motivo pelo qual estão procurando-se alternativas (Tarleton *et al.*, 2007).

Os *T. cruzi* apresentam três formas bem caracterizadas durante seu ciclo de vida: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Tyler e Engman, 2001). Durante o repasto sanguíneo dos insetos vetores realizado no hospedeiro mamífero, tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes. A presença de uma mucosa ou lesão gerada pela picada, permite que os parasitos das fezes possam entrar no organismo. Dentro do organismo, podem infectar diferentes tipos de células nucleadas (Kirchhoff, 2011), mas a primeira infecção, também chamada infecção primária, normalmente acontece nos macrófagos, fibroblastos ou células mesenquimais, para depois alcançar células ou tecidos mais distantes (Monteón *et al.*, 1996).

Uma vez que o parasito, em forma tripomastigota, entra na célula hospedeira, é envolvido num vacúolo parasitóforo. As condições dentro desse vacúolo, como pH baixo, desencadeiam a amastigogênese. O parasito secreta a enzima TcTOX que consegue destruir o vacúolo parasitóforo (Villalta *et al.*, 2008). Já no citoplasma, as formas amastigotas começam sua replicação. Terminada a replicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, desenvolvendo um flagelo que permite uma intensa movimentação, a qual rompe a membrana da célula hospedeira, liberando os parasitos na corrente sanguínea (De Souza *et al.*, 2010).

O processo de interação *T. cruzi*-célula mamífera envolve mudanças estruturais, funcionais e bioquímicas tanto na célula hospedeira, quanto no parasito. As mudanças em ambos organismos envolvem alterações rápidas, como o remodelamento do citoesqueleto (Schenkman *et al.*, 1991) e a liberação transiente de Ca^{2+} (Tardieux *et al.*, 1994). Além das alterações rápidas, observam-se também mudanças em nível transcricional (alterações na expressão gênica).

Várias estratégias podem ser usadas para entender o que está acontecendo no processo de interação *T. cruzi*-célula mamífera e avaliar a alteração da expressão gênica é uma delas. As primeiras técnicas usadas para avaliar a expressão gênica, como *Northern blot* e RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), limitavam-se apenas a alguns genes. Com o desenvolvimento da tecnologia de microarranjos, permitiu-se avaliar as alterações da expressão gênica de milhares de genes em simultâneo (Heller, 2002). Essa tecnologia de alto rendimento forneceu um grande avanço no estudo das alterações gênicas, sendo utilizado por primera vez, no modelo *T. cruzi*-célula mamífera, por De Avalos e colaboradores no ano 2002.

O desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-seq), além de ter um alto rendimento, mostrou uma sensibilidade ímpar, maior precisão e abrangência, quando comparado com os microarranjos. O salto de qualidade que se obteve ao passar da análise da expressão gênica celular mediante microarranjos para a análise mediante RNA-seq é imenso. O sequenciamento de RNA tornou-se a tecnologia predileta para avaliar alterações gênicas no processo de infecção de diferentes patógenos, tanto da célula hospedeira, quanto do parasito (Westermann *et al.*, 2012).

Diferenças foram observadas no processo de infecção de diferentes cepas de *T. cruzi* com distintas linhagens celulares, como o tempo do ciclo de liberação, a quantidade de parasitos liberados entre outros. Isto sugere que há particularidades de cada modelo *T. cruzi*-célula hospedeira. A interação de diferentes cepas de *T. cruzi* com a mesma linhagem celular ou a interação da mesma cepa com diferentes linhagens celulares pode fornecer-nos dados para identificarmos o que é ou não comum a todos os modelos de infecção com *T. cruzi* (Adesse *et al.*, 2010; Costales *et al.*, 2009).

Nosso grupo vem se dedicando a estudar as alterações gênicas em ambos organismos no processo de infecção. No ano 2011, utilizando a tecnologia de microarranjos, Manque e colaboradores avaliaram as modificações transcricionais de

cardiomiócitos infectados com o clone de *T. cruzi* Dm28c, encontrando 353 genes modulados (Manque *et al.*, 2011).

Nesse mesmo ano, Rampazzo, utilizando a tecnologia de RNA-seq, encontrou 572 genes modulados, uma maior quantidade quando comparado com o trabalho do Manque, usando a mesma cepa e linhagem celular (Rampazzo, 2011). Já no ano 2013, Kalb infectou a linhagem celular Vero com duas cepas, Dm28c e Y, detectando uma grande quantidade de genes modulados na célula hospedeira, 1.061, quando infectada com Dm28c e 831, quando infectada com Y (Kalb, 2013)

Neste trabalho, infectamos duas linhagens celulares, HeLa e H9c2, com dois clones, Dm28c e CL Brener, e os analisamos em dois tempos, 6 e 24 horas, com o intuito de analisar e comparar as respostas em cada modelo.

1.1 JUSTIFICATIVA

Trypanosoma cruzi é o agente causal da doença de Chagas, a qual é uma doença tropical negligenciada (WHO, 2018b). Estima-se que no mundo estão infectadas aproximadamente 6-7 milhões de pessoas (WHO, 2018a). *T. cruzi* tem um ciclo de vida que envolve um vetor invertebrado e um hospedeiro mamífero, originando a doença de Chagas quando o hospedeiro é o homem (Chagas, 1909). No Brasil, as principais vias de transmissão são a via vetorial e a via oral, sendo a via vetorial responsável pela grande maioria dos casos registrados antes de ações de combate ao inseto vetor. Na atualidade, a via oral é responsável por 69 % dos casos e a via vetorial, por 9 % (Ministério da Saúde, 2018).

Independentemente da via de transmissão, o parasito invade a célula hospedeira do mamífero, replicando-se no citoplasma. A movimentação dos parasitos gera o rompimento da membrada da célula, liberando os parasitos no meio extracelular. Os *T. cruzi* liberados podem infectar outras células ou ser ingeridos pelo inseto vetor, começando o ciclo novamente (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). A interação do parasito com suas células hospedeiras depende tanto da célula hospedeira, quanto da cepa do parasito (Yoshida e Cortez, 2008). Conhecer e identificar os mecanismos celulares comuns e idiossincráticos de cada interação, que talvez possam se tornar alvos para melhores terapias, é necessário. A tecnologia de sequenciamento em larga escala fornece uma alta sensibilidade, precisão e

abrangência do transcrito das células, permitindo-nos elucidar esses mecanismos do processo de interação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada (WHO, 2018b), que é encontrada principalmente nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2018a). No entanto, na atualidade também representa um problema para países não endêmicos como os Estados Unidos de América, devido às migrações das pessoas infectadas de áreas endêmicas (Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2010). Estima-se que aproximadamente entre 6-7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo todo pelo seu agente causal, a espécie *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2018a).

T. cruzi é um protista da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae que apresenta um único flagelo e um único cinetoplasto, esse último, uma porção especializada da mitocôndria que contém uma parte do genoma. Este hemoparasito tem um ciclo de vida que engloba o inseto vetor (invertebrado) e o mamífero hospedeiro (vertebrado). *T. cruzi* pode causar a doença de Chagas quando o seu hospedeiro mamífero é o homem (Chagas, 1909).

A doença de Chagas é chamada assim por causa de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, o médico brasileiro que identificou e descreveu essa doença em 1909 (Coura e Dias, 2009). Carlos Chagas descreveu as manifestações clínicas da doença e caracterizou o ciclo de vida e o modo de transmissão do parasito (Chagas, 1909), o qual depois foi nomeado *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao mentor de Chagas, Oswaldo Cruz. Apesar de ter sido identificada apenas em 1909, ela é uma doença antiga, pois foi encontrada em múmias humanas do deserto de Atacama, datadas de mais de 9000 anos (Aufderheide *et al.*, 2004).

No Brasil, entre o período de 2007 a 2016, a média anual de casos confirmados de doença de Chagas aguda foi de 200, apresentando-se na maioria dos estados brasileiros. Uma grande maioria (85 %) destes casos foram reportados no estado de Pará. As principais formas de transmissão no Brasil foram: transmissão oral (69 %), transmissão vetorial (9 %) e não identificadas (21 %) (Ministério da Saúde, 2018).

Dentre todas as vias de transmissão da doença de Chagas, a via vetorial foi a principal nas décadas passadas, no Brasil. As mais de 150 espécies de insetos vetores reduvídeos da sub-família Triatominae, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, são capazes de transmitir, mediante as fezes, os parasitos a um hospedeiro mamífero, tais como marsupiais, roedores e primatas, durante o repasto sanguíneo (Coura e Viñas, 2010). Este parasito já era transmitido normalmente entre os insetos e mamíferos silvestres, mas com a chegada do homem à América e o começo das atividades agrícolas, também começou a transmissão vetorial ao homem, pela procura dos insetos por uma nova fonte alimentar, e foi intensificada com a atividade pecuária, sendo a doença de Chagas considerada uma antropozoonose (Coura e Dias, 2009).

No estado da Paraíba em 1986, 20 pessoas ficaram doentes e uma morreu, depois de beber o suco de cana-de-açúcar contaminado (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991). No estado de Santa Catarina, no ano 2005, foi reportado um surto da doença de Chagas também por ingestão de suco de cana-de-açúcar contaminado (Covarrubias *et al.*, 2007). Nas últimas décadas no Brasil, a principal forma de transmissão da doença de Chagas é via oral, principalmente no estado de Pará, onde foram reportados casos de aquisição da doença depois da ingestão de suco de açaí contaminado (Nóbrega *et al.*, 2009). Na Venezuela, também foram reportados casos por ingestão de suco de goiaba (Toso *et al.*, 2011). No Brasil, no período de 2007 a 2016, 69 % dos casos da doença de Chagas foram adquiridos pela via oral (Ministério da Saúde, 2018), por ingestão de insetos vetores com presença de tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas e que podem se aderir à mucosa gástrica, quando ingeridos (Neira *et al.*, 2003).

A transmissão por transfusão sanguínea é uma via que se desenvolve principalmente nos países não endêmicos, como Estados Unidos e Espanha (Sánchez e Ramírez, 2013); mas no Brasil, por ser um país endêmico, a transmissão por transfusão sanguínea é um risco maior. Por conta disso, foi implementado uma triagem do sangue de doadores, o que permitiu eliminar essa via de transmissão no país (Ministério da Saúde, 2015). Além das vias de transmissão já mencionadas, também existe um risco de transmissão congênita (Rassi *et al.*, 2010), por acidentes de laboratório e suspeitas de transmissão sexual (Ribeiro *et al.*, 2016).

Depois da infecção do homem com os *Trypanosoma cruzi*, independentemente da via, começa a etapa aguda da doença de Chagas. Esta etapa

mostra uma alta parasitemia no sangue e é assintomática na maioria das pessoas, mas também pode apresentar sintomas semelhantes aos da gripe, por exemplo: febre, mal-estar geral e inflamação dos gânglios e tecidos. Caso a via de entrada do parasito tenha sido ocular, o paciente pode apresentar o sinal de Romaña, que é um sintoma clássico de infecção (Delaporte, 1997). Nessas 4 a 12 semanas que dura a fase aguda, a maioria dos pacientes consegue resolver espontaneamente os sintomas, mas um grupo reduzido de 2 %, principalmente crianças, não conseguem sobreviver a essa etapa (Machado *et al.*, 2012).

Quando é controlado o nível de parasitos no sangue não há manifestações clínicas, os pacientes entram na forma crônica indeterminada. Porém, ainda apresentam sorologia positiva, na qual podem permanecer por anos, décadas ou pelo resto da vida. Nessa forma, o parasito atinge os tecidos alvos, formando cistos (Coura e Borges-Pereira, 2010). A grande maioria das pessoas (entre 60 a 70 %) permanece nessa forma indeterminada (Rassi *et al.*, 2010).

A forma determinada pode começar logo depois da etapa aguda ou depois de anos com forma crônica indeterminada. Muitos fatores desempenham um papel importante para que uma porcentagem pequena de pessoas infectadas evoluam para a forma crônica determinada, tais como susceptibilidade genética, cepa do parasito, entre outros (Williams-Blangero *et al.*, 2011). As manifestações clínicas mais frequentes são as falhas e inflamação do coração, que ao longo do tempo levam à hipertrofia que ocasiona ritmo cardíaco anormal, insuficiência cardíaca e, eventualmente, parada cardíaca (Rassi *et al.*, 2010). Distúrbios digestivos não são tão comuns, mas também foram reportados nessa fase, principalmente o megaesôfago e megacólon (Bern *et al.*, 2011).

Na atualidade, as únicas drogas disponíveis para tratamento contra a doença de Chagas são o Benznidazol (Roche®) e o Nifurtimox (Bayer®), que foram desenvolvidos na década de 1970. No Brasil, o tratamento contra a doença de Chagas é realizado com o Benznidazol, por ter mostrado menos efeitos secundários e menor toxicidade. O Nifurtimox não tem a autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por ser uma droga muito tóxica. O tratamento com Benznidazol é efetivo na fase aguda, demonstrando uma efetividade de 72 %, mas a efetividade cai até 6 % para os pacientes na fase crônica (Guedes *et al.*, 2011). Mesmo assim, com uma efetividade alta na fase aguda, essa droga desencadeia efeitos colaterais muito

graves e desagradáveis, além de uma administração complicada, e é por isso que se está na procura de uma alternativa, para tratamento (Tarleton *et al.*, 2007).

2.2 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

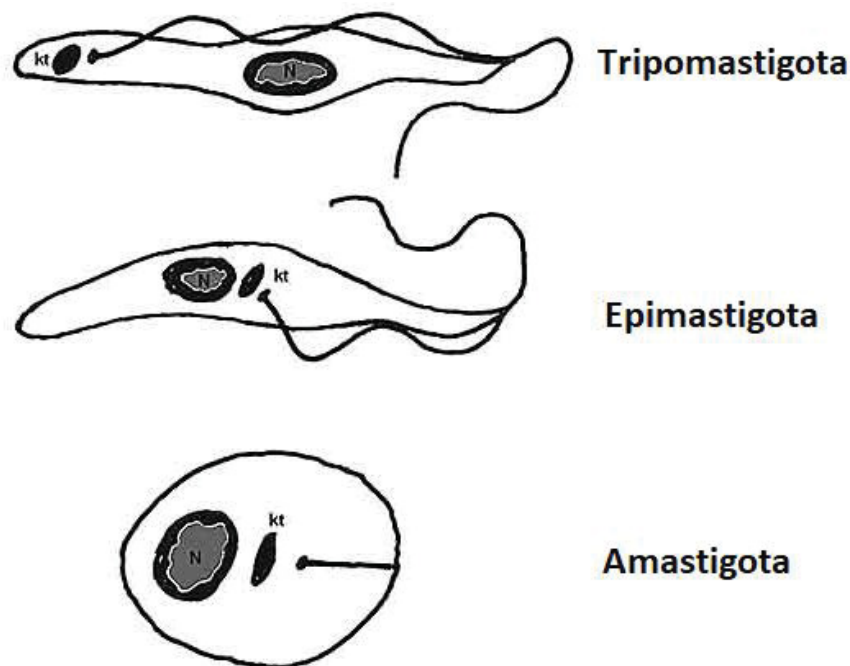
O *T. cruzi*, como vários outros parasitos, tem um ciclo de vida complexo, alternado de forma entre seu inseto vetor invertebrado e seu hospedeiro vertebrado. As três formas deste parasito estão bem caracterizadas e são diferentes tanto morfológicamente, quanto metabolicamente, e são: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Tyler e Engman, 2001). A forma tripomastigota pode ser encontrada como tripomastigota metacíclico ou tripomastigota sanguínea. No inseto vetor, o parasito se apresenta em duas formas, na forma epimastigota ou como tripomastigota metacíclico, enquanto no hospedeiro mamífero, se pode encontrar na forma tripomastigota sanguínea ou na forma amastigota. Uma característica comum entre os membros da família Trypanosomatidae, como os *T. cruzi*, é a presença de uma única mitocôndria grande que contém uma região especializada chamada de cinetoplasto. Esta região produz a energia necessária para a operação do flagelo e pode ser observada como um disco ligeiramente côncavo eletro-denso, na forma epimastigotas, em microscopia eletrônica (De Souza, 2002).

Entre todas as diferenças das 3 principais formas, a morfologia é a que destaca, principalmente pela localização do núcleo e o cinetoplasto. O cinetoplasto das formas epimastigotas mostra forma de bastão e está localizado anteriormente ao núcleo (figura 1). A forma epimastigota possui um corpo alongado com comprimento de 20-40 µm. Esta forma é replicativa e é considerada não infectiva (De Souza, 2002), embora epimastigotas recentemente diferenciadas mostraram ser infectivas, o que pode explicar, em parte, as infecções orais (Kessler *et al.*, 2017).

A forma tripomastigota se caracteriza estruturalmente por ter um núcleo localizado na região central e um cinetoplasto arredondado posicionado na extremidade posterior do parasito. O flagelo inicia no cinetoplasto e contorna o corpo do parasito até a região anterior, onde se torna livre (figura 1). A tripomastigota tem um tamanho aproximado de 25 µm e pode ser encontrada tanto no inseto vetor, quanto no mamífero infectado. Esta forma não é replicativa, mas é infectiva (De Souza, 2002).

Por sua vez, as amastigotas apresentam o cinetoplasto em forma de bastão, localizado anteriormente ao núcleo (figura 1). Possuem um flagelo interno e um corpo arredondado com um comprimento de 3-5 μm (Tyler e Engman, 2001). Esta forma é intracelular e possui a capacidade replicativa, e graças à sua capacidade infectiva, depois de liberada, pode infectar outras células (Tyler e Engman, 2001).

FIGURA 1. DIFERENTES FORMAS DO *Trypanosoma cruzi*

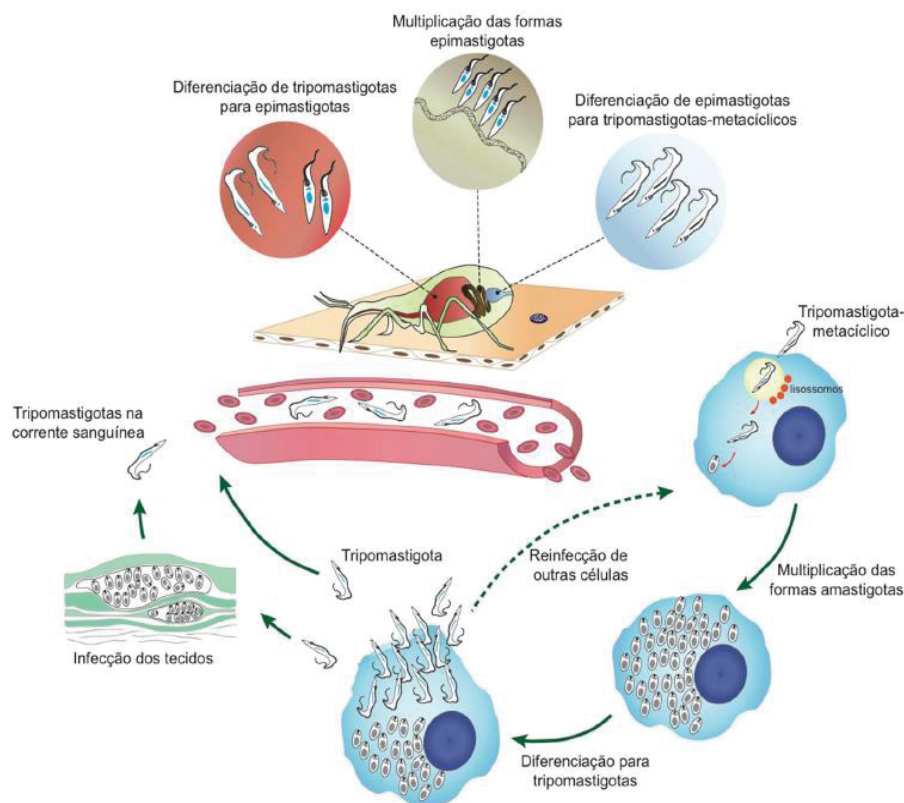


FONTE: Modificado de Rossi *et al.* (2003). LEGENDA: Tripomastigota, cinetoplasto posterior ao núcleo; Epimastigota, cinetoplasto anterior ao núcleo; Amastigota, cinetoplasto anterior ao núcleo. (N, núcleo; kt, cinetoplasto)

Quando o inseto vetor hematófago realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, adquire também os tripomastigotas sanguíneos presentes no sangue, iniciando o ciclo no inseto. A maioria destes tripomastigotas são lisados no tubo digestório do inseto, e os sobreviventes se diferenciam nas formas epimastigotas para depois migrar ao intestino, onde começa uma intensa replicação mediante divisão binária, que acontece no período de 1 dia, depois do repasto sanguíneo. Logo depois, migram para o final do trato digestivo, o intestino posterior, onde se aderem à membrana perimicrovilar para começar o processo de diferenciação a tripomastigotas metacíclicos, processo conhecido como metaciclogênese (revisado por De Souza, 2000), como observado na figura 2.

Os tripomastigotas metacíclicos, formas infectivas, são liberadas nas fezes do parasito durante o respasto sanguineo. A presença de uma mucosa ou uma lesão gerada na pele pela picada, permitem que o parasito das fezes possa atingir a corrente sanguínea, infectando múltiplos tipos celulares nucleados (Kirchhoff, 2011). Dentro da célula infectada, o parasito ainda tripomastigota é envolvido num vacúolo parasitóforo que apresenta pH baixo, o qual permite a diferenciação à forma amastigota. O parasito consegue destruir o vacúolo, graças à ação da enzima TcTOX secretada (Villalta *et al.*, 2008). A forma amastigota, por sua vez, começa a replicação dentro do citoplasma da célula e esse processo dura até o 3º-6º dia dependendo da cepa do parasito e inclusive, da célula hospedeira. Quando a replicação termina, começa o processo de transformação a tripomastigotas sanguíneos, quando desenvolvem um longo flagelo que permite um movimento intenso, o qual gera o rompimento da célula hospedeira, liberando os parasitos à corrente sanguínea. Estes parasitos podem infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto vetor, começando o ciclo novamente (figura 2) (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010).

FIGURA 2. CICLO DE VIDA DOS *Trypanosoma cruzi*



FONTE: Tese doutoral de Bastos (2017).

2.3 INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi* – CÉLULA HOSPEDEIRA

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasito pode invadir, teoricamente, qualquer célula nucleada. A infecção primária, que é a primeira infecção do parasito às células do hospedeiro, normalmente acontece nos macrófagos, fibroblastos ou células mesenquimais (Monteón *et al.*, 1996), para depois alcançar células ou tecidos mais distantes. Esta infecção inicial é importante para o estabelecimento do parasito no seu hospedeiro. Esta interação entre o parasito e a célula hospedeira pode ser dividida em 3 etapas: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). Os estudos de interação são muito variáveis porque depende tanto do tipo da célula hospedeira a ser infectada, quanto da cepa do parasito (Yoshida e Cortez, 2008). Neste processo de infecção, os dois organismos envolvidos sofrem mudanças, gerando uma sinalização celular e alterando sua expressão gênica.

Para começar com o processo de infecção, é preciso, primeiramente, que o parasito reconheça a célula hospedeira, que acontece graças a moléculas expressas na superfície do parasito e na célula hospedeira, como observado na figura 3. Entre as moléculas de superfície mais estudadas do parasito, estão incluídas as mucinas e as trans-sialidases que se encontram ancoradas na membrana mediante resíduos de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

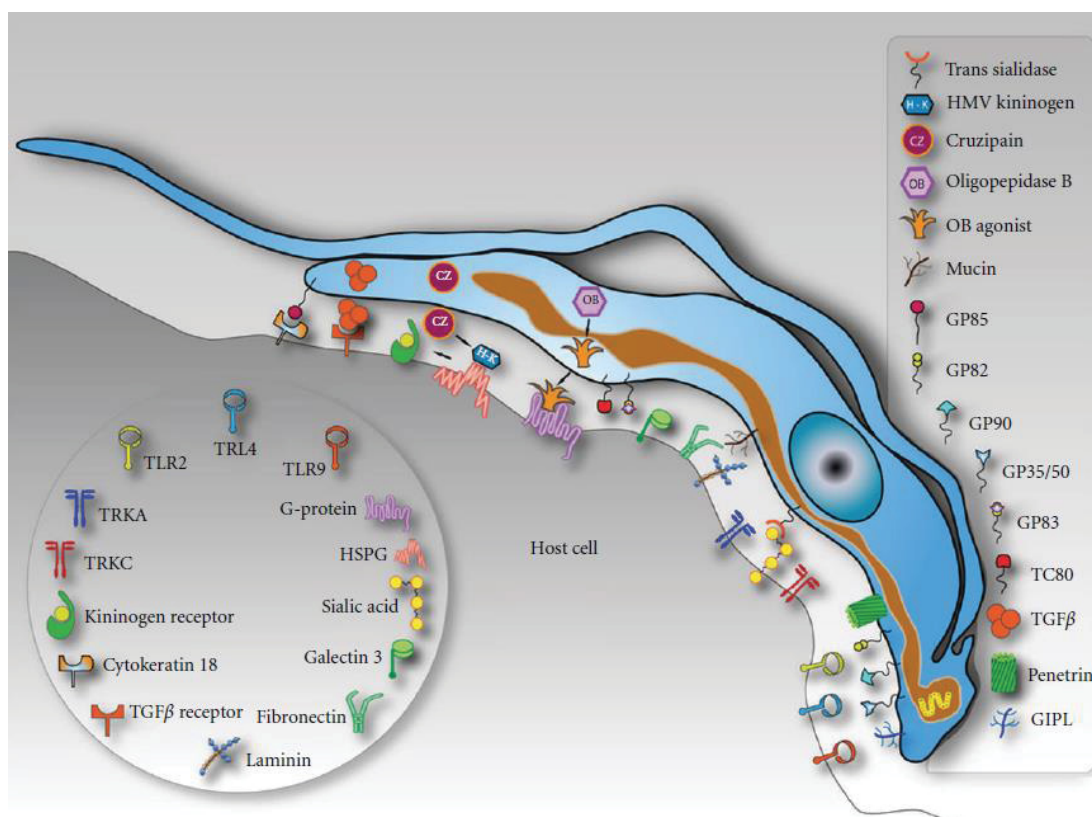
As glicoproteínas mais representativas e em maior quantidade na superfície do parasito são as mucinas, as quais permitem a interação com a célula hospedeira (Villalta e Kierszenbaum, 1984). A parte proteica destas moléculas é rica em treonina, serina e prolina, e está codificada em algumas centenas de genes (DiNoia *et al.*, 1998). Os tripomastigotas metacíclicos que são responsáveis pela infecção primária, apresentam na sua superfície celular mucinas, como gp35/50. Esta mucina é resistente a proteólise (Schenkman e Eichinger, 1993), o que pode favorecer a presença dos parasitos que a possuem no trato digestivo do inseto onde a quantidade de enzimas proteolíticas é abundante. Isso pode explicar também sua presença na forma epimastigota.

Outro grupo representativo de moléculas de superfície envolvidas na interação são as trans-sialidases, enzimas que catalisam a transferência de ácido siálico de sialoglicoconjugados do hospedeiro, para receptores glicoconjugados no parasito, normalmente as mucinas (Schenkman e Eichinger, 1993). Estas moléculas formam parte da superfamília de gp85/trans-sialidases, que também tem como

membro a família Tc85, a qual possui a capacidade de se ligar a diversas moléculas como citoqueratina 18, na célula hospedeira (figura 3) ou fibronectina e laminina na matriz extracelular (Alves e Colli, 2007).

Por sua vez, a trans-sialidase gp82 está presente só no tripomastigota metacíclico, sendo importante para a infecção do hospedeiro. Além do mais, essa glicoproteína participa e provavelmente está implicada na transmissão oral da doença de Chagas, uma vez que pode se aderir à mucosa gástrica e mostra resistência dentro deste ambiente (Neira *et al.*, 2003). A trans-sialidase gp83 é outra molécula presente nos tripomastigotas infectivos de todas as cepas de *T. cruzi*. Essa molécula se liga a moléculas receptoras como p74, permitindo a entrada tanto nas células fagocíticas, quanto nas células não fagocíticas (Villalta *et al.*, 2008). A ligação dessa trans-sialidase aumenta o nível de expressão de laminina γ -1 na célula hospedeira, melhorando a infectividade do parasito (Nde *et al.*, 2006).

FIGURA 3. MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE INTERAÇÃO *T. cruzi* - CÉLULA HOSPEDEIRA.



FONTE: De Souza *et al.* (2010). LEGENDA: GP, glicoproteína; TC, *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase; TGF β , fator de transformação do crescimento beta; GIPL, fosfolípido de glicol inositol; TLR, receptores do tipo Toll; TRK, receptor quinase tropomiosina; HSPG, proteoglicanos de heparan sulfato.

Além das moléculas de superfície que participam no processo de interação, o parasito também apresenta proteases que auxiliam nesse processo de invasão como a cruzipaína, a oligopeptidase B e o Tc80. A cruzipaína é uma enzima que é secretada através da bolsa flagelar do parasito e que age no cininogênio da célula hospedeira, gerando assim bradicinina que irá se ligar aos receptores de bradicinina na membrana do hospedeiro. A oligopeptidase B é uma serina peptidase citosólica de 80 kDa, que é secretada pelo tripomastigota e formada a partir de precursores presentes neste parasito, pela ação de uma peptidase alcalina (Burleigh *et al.*, 1997). Esta oligopeptidase gera agonistas de Ca^{2+} , os quais vão ativar os receptores ligados à proteína G. A Tc80 é uma prolil oligopeptidase que hidrolisa o colágeno humano tipos I e IV, além de hidrolisar a fibronectina, sendo importante para a entrada do parasito na célula e para sua movimentação na matriz extracelular (Grellier *et al.*, 2001).

O processo de reconhecimento não seria possível se a célula hospedeira não apresentasse também moléculas receptoras na sua membrana plasmática. Células pré-tratadas com tripsina, concavalina A ou ricina mostraram uma redução na infecção por *T. cruzi*, demonstrando a participação de proteínas e glicoproteínas nesse processo de reconhecimento (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). Receptores como TLR4 e TLR9 foram reportados por reconhecer *T. cruzi* (Schenkman e Mortara, 1992). Além disso, os glicoconjugados, o colesterol e as integrinas têm um papel importante neste processo de invasão (Barbosa e Meirelles, 1992; Fernández *et al.*, 1993; Barrias *et al.*, 2007). Componentes da matriz extracelular são importantes para esse processo, tais como proteoglicanos de heparan sulfato, fibronectina e laminina (Calvet *et al.*, 2009).

Após a adesão, é gerada uma sinalização intensa de Ca^{2+} , importante para o processo de invasão, que ocorre tanto na célula hospedeira, quanto no parasito (Garzoni *et al.*, 2003). Dentro do parasito que utiliza a gp82, para invadir a célula, ativa-se a proteína tirosina quinase, assim como a fosfolipase C para liberar Ca^{2+} dos reservatórios sensíveis ao inositol trifosfato (IP3). Diferentemente, aqueles que usam a gp35/50 parece que estimulam a adenilil ciclase, liberando Ca^{2+} dos acidocalciosomos (Yoshida, 2006). Dentro da célula hospedeira, a gp82 gera uma sinalização mais intensa de Ca^{2+} que gp35/50, o que poderia explicar sua maior efetividade no processo de invasão (Dorta *et al.*, 1995). Pelo contrário, a transsialidase gp90, presente no tripomastigota metacíclico, não gera uma resposta de Ca^{2+} na célula, regulando negativamente o processo de invasão (RUIZ *et al.*, 1998).

A liberação transiente de Ca^{2+} provoca a invasão do parasito à célula hospedeira. Esta invasão pode ser classificada em 3 tipos: lisossomo-dependente, acúmulo de fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato (PIP3) e reorganização dos filamentos de actina. Independentemente do mecanismo de invasão, o parasito vai se localizar num vacúolo parasitóforo, associado a compartimentos lisossomais (figura 4), ambiente necessário para o desenvolvimento do parasito (Andrade e Andrews, 2005). A invasão dependente de lisossomo é regulada por Ca^{2+} , iniciando o recrutamento dos lisossomos na membrana plasmática, envolvendo o parasito na sua entrada inicial e formando o vacúolo parasitóforo (figura 4). Este tipo representa 20 % de invasão dos parasitos (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010).

Outro mecanismo de invasão é promovido pela ativação de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) classe I, que fosforila a fosfatidilinositol (4,5) -bifosfato (PIP2), originando a PIP3, a qual se acumula na membrana plasmática, permitindo a internalização do parasito (figura 4) (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). Pela internalização por essa via, 50 % dos parasitos se localizam num vacúolo enriquecido de marcadores de membrana plasmática e 20 % em endossomas iniciais, caracterizados pelos marcadores EEA1 e Rab5, num tempo aproximado de 10 minutos (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). Estes vacúolos são fusionados com lisossomos no período de 60 minutos (BURLEIGH, 2005)

A reorganização do citoesqueleto de actina é alcançada após um aumento transitório de Ca^{2+} na célula (Low *et al.*, 1992) e esta via pode ser observada em células fagocíticas, como macrófagos. A via dependente de actina ocorre também na formação de endossomos, embora seja mais conhecido a formação de pseudópodes, processo associado com o mecanismo de fagocitose.

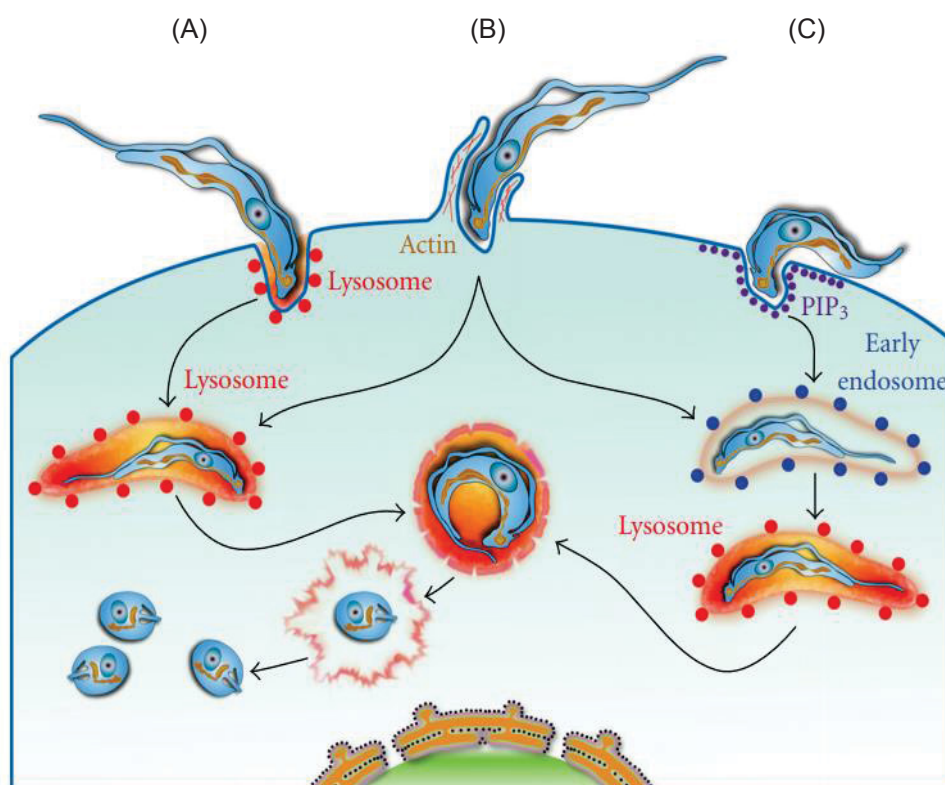
Já dentro do vacúolo parasitóforo, o pH ácido desse compartimento favorece o início da amastigogênese, e o parasito começa a secretar trans-sialidase/neuramidase que junto com o pH ácido, tornam o vacúolo parasitóforo mais sensível à ação da TcTOX secretada pelo parasito (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010). A amastigogênese é completada no citoplasma, para começar o processo de replicação (Mott e Burleigh, 2008). Logo depois, as amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, ganhando um flagelo e a capacidade de se movimentar. Essa movimentação intensa de todas as tripomastigotas juntas consegue romper a célula liberando os parasitos (Andrade e Andrews, 2005).

2.4 GENOMA E BIOLOGIA MOLECULAR DOS *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi é um parasito muito particular, e o seu genoma não é diferente. Desde o início dos estudos, foi difícil determinar o número de cromossomas deste parasito, por conta da não condensação dos cromossomas na divisão celular, portanto os métodos convencionais não podiam ser usados. Ainda assim, tentou-se estimar o número de cromossomos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), técnica usada para separar grandes fragmentos de DNA, como por exemplo, cromossomos. Com essa técnica estimou-se um número de 64 cromossomos para o clone CL Brener (Cano *et al.*, 1995).

A cromatina também apresenta uma distribuição diferenciada, dependendo da forma do parasito. Epimastigotas e amastigotas, formas replicativas, apresentam heterocromatina na região perinuclear e um grande nucléolo. Tripomastigotas, formas infectivas, reduzem a atividade de transcrição das RNA polimerase I e II, desmontando o nucléolo e espalhando a heterocromatina pelo espaço nuclear (ELIAS *et al*, 2001).

FIGURA 4. MECANISMOS DE INVASÃO DE *Trypanosoma cruzi*



FONTE: De Souza *et al.* (2010). LEGENDA: (A) Via lisossomo-dependente. (B) Via reorganização do citoesqueleto de actina. (C) Via acumulação de PIP3 (*Actin*, actina; *Lysosome*, lisossomo; *Early endosome*, endossomo precoce).

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, no ano 2005, foi publicado o genoma de *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005a), *Trypanosoma brucei* (Berriman *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005). Nesse mesmo ano, também foi publicado um estudo comparativo entre estes três organismos conhecidos como *Trityps*. Segundo estes estudos, *T. cruzi* apresenta no genoma haploide 60 Mb contendo 12.000 genes, dentro dos quais 6.200 genes são compartilhados entre os *Trityps* (El-Sayed *et al.*, 2005b). Mais de 50 % do genoma de *T. cruzi* é representado por sequências repetitivas como retrotransposons e famílias multigênicas (El-Sayed *et al.*, 2005a).

Foi no ano 2009, quando se conseguiu melhorar a anotação do genoma de *T. cruzi*, estimando-se 41 pares de cromossomos como um tamanho de 78 Kb a 2,4 Mb (Weatherly *et al.*, 2009). Atualmente, na base de dados do NCBI encontram-se 28 genomas sequenciados de diferentes cepas e/ou clones com diferentes tecnologias de sequenciamento. Dentre estes genomas sequenciados, apenas o genoma do clone Dm28c, sequenciado pelo grupo do Instituto Carlos Chagas (ICC), possui o genoma mitocondrial sequenciado, apresentando um tamanho aproximado de 50 kb. O sequenciamento dos maxicírculos da mitocôndria foi conseguido graças à tecnologia PacBio, que produz leituras longas, solucionando o problema das sequências repetitivas (dados não publicados).

T. cruzi expressa seus genes de um jeito particular pois, apesar de ser um organismo eucarionte, a sua transcrição é policistrônica. Entretanto, diferentemente dos operons bacterianos, os policistrons são notavelmente maiores, apresentando neles dezenas ou até centenas de genes que não têm uma associação funcional entre eles (Kramer, 2012). Uma característica interessante deste organismo eucarioto é a ausência de íntrons nos seus genes, com exceção de 2 deles, o gene da poli-A polimerase (Mair, 2000) e o gene do RNA de transferência da tirosina (Tan, 2002).

A transcrição policistrônica, na qual os genes do mesmo policistron são transcritos na mesma taxa, a ausência de promotores canônicos para a RNA polimerase II (Gomez *et al.*, 2010), a exceção do promotor do gene do minixon (Campbell *et al.*, 2003), e a presença de diferentes quantidades das proteínas de genes de um mesmo policistron evidenciam a regulação pós-transcricional para produzir uma expressão diferencial dos genes (Ávila *et al.*, 2003). O parasito tem estratégias para regular esse nível de expressão, por exemplo, certos genes altamente expressos, são localizados no genoma em forma de repetições em tandem (Iantorno, 2017).

Embora não se tenha evidência de promotores para RNA polimerase, a regulação com modificações na cromatina está presente. O início e final das unidades policistrônicas são marcadas por histonas modificadas ou variantes de histonas (Duhagon *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2009). Outro mecanismo de regulação envolve as regiões transcritas não traduzidas (UTR) que apresentam elementos que podem ser compartilhados com outro grupo de RNAs. As proteínas de união a RNA (RBPs) se ligam a estes elementos, regulando grupos de RNA (Clayton, 2013) que podem estar relacionados, funcionalmente (Keene, 2007). Os RNAs mensageiros também são regulados mediante sua localização; na forma epimastigotas, RNAs de genes que não são necessários não se processam adequadamente e, portanto, não são exportados ao citoplasma, acumulando-se no núcleo e evitando a sua tradução. Por outro lado, RNAs de genes que são necessários são processados corretamente e exportados ao citoplasma para sua tradução (Pastro *et al.*, 2017).

Além do genoma nuclear, *T. cruzi* apresenta, como todos os membros da ordem Kinetoplastida, uma única grande mitocôndria com uma região especializada, o cinetoplasto. Dentro do cinetoplasto, encontra-se o DNA mitocondrial (kDNA) representando aproximadamente 20 % do DNA total do parasito (Simpson, 1973), formado por uma rede complexa de maxicírculos e minicírculos de DNA. Neste kDNA se encontram aproximadamente 50 maxicírculos, com um tamanho médio de 25 kb e uns 10.000 – 20.000 minicírculos com um tamanho médio de 1 kb. Os maxicírculos codificam RNA ribossomal multicistrônico e precursores de mRNA de proteínas mitocondriais, que logo depois serão editados por RNAs guias (gRNA) codificados nos minicírculos. Esta edição consiste na inserção/deleção de resíduos de uridina na cadeia de RNA (Aphasizhev e Aphasizheva, 2011).

Ao contrário da transcrição nesse parasito, a tradução é monocistrônica. Portanto, o RNA policistrônico precisa ser processado, tanto para sua tradução, quanto para sua exportação ao citoplasma. Esse processo consta da adição de uma sequência, bem conservada, na região terminal 5' chamada de miniéxon ou *splicing leader* (SL) (Parsons *et al.*, 1984). A sequência de DNA codificadora do miniéxon, diferentemente de outras sequências, possui uma região promotora para a RNA polimerase II. O miniéxon é uma sequência de RNA de mais de 100 pb, porém apenas 39 pb são incorporados no RNA (Agabian, 1990), levando com ele, na região 5', um cap modificado chamado de "cap 4". O cap possui modificações nos 4 primeiros nucleotídeos após a 7-metilguanossina (Perry *et al.*, 1987).

Para ligar o miniéxon ao RNA não maduro, acontece um processo chamado de *trans-splicing*, que contrariamente ao *cis-splicing* que une 2 éxons do mesmo transcrito, o *trans-splicing* une o RNA do miniéxon a uma outra fita de RNA, não madura (Sutton e Boothroyd, 1986). Além do *trans-splicing*, também é preciso como na maioria de eucariotos, a adição da cauda poli-A. Esa adição ocorre numa sequência consenso para cada sequência transcrita de genes diferentes, formada pelo dinucleotídeo AG e uma sequência de polipirimidinas (Hummel *et al.*, 2000). Logo a poliadenilação é similar com outros eucariotos, com a diferença de que não há uma sequência sinal. Porém, foi observado que o sítio de adição do miniéxon também influencia a região de poliadenilação (Schürch *et al.*, 1994), sendo a adição do miniéxon e da cauda poli-A, um processo coordenado para cada sequência transcrita de um mesmo gene, dentro do policístron.

2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DO *T. cruzi*

As diferentes cepas de *T. cruzi* constituem um grupo com uma grande heterogeneidade, a qual dificulta a sua classificação. Mesmo que sua reprodução seja clonal, há evidências de processos de hibridização. As diferentes cepas desse parasito têm características particulares como morfologia, crescimento, distribuição, epidemiologia, resposta a drogas, etc. (De Lana e De Menezes Machado, 2010). Com o intuito de melhorar o entendimento da biologia do parasito e padronizar a comunicação entre os pesquisadores, as diferentes cepas foram classificadas em 6 unidades discretas de tipagem (*Discrete Typing Units* - DTUs), DTU I a DTU VI (Zingales *et al.*, 2009). O último grupo conhecido foi o TcBat, isolado de morcegos, que foi adicionado como DTU VII (Marcili *et al.*, 2009). Cada DTU é um conjunto de isolados que podem ser agrupados e identificados por marcadores moleculares e imunológicos (Tibayrenc, 1998).

Na antiga classificação, os parasitas eram divididos em duas grandes linhagens, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, e a segunda linhagem era dividida, por sua vez, nas linhagens TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId e TcIIe (Brisse *et al.*, 2000). As DTU I e DTU II correspondem aos grupos TcI e TcIIb, respectivamente, e são consideradas as linhagens antigas puras (Zingales *et al.*, 2012).

Uma proposta menciona que as linhagens antigas depois de um processo de hibridização deram origem a um híbrido heterozigótico, que depois de um processo

de mutação e homogeneização do seu genoma, deu origem aos grupos TcIIc e TcIIa (DTU III e DTU IV, respectivamente). O segundo processo de hibridização aconteceu entre os grupos TcIIb e TcIIc, o qual gerou os híbridos TcIIId e TcIIe (DTU V e DTU VI, respectivamente) (Westenberger *et al.*, 2005). A outra proposta sugere 3 linhagens antigas; DTU I, DTU II e DTU III, e dois eventos de hibridização. Propõe-se que os 2 eventos de hibridização envolvam as linhagens DTU II e DTU III, produzindo a DTU V e a DTU VI (Freitas *et al.*, 2006).

As diferentes DTU também se diferenciam, entre elas, por sua distribuição geográfica. A DTU mais amplamente distribuída é a DTU I, predominando nas regiões norte de América do Sul e estendendo-se pela América Central, regiões onde predomina o ciclo doméstico dessa DTU (figura 5). Esse grupo é o mais encontrado em quase todos os gêneros de vetores triatomíneos e em mais de 50 gêneros de mamíferos (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). A DTU I está associada a casos de cardiomiopatia crônica (Ramírez *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2014). Ratos e cães infectados com a DTU I desenvolveram cardiomiopatia e fibrose cardíaca, respectivamente. Essas afecções foram, consideravelmente, menos severas nos animais infectados com que a DTU II (Camargos *et al.*, 2000; Duz *et al.*, 2014). As cepas Sylvio X-10, Dm28 e G, cepas muito usadas nas pesquisas de *T. cruzi*, formam parte dessa DTU.

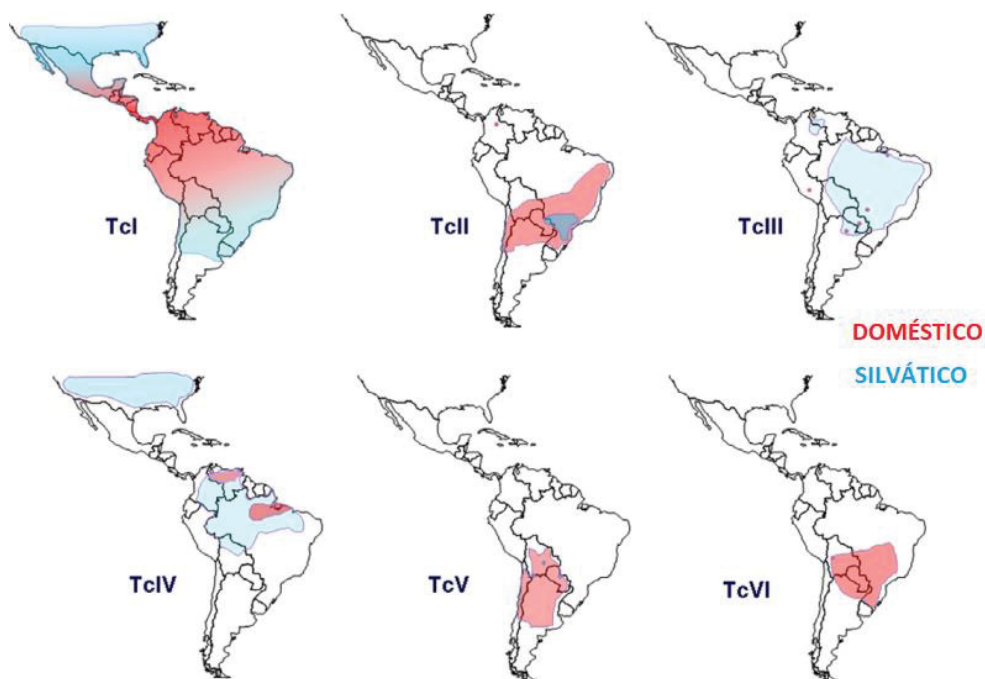
A DTU II, distribuída na região do cone sul de América do Sul, é raramente encontrada no ciclo silvático (figura 5). Tatu-peba e primatas da mata atlântica foram reportados como hospedeiros dessa DTU. A sub-família de insetos, Triatominae, foi reportado como vetor para esse grupo. Esse grupo está associado a cardiomiopatias e a megasíndromes como megacólon e megaesôfago (Zingales *et al.*, 2012). As síndromes gastrointestinais parecem se apresentar nos organismos infectados por essa DTU, numa taxa mais alta (Higo *et al.*, 2004). Cepas representativas desse grupo são Esmeraldo e Y.

A DTU III é um grupo encontrado, quase em sua totalidade, no ciclo silvático, apresentando-se em países como Venezuela, Brasil, Bolívia, Paraguai e no Chaco Argentino (MARCILLI *et al.*, 2009b). As manifestações clínicas são pobremente conhecidas e o principal hospedeiro é o Tatu-galinha (Llewellyn *et al.*, 2009). O nicho desse grupo é terrestre, tendo sido encontrado no inseto vetor *Panstrongylus geniculatus* (Zingales *et al.*, 2012).

A DTU IV está presente na América do Norte e na América do Sul, encontrando-se tanto no ciclo silvático, quando doméstico (figura 5). Na Venezuela, foi a segunda DTU em causar a doença de Chagas (Miles *et al.*, 1981). A presença desse grupo na América do Norte é predominantemente no ciclo silvático. Este grupo tem um nicho arbóreo, mas pode ser encontrado em hospedeiros terrestres na América do Norte. Hospedeiros como primatas e quati, junto com vetores, tais como: *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*, são parte do ciclo desse grupo (Zingales *et al.*, 2012).

As DTUs V e VI apresentam características semelhantes, sendo raras no ciclo silvático e distribuídas no cone sul da América do Sul e no Chaco Argentino. Adicionalmente, a DTU VI é encontrada na região sul do Brasil (Zingales *et al.*, 2012). Uma das principais manifestações clínicas, tanto nesses grupos, quanto nos DTU I e DTU II, é a cardiopatía. Esses 4 grupos últimos grupos são os principais responsáveis pela doença de Chagas. As megasíndromes digestivas crônicas são associadas principalmente às DTUs II, V e VI (Zingales *et al.*, 2012). Cepas representativas desse grupo são Tulahuen e CL.

FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS SEIS DTUs



FONTE: Modificado de Zingales *et al.* (2012). LEGENDA: Distribuição geográfica das DTU segundo seu ciclo, doméstico ou silvático.

No presente estudo, foram usados os clones Dm28c e CL Brener para avaliar a resposta que provocam em duas linhagens celulares, HeLa e H9c2. Essa resposta está relacionada com o clone usado para cada infecção; em vista disso, é importante conhecer as características de cada um deles. No Instituto Carlos Chagas, o clone Dm28c é o modelo mais utilizado para suas pesquisas como caracterização de proteínas, regulação da expressão gênica ou estudos de genômica funcional em *Trypanosoma cruzi*. O clone Dm28c provém da cepa Dm28 pertencente à DTU I e foi isolado de *Didelphis marsupialis*, mais conhecido como gambá-comum. A escolha desse clone como modelo nas pesquisas, deve-se à disponibilidade de meios de cultivo e de metacicloênese quimicamente definidos, nos quais esse clone responde de maneira ótima (Contreras *et al.*, 1988). O grupo do instituto sequenciou o genoma desse clone com a tecnologia de PacBio, e conseguiu uma grande cobertura de 150x, além de obter a sequência do DNA mitocondrial. O número de *contigs* foi de 1030 e o genoma apresenta uma longitude de aproximadamente 51 Mb (NCBI, 2018).

O clone CL Brener é derivado da cepa CL, pertencente à DTU VI, e foi isolado de *Triatoma infestans*. O primeiro genoma a ser sequenciado de *Trypanosoma cruzi* foi do clone CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005a) e atualmente é o único genoma, desse clone, disponível no NCBI. O tamanho do genoma total do clone CL Brener é aproximadamente 90 Mb e o genoma haploide tem 55 Mb (El-Sayed *et al.*, 2005a). A importância desse clone consiste em que foi isolado de um vetor doméstico (Brener e Chiari, 1963) e pertence a uma DTU que é encontrada, principalmente, no ciclo doméstico. Além disso, este clone demonstrou ser virulento para camundongos (Cardoso e Brener, 1980) e ter um parasitismo preferencial por células cardíacas e musculares (Melo e Brener, 1978).

2.6 TRANSCRITOMA DA CÉLULA HOSPEDEIRA INFECTADA POR *T. cruzi*

T. cruzi tem a capacidade de infectar uma ampla gama de diferentes tipos de células mamíferas. Durante esse processo de infecção, ocorre uma série de mudanças tanto na célula hospedeira, quanto no parasito. Essas mudanças na célula hospedeira envolvem alterações rápidas, como o remodelamento do citoesqueleto (Schenkman *et al.*, 1991) e a liberação transiente de Ca^{2+} (Tardieux *et al.*, 1994). Além dessas alterações rápidas e iniciais, observam-se mudanças em nível transcricional (alterações na expressão gênica).

Uma das estratégias para entender o que está acontecendo no processo de infecção na célula hospedeira, é a avaliação das alterações na expressão gênica. O *Northern blot* foi uma das primeiras técnicas a ser usada para medir essa alteração, na célula hospedeira. Usando essa técnica, demonstrou-se a regulação da expressão de interleucinas (IL), como IL-10, em baço de camundongos; e IL-1 β , IL-6 e o fator estimulante de colônia CSF1, em células endoteliais humanas (Silva *et al.*, 1992; Tanowitz *et al.*, 1992).

Com o desenvolvimento da RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), continuaram as pesquisas para avaliar essas alterações. Entre os principais trabalhos com essa técnica, está o estudo do nível de expressão gênica das citocinas em células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados, encontrando um incremento nos níveis de expressão de IL-5, IL-10, IL-13 e interferon-gama (IFN- γ) (Dutra *et al.*, 1997). Outros trabalhos encontraram que as interleucinas IL-12 e IL-18 apresentam modulação gênica em células do baço de camundongos (Meyer Zum Büschenfelde *et al.*, 1997), assim como a actina, em células de músculo cardíaco infectadas (Pereira *et al.*, 2000).

As tecnologias mencionadas foram utilizadas para avaliar a modulação da expressão gênica apenas de poucos genes, mas com o desenvolvimento da tecnologia de microarranjos, permitiu-se avaliar as alterações na expressão gênica de milhares de genes, em simultâneo (Heller, 2002). O microarranjo foi a primeira tecnologia de alto rendimento, motivo pelo qual, se tornou o mais usado para avaliar mudanças transcricionais nos processos de interação hospedeiro-patógeno em diversos organismos (Diehn e Relman, 2001). No processo de interação *T. cruzi*-hospedeiro não foi diferente.

Em 2002, De Avalos e colaboradores usaram pela primeira vez, a tecnologia de microarranjos para avaliar a resposta de fibroblastos humanos infectados com a cepa Y. Entre 2 e 6 horas pós-infecção (hpi), não detectaram genes induzidos, e apenas 6 genes foram reprimidos. Já com 24 hpi, o número de genes que aumentaram a expressão foi de 106 e o conjunto de genes estimulados por interferon (IFN) foi o mais representativo, atingindo o 35 % dos genes estimulados. Suportando esses dados, os fibroblastos infectados com *T. cruzi* começam a produzir IFN- β com 18 hpi. Segundo essa pesquisa, as mudanças transcricionais geradas por *T. cruzi* são poucas no começo da infecção, comparado com outros patógenos intracelulares (De Avalos *et al.*, 2002).

Após o uso de microarranjos no processo de infecção em cultivos *in vitro*, o seguinte passo foi avaliar essa modulação na expressão gênica *in vivo*. No ano 2003, foram publicados dois trabalhos, nos quais foi avaliada a regulação da expressão gênica em camundongos. O primeiro estudo usou a cepa Sylvio (DTU I) para infectar os camundongos e avaliou-se a modulação gênica no miocárdio nos pontos, 3, 37 e 110 dias pós-infecção (dpi). No 3° dpi, os transcritos regulados positivamente indicavam uma resposta imune pró-inflamatória e induzida por interferon (IFN- γ). No 37° dpi, a resposta principal foi a sobre-expressão de transcritos para proteínas da matriz extracelular e no dia 110 °, foi observada a modulação de 66 genes, dos quais a maioria deles estavam reprimidos, como os genes que codificam os componentes das vias de fosforilação oxidativa (Garg *et al.*, 2003).

No seguinte estudo, os camundongos foram infectados com a cepa Brazil (DTU I). Foi avaliada a regulação da expressão no coração do camundongo no dia 100, no qual foi detectado um grande número de genes modulados: 455 genes regulados positivamente e 575, negativamente. Dentre os genes modulados foram encontrados genes de fatores de transcrição, junção, adesão, componentes da matriz, enzimas, apoptose, entre outros (Mukherjee *et al.*, 2003). No ano seguinte, um estudo demonstrou a repressão de genes envolvidos na apoptose, em fibroblastos murinos (Moore-Lai e Rowland, 2004).

O primeiro trabalho com microarranjos em humanos, foi feito em 2005. Foi avaliado o coração de pessoas com cardiomiopatia chagásica humana, submetidas a transplante cardíaco e o coração de doadores, que não foi usado para transplante devido a incompatibilidade de tamanho com os receptores disponíveis. O número de genes induzidos foi de 582 e de genes reprimidos, 465. Foi observada uma regulação positiva nos genes da resposta imune, metabolismo lipídico e da fosforilação oxidativa mitocondrial sendo que 15 % desses genes regulados positivamente são induzidos pelo IFN- γ . Os resultados desse estudo sugerem que as vias de sinalização de quimiocinas e IFN- γ podem regular diretamente a expressão de genes envolvidos na hipertrofia nos cardiomiócitos (Cunha-Neto *et al.*, 2005).

Em outro estudo, a célula HeLa foi infectada com a cepa Tulahuen (DTU VI), e 3 dpi foi avaliada a modulação na sua expressão gênica. Os genes induzidos em mais de três vezes foram 41 e os reprimidos em mais de três vezes foram 23. Vários dos genes que foram regulados estão relacionados com a proliferação celular, 7 genes induzidos codificam inibidores da proliferação e 3 genes reprimidos codificam

promotores da proliferação. Isto sugere que o parasito inibe a proliferação celular acarretando em mais tempo para sua replicação (Shigihara *et al.*, 2008).

Um estudo no ano 2009 comparou as mudanças transcricionais em três diferentes células: fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas. As células foram infectadas com a cepa Y (DTU II) e as alterações transcricionais foram avaliadas 24 hpi. O número de genes modulados reportado foi grande, sendo 2.852, 2.155 e 531 para fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas, respectivamente. Uma grande resposta de interferon tipo I foi observado nos 3 tipos celulares. Além disso, outras respostas em comum encontradas foram a indução de vias metabólicas e sinalização e catabolismo de aminoácidos. Uma resposta em comum nessas células e que concorda com os resultados obtidos por Shigihara (2008) é o bloqueio do ciclo celular, ao nível da citocinese (Costales *et al.*, 2009).

Em outro estudo, Adesse e colaboradores infectaram células de mioblasto de rato com 4 cepas diferentes de *T. cruzi*: Brazil (DTU I), Y (DTU II), CL (DTU VI) e Tulahuen (DTU VI). A alteração da expressão gênica foi avaliada 72 hpi. Nesta, observou-se uma modulação de 6.289 genes em total para as 4 cepas; dentre estas, a cepa Tulahuen gerou a maior resposta na célula hospedeira, com 17 % dos genes diferencialmente expressos e a cepa Y gerou a menor resposta, com 6 % dos genes diferencialmente expressos sendo que apenas 21 genes foram regulados de forma similar com as 4 cepas (Adesse *et al.*, 2010).

Nosso grupo vem trabalhando nessa linha de pesquisa e também começou a usar os microarranjos para avaliar as alterações no hospedeiro. Nesse trabalho, foram infectados cardiomiócitos com o clone Dm28c e foi avaliado o mRNA nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24, e 48 hpi. Em total, 353 genes foram modulados ao longo do processo de infecção, sendo 111 induzidos e 242 reprimidos. Genes relacionados à resposta imune, inflamação, organização do citoesqueleto, interações célula-célula célula-matriz, apoptose, ciclo celular, estresse oxidativo, entre outros, foram regulados nesse processo de infecção (Manque *et al.*, 2011).

A tecnologia de microarranjos contribuiu muito para elucidar os genes e as vias envolvidas no processo de infecção, contudo, essa tecnologia tinha limitações técnicas. Apesar de providenciar um perfil da expressão gênica das células infectadas, esse perfil não era completo, pois as sondas eram construídas a partir de genes conhecidos, perdendo o perfil de expressão gênica de genes não conhecidos. Além disso, os microarranjos só podem medir a expressão gênica em uma faixa

determinada, devido aos ruídos e à saturação na medição das cores (WANG *et al.*, 2009). Com o lançamento no mercado das tecnologias de sequenciamento de nova geração e com o barateamento dos custos de sequenciamento, essa nova tecnologia passou a ser a técnica mais usada para avaliar a expressão gênica.

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) é uma técnica de sequenciamento de nova geração que nos permite dar uma olhada profunda no transcrito, permitindo detectar genes e transcritos novos (Mutz *et al.*, 2013). Essa tecnologia de alto rendimento tem grandes vantagens quando comparada com os microarranjos; vantagens como alta sensibilidade, precisão e abrangência, os quais tornaram-na a tecnologia predileta para os estudos de expressão gênica, tanto do hospedeiro, quanto do patógeno (Westermann *et al.*, 2012).

Nosso grupo desenvolveu um dos primeiros trabalhos de avaliação da expressão gênica no processo de infecção de *T. cruzi*. A plataforma de sequenciamento usada foi o SOLiD da *Applied Biosystems*. Cardiomiócitos foram infectados com o clone Dm28c e foi detectada uma quantidade total de 572 genes modulados ao longo do processo de infecção, dos quais 371 eram regulados positivamente e 201, negativamente. A célula hospedeira e o clone foram os mesmos usados por Manque (2011) com os microarranjos, mas neste caso foi encontrado uma maior quantidade de genes regulados. Genes associados a resposta imune, citoesqueleto, metabolismo mitocondrial, apoptose, matriz extracelular e apoptose foram modulados nesse processo de infecção (Rampazzo, 2011).

No ano de 2013, nosso grupo realizou um estudo infectando células Vero com o clone Dm28c e com a cepa Y, usando o equipamento SOLiD. A célula infectada com Dm28c modulou 1.061 genes e a infectada com Y, 831 genes. Os genes regulados positivamente estão associados à resposta imune, como quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias, e ao metabolismo, como a β -oxidação dos ácidos graxos. Pelo contrário, os genes que foram regulados negativamente estão relacionados ao ciclo celular (Kalb, 2013).

O primeiro trabalho publicado usando a tecnologia de sequenciamento RNA-seq foi em 2016. Nesse trabalho, foram infectados fibroblastos humanos com a cepa Y e a plataforma usada para o sequenciamento foi Illumina HiSeq 1000. Nas primeiras 4 hpi encontraram 441 genes modulados, um grande número se comparado com outros trabalhos nos tempos precoces. As principais vias reguladas nos tempos precoces são a progressão do ciclo celular, que é reprimida, e a resposta imune, que

é ativada. Também foi observado que a infecção por *T. cruzi* leva as células hospedeiras até a fase S nas primeiras 24 horas, com um bloqueio subsequente na citocinese da célula hospedeira (Li *et al.*, 2016).

Nesse mesmo ano, foi publicado outro estudo comparando o perfil de expressão gênica dos fibroblastos infectados com a cepa Y e a cepa Sylvio, pelo mesmo grupo. Nesse estudo, foram avaliados 3 tempos: 4, 24 e 72 hpi. No tempo precoce de 4 hpi, no fibroblasto infectado com a cepa Sylvio, não foi observada uma resposta significativa; em contraste com os 441 genes diferencialmente expressos (DE) detectados no fibroblasto infectado com a cepa Y. Isto pode sugerir que a infecção com a cepa Sylvio é mais silenciosa nos tempos precoces. Não houve diferença na modulação gênica entre os fibroblastos infectados com a cepa Sylvio e Y. Em ambos os casos, foi observado o conjunto de 113 genes modulados significativamente e dentre esses genes, 102 ainda se mantiveram DE em 72 hpi. Nesse tempo, foram observados 358 genes DE cuja expressão foi igualmente alterada na infecção com ambas cepas. Apenas 41 genes DE apresentaram regulação positiva em um deles e regulação negativa no outro. Nessa pesquisa, não se encontraram diferenças substanciais entre a resposta do hospedeiro infectado com as duas cepas (Houston-Ludlam *et al.*, 2016).

No começo do 2018, foi publicado um trabalho que avaliava alterações na expressão gênica em placenta de mulheres grávidas com a doença de Chagas crônica. Foram encontrados apenas 42 genes DE e respostas como a inflamatória e a ativação linfocitária foram reguladas positivamente, enquanto vários processos biossintéticos foram regulados negativamente. Muitos dos genes expressos em grávidas soropositivas para *T. cruzi*, codificam proteínas associadas ao aborto espontâneo e pré-eclâmpsia (Juiz *et al.*, 2018).

Embora a tecnologia de RNA-seq seja a mais utilizada na atualidade para avaliar alterações na expressão gênica, a tecnologia de microarranjos ainda é usada. Em 2018, foi feito outro estudo com relação à resposta da placenta ao *T. cruzi*, usando os microarranjos. Nesse estudo, um extrato placentário humano foi infectado com a cepa Y, em duas concentrações: 10^5 (baixa parasitemia) e 10^6 (alta parasitemia) parasitos/mL. Estranhamente, a infecção com baixa parasitemia gerou uma maior quantidade de genes regulados, regulando 641 e 1.943 genes em 2 e 24 horas, respectivamente. Vias como resposta imune inata, processos metabólicos, resposta ao estresse e morte celular foram moduladas (Castillo *et al.*, 2018).

2.7 SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA

As tecnologias de RNA-seq aprimoraram os estudos de transcritômica de células infectadas com *T. cruzi*. A plataforma SOLiD, baseada em sequenciamento por ligação (SBL), foi a primeira em ser usada para avaliar o transcrito de cardiomiócitos infectados com o clone Dm28c (Rampazzo, 2011) e de células Vero infectadas com Dm28c e Y (Kalb, 2013). Essa plataforma atualmente está comercialmente descontinuada.

A tecnologia Illumina é uma poderosa plataforma de sequenciamento de alto rendimento que foi constantemente aprimorada, reduzindo custos e aumentando o tamanho das leituras, permitindo uma ampla gama de aplicações. Nesse trabalho, utilizamos a tecnologia de Illumina, especificamente a plataforma HiSeq 2500, por gerar uma grande quantidade de dados, permitindo avaliar com uma grande profundidade e precisão, o transcrito das células infectadas.

O primeiro passo para realizar o sequenciamento na plataforma Illumina é preparar as bibliotecas contendo o cDNA que será sequenciado. No preparo das bibliotecas, o mRNA é clivado em fragmentos com um tamanho apropriado para o sequenciamento e convertido em cDNA. Nas extremidades dos fragmentos de cDNA, são adicionados adaptadores contendo as sequências de ligação do *primer* de sequenciamento, indexes e as regiões complementares aos oligos (oligonucleotídeos) na placa de vidro (*flow cell*) (figura 6). Essas bibliotecas podem ser *paired-end* ou *single-read*; a primeira proporciona leituras das duas extremidades do fragmento, enquanto que a segunda, apenas leituras de uma extremidade.

FIGURA 6. FRAGMENTO DE cDNA COM OS ADAPTADORES

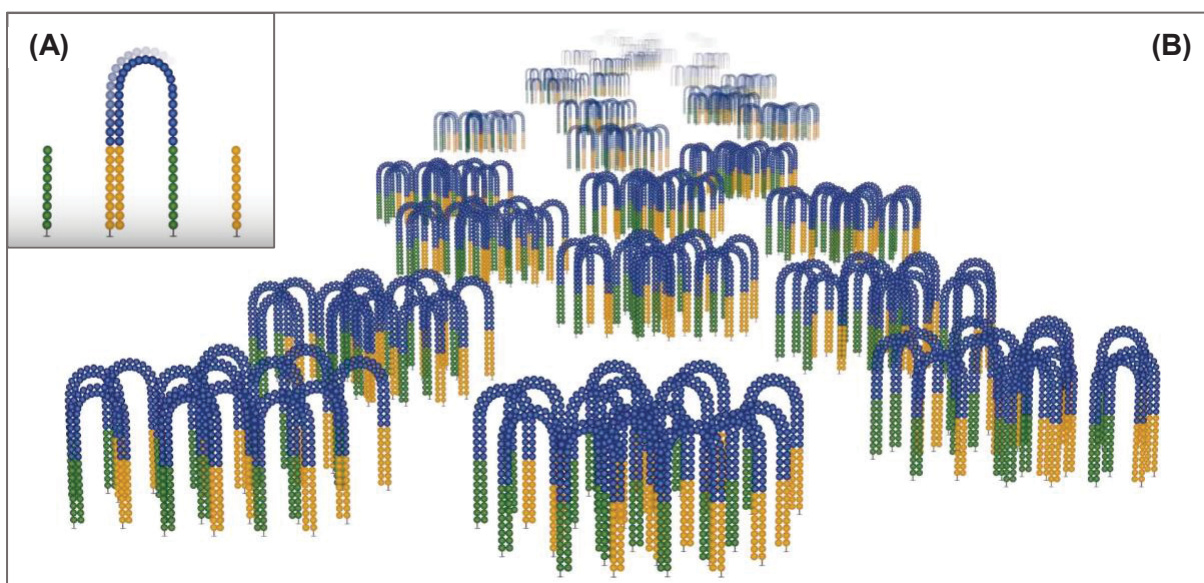


FONTE: Modificado de Illumina (2013a). LEGENDA: Azul, fragmento de cDNA; rosa e verde claro; lugares de ligação do primer de sequenciamento; roxo e vermelho, indexes; laranja e verde escuro, regiões complementares aos oligos da placa de vidro.

A placa de vidro onde ocorre as reações do sequenciamento contém canaletas, as quais estão revestidas por dois tipos de oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*). As bibliotecas de dsDNA (DNA de dupla fita) são desnaturadas em moléculas de ssDNA (DNA de única fita), as quais se ligam aos oligos complementares que estão fixados na placa de vidro. Uma alta densidade dos oligos na placa de vidro facilita o processo de ligação dos fragmentos de ssDNA. Os oligos são usados como *primers* pela DNA polimerase para sintetizar uma cópia inicial da molécula de ssDNA molde. Depois disso, essa molécula molde é retirada.

As moléculas unidas à placa de vidro sofrem um processo de clusterização, que consiste em formar *clusters* de cada molécula ao amplificá-las isotermicamente mediante uma PCR em ponte (*bridge PCR*). Na clusterização, o adaptador do extremo livre da fita recém-sintetizada se liga ao seu respectivo oligo complementar na placa, formando uma estrutura em ponte. A DNA polimerase sintetiza a segunda fita da “ponte”, depois essa dupla fita é desnaturada, deixando as duas fitas linearizadas. Os adaptadores das fitas linearizadas se ligam aos oligos complementares, repetindo assim o ciclo até formar o *cluster* com uma quantidade adequada de fitas (figura 7A). Cada fragmento de DNA inicial forma um *cluster*, resultando em milhares de *clusters* (figura 7B). Finalizada a amplificação, são eliminadas as fitas reversas usando um sítio de clivagem no oligonucleotídeo (Buermans e Den Dunnen, 2014).

FIGURA 7. PROCESSO DE CLUSTERIZAÇÃO

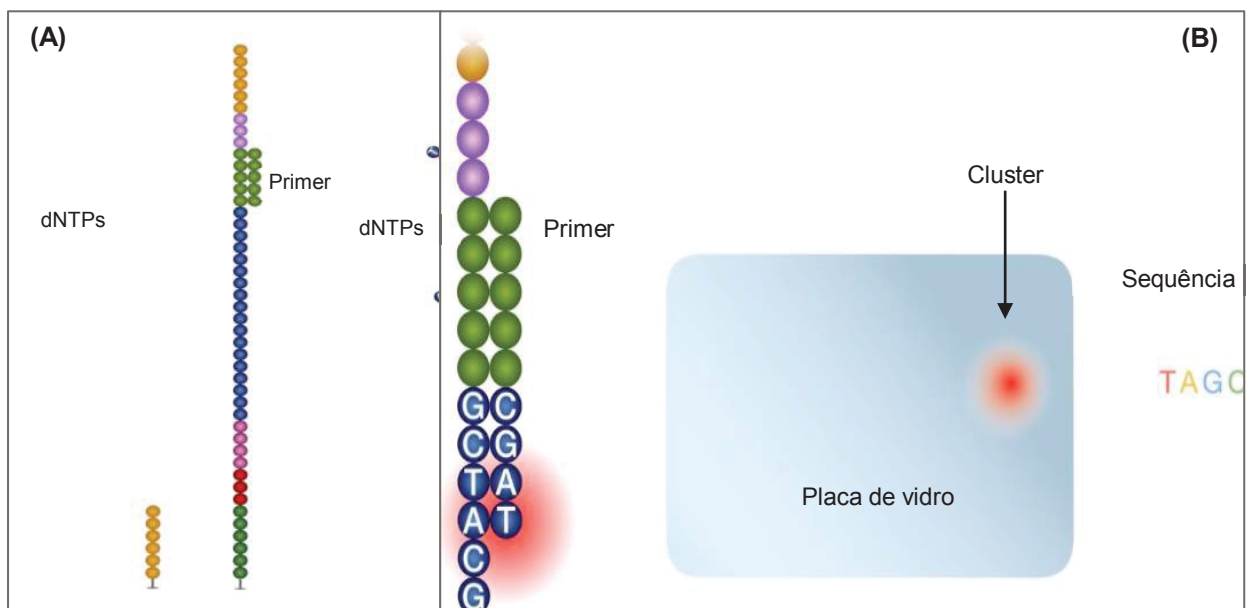


FONTE: Modificada de Illumina (2013a). LEGENDA: (A) Formação da estrutura em ponte e síntese da segunda fita. (B) Cada cluster representa um fragmento de ssDNA. Azul, fragmento de cDNA; verde e amarelo, adaptadores e seus oligos complementares.

O sequenciamento através desta tecnologia ocorre por síntese (SBS - *sequencing by synthesis*). Para começar, o *primer* de sequenciamento se liga ao seu respectivo lugar de ligação, do adaptador, nas fitas dos *clusters* (figura 8A). A DNA polimerase usa esse *primer* para começar o processo de síntese. São fornecidos os 4 deoxinucleotídeos (dNTPs) modificados no extremo 3' com uma etiqueta fluorescente (figura 8A), que serve para identificar cada base, e também como um bloqueador reversível para impedir múltiplos eventos de extensão (Buermans e Den Dunnen, 2014).

O primeiro dNTP é adicionado pela DNA polimerase em todas as fitas e seus fluoróforos são excitados. O grande número de fitas dentro de um *cluster* permite que o sinal emitido pelos dNTPs tenha uma intensidade suficiente, para que seja detectado. Gera-se uma imagem com a cor detectada no *cluster*, a qual será interpretada como uma base específica dessa cor (figura 8B). Logo depois, a extremidade 3' é desbloqueada e os dNTPs que não foram adicionados, os fluoróforos e outros reagentes em excesso, são removidos. Em seguida, começa o seguinte ciclo, fornecendo novamente os dNTPs, detectando o sinal e lavando os excedentes, e assim sucessivamente. O número de ciclos depende do tamanho das leituras a obter, pois em cada ciclo é detectado um nucleotídeo.

FIGURA 8. SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE (SBS)



FONTE: Modificada de Illumina (2013a). LEGENDA: (A) Ligação do primer de sequenciamento à sequência do adaptador na fita e a adição dos dNTPs marcados com fluoróforos. (B) Adição dos dNTPs, detecção do sinal e interpretação do nucleotídeo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o perfil de expressão gênica de duas linhagens celulares mamíferas (H9c2 e HeLa) no processo de infecção com dois clones de *Trypanosoma cruzi* de diferentes grupos (Dm28c e CL Brener), através da tecnologia de sequenciamento em larga escala.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações da expressão gênica das células hospedeiras no processo de infecção.
- Comparar os resultados da modulação gênica na mesma célula hospedeira infectada com os dois diferentes clones.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares HeLa e H9c2 (câncer cervical humano e mioblasto de coração de rato, respectivamente) foram mantidas em meio DMEM de baixo teor de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, NaHCO₃ 3,7 g/L e HEPES 10 mM, a 37 °C e atmosfera úmida de 5 % de CO₂. As propagações foram feitas por tripsinização e constituiu nas seguintes etapas:

- Nas garrafas de 75 cm², lavar as células com 10 mL de PBS*;
- Adicionar 2 mL de solução de tripsina* e incubar a 37 °C com 5 % de CO₂ até o desprendimento das células (5-7 min);
- Adicionar 4 mL de meio DMEM suplementado e homogeneizar;
- Centrifugar a 300 xg por 5 min e descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o precipitado em 2 mL de meio DMEM suplementado;
- Inocular ~ 8 x 10⁵ para H9c2 e ~ 4 x 10⁵ células/mL para HeLa, com 10 mL de meio DMEM suplementado e incubar a 37 °C com 5 % de CO₂ por 4 dias.

* PBS (*Phosphate Buffered Saline*): KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ x7H₂O 4,3 mM, NaCl 137 mM.

* Solução de tripsina: tripsina 0,05%, NaCl 0,8%, dextrose 0,1%, KCl 0,04%, bicarbonato de sódio 0,058% e EDTA 0,02%.

4.2 CULTIVO DO PARASITO

Os cultivos de formas epimastigotas foram mantidos em meio LIT* acrescido com 10% de SFB (CAMARGO, 1964), realizando repiques com inóculos de 10⁶ parasito/mL (CONTRERAS *et al.*, 1988) e incubando-os a 28 °C com 5 % de CO₂, até que os parasitos atingissem a fase logarítmica do crescimento entre 3-5 dias, dependendo do clone.

* Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*): extrato de levedura 15 g/L, fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L, glicose 2,2 g/L, hemina 0,02 g/L, infuso de fígado 5 g/L, KCl 0,4 g/L, NaCl 4,4 g/L, triptose 5 g/L e pH 7,2.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS CELULARES

As extrações de DNA das linhagens celulares foram feitas seguindo o protocolo de De Borba e De Araujo (2012) e consistiu nas seguintes etapas:

- Adicionar 500 μL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl e 1% SDS) e incubar a 55 °C por 24 h;
- Centrifugar a 14.000 xg por 15 min e transferir o sobrenadante a um tubo limpo;
- Adicionar 300 μL de 5 M NaCl e agitar suavemente;
- Centrifugar a 14.000 xg por 15 min e transferir o sobrenadante a um tubo limpo;
- Adicionar 1 volume de isopropanol absoluto frio (-20°C), agitar suavemente e precipitar o DNA a -20 °C por 24h;
- Centrifugar a 14.000 xg por 15 min e descartar o sobrenadante;
- Adicionar 750 μL de 70% EtOH;
- Centrifugar a 14.000 xg por 5 min e descartar o sobrenadante;
- Secar por 20 min a 50 °C;
- Ressuspender o precipitado em 50 μL de água mili Q.

A concentração e a pureza das amostras de DNA total foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*).

4.4 DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

Para descartar a contaminação com *Mycoplasma* spp. dos cultivos celulares foi feita a detecção por PCR em tempo real. Um fragmento de 280 pb foi amplificado com o *primer forward* GPO-3 (5' GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3') e o *primer reverse* MGSO (5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3') baseada na região 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. (VAN KUPPEVELD *et al.*, 1994). Estas reações foram realizadas por duplicata no equipamento LightCycler® 96 Real-Time PCR System e constituiu em 10 μL de SYBR® Green, 100 nM de cada *primer*, 200 ng de DNA e água suficiente para um volume final de 20 μL . O protocolo de amplificação consistiu em: 10 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos a 95 °C por 20 s, 60 °C por 20 s e 72 °C por 30 s. Ao final, foi feita uma etapa de dissociação e fusão. O controle positivo foi uma amostra de célula Vero, que já tinha sido detectada como contaminada com *Mycoplasma* spp.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

Com o intuito de conferir que os diferentes clones não foram trocados nos consecutivos processos de infecção, foi extraído o DNA dos parasitos usados para a infecção final, infecção onde se extraiu o RNA das células infectadas. A extração foi feita seguindo o protocolo de Medina-Acosta e Cross (1993) com modificações e consistiu nas seguintes etapas:

- Coletar $\sim 10^7$ parasitos e centrifugar a 3.000 xg por 10 min;
- Ressuspender o precipitado em 150 μL de tampão TELT*, invertendo o tubo 3 vezes ou até que todas as células sejam bem ressuspensas (não vortexar);
- Incubar por 5 min;
- Adicionar 150 μL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e agitar o tubo suavemente por 5 min;
- Centrifugar a 13.000 xg por 5 min e coletar a fase aquosa em um tubo novo de 1,5 mL;
- Adicionar 300 μL de etanol; misturar por 15 segundos e incubar por 5 min;
- Centrifugar por 10 min a 13.000 xg e desprezar o sobrenadante;
- Lavar o precipitado com 1 mL de etanol 70 % por 10 segundos;
- Centrifugar por 5 min a 13.000 xg ;
- Retirar todo o sobrenadante e deixar secar o precipitado;
- Ressuspender o precipitado em 100 μL de TE*, contendo 20 $\mu g/mL$ de RNase A.

* TELT (Tampão de lise): Tris-HCl 50 mM, pH 8,0/ EDTA 62,5 mM, pH 9,0/ LiCl 2,5 M / Triton X-100 4% (v/v).

* TE (Tampão de ressuspensão): Tris-HCl 10 mM, pH 8,0/ EDTA 11 mM, pH 8,0.

Logo depois, utilizando os *primers* TcSC5D-fwd (5'-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3') e TcSC5D-rev (5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3'), foi amplificado um fragmento de 832 pb do gene *TcSC5D*. Com base nos polimorfismos desse fragmento, foi determinado, para cada clone, a que DTU pertence. O processo de amplificação foi feito segundo Cosentino e Agüero (2012).

4.6 METACICLOGÊNESE *in vitro*

A diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos foi feita, segundo o protocolo de Contreras e colaboradores (1985). A diferenciação consistiu nas seguintes etapas:

- Coletar 10^9 epimastigotas e centrifugar a 3.000 *xg* por 3 min;
- Lavar duas vezes com 10 mL de meio TAU*;
- Ressuspender o precipitado em meio TAU a uma concentração de 5×10^8 parasito/mL e incubar 2 h a 28 °C com 5 % de CO₂;
- Inocular os parasitos em meio TAU3AAG*, até atingir uma concentração de 5×10^6 parasito/mL;
- Incubar os parasitos em garrafas de 150 cm² (a altura do meio não deve ultrapassar os 10 mm);
- Homogeneizar e deitar as garrafas rapidamente;
- Incubar as garrafas sem agitação a 28 °C, com 5 % de CO₂, por 3-5 dias.
- Coletar os parasitos virando a garrafa lentamente e evitando a contaminação com os epimastigotas presentes na nata;
- Centrifugar os tripomastigotas recolhidos a 3.000 *xg* por 10 min;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender em 1 mL de meio DMEM.

* Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; NaCl 190 mM; NaHCO₃ 0,6 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0.

* Meio TAU3AAG: meio TAU acrescido com L-prolina 10 mM, aspartato de sódio 2 mM, glutamato de sódio 50 mM e glicose 10 mM.

4.7 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DAS CÉLULAS

Para obter tripomastigotas de cultura, células hospedeiras devem ser infectadas com os tripomastigotas metacíclicos coletadas da diferenciação. As células hospedeiras Vero e H9c2 foram infectadas para avaliar a quantidade de tripomastigotas de cultura que liberam e em quanto tempo. As infecções das células hospedeiras com os tripomastigotas metacíclicos foi feita com a proporção 100:1 parasito-célula, colocando 4×10^5 células numa garrafa de 25 cm².

A quantidade de células a ser infectadas deve ser a adequada para que o RNA total extraído tenha uma quantidade suficiente, para preparar as bibliotecas. A extração de RNA total foi feita de um poço de 9,6 cm² com 1,7 x 10⁵ células e de uma garrafa de 75 cm² com 1,3 x 10⁶ células. As células usadas foram H9c2 e HeLa e foram incubadas 16 horas no poço ou na garrafa, para permitir sua aderência.

4.8 OBTENÇÃO DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA

Tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* foram obtidos a partir de infecção da linha celular H9c2. Numa garrafa de 25 cm² foram adicionadas células H9c2 numa quantidade de 5 x 10⁵ células, que logo depois foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos em proporção 100:1 parasito-célula. Foi deixado incubando a 37 °C com 5 % de CO₂ por 5 dias, trocando o meio 24 h pós-infecção. Depois do estabelecimento das infecções, a obtenção de tripomastigotas de cultura foi feita, seguindo as seguintes etapas:

- Adicionar 1,3 x 10⁶ células H9c2 numa garrafa de 75 cm²;
- Infectar as células H9c2 com tripomastigotas de cultura, numa proporção 10:1 parasito-células, em 8 mL de meio de cultura;
- Após 4 horas de incubação a 37 °C com 5 % de CO₂, lavar com 8 mL de PBS e adicionar 8 mL de novo meio de cultura;
- Incubar por 4 dias para Dm28c e 6 dias para CL Brener trocando o meio diariamente;
- No último dia, lavar com 8 mL de PBS e adicionar novo meio de cultura;
- Deixar incubando 8 horas e coletar o sobrenadante.

O último passo é importante para obter tripomastigotas puros, com uma porcentagem menor de 5 % de amastigotas.

4.9 INFECÇÃO DOS HOSPEDEIROS

As infecções para extração de RNA foram feitas em poços que possuem uma área de 9,6 cm². As células foram semeadas em cada poço, a uma quantidade de 1,7 x 10⁵, a qual representa uma confluência entre 20-30 %, e incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂ por 16 horas, para permitir que as células se aderissem. Em seguida, foram infectadas com os tripomastigotas de cultura (> 95 % de pureza) na proporção de 10:1

parasito-célula e lavadas com PBS, após 4 horas de incubação, para retirar os parasitos que não aderiram. A cinética de infecção foi interrompida nos pontos 6 e 24 horas pós-infecção para extrair o RNA total. Os controles das linhagens celulares HeLa e H9c2 foram a cultura no tempo 0 (sem infecção), e dos parasitos foram os tripomastigotas de cultura dos clones Dm28c e CL Brener, no tempo 0 (sem infectar). As infecções e os controles foram feitos em triplicata.

4.10 IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO DAS CÉLULAS INFECTADAS

Em paralelo com as infecções dos hospedeiros, para a extração de RNA, também foram feitas infecções em placas de 96 poços, para avaliar a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula em cada tempo. As células foram semeadas a uma densidade de 5×10^3 células por poço e após 16 horas, foram infectadas com o parasito na proporção 10:1 parasito-célula. Os controles foram células não infectadas para cada tempo. As trocas de meio, lavagens e tempos de análise foram iguais que as infecções para extração de RNA. As infecções e os controles para cada tempo foram feitos em 8 réplicas.

Quanto aos tempos de análise, o protocolo consistiu nas seguintes etapas:

- Lavar os poços com PBS;
- Adicionar 100 μ L de metanol gelado (- 20 °C) e deixar fixar por 5 min;
- Retirar todo o metanol sem homogeneizar;
- Lavar duas vezes com PBS sem homogeneizar;
- Adicionar 100 μ L de DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol, 0,5 μ g/mL).

As imagens foram obtidas com o equipamento Operetta *High-Content Imaging System* (PerkinElmer) usando lentes objetivas WD 40X e campo claro, contraste de fase digital e canais DAPI. O número médio de parasitos intracelulares e porcentagem de células infectadas foram calculados automaticamente, usando o *software* de análise e imagem de conteúdo de alta harmonia da Harmony®.

4.11 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração do RNA total das amostras controles e das infecções, foi feita com o kit RNAeasy (Qiagen), seguindo suas orientações. A extração consistiu nas seguintes etapas:

- Descartar o meio e lavar os poços duas vezes com 1,5 mL de PBS;
- Adicionar 600 μ L de tampão RLT (1% β -ME) e homogeneizar;
- Adicionar 1 volume de etanol 70% e homogeneizar por pipetagem;
- Transferir a amostra para a coluna e centrifugar a 8.000 xg por 15 s;
- Adicionar 350 μ L de tampão RW1 e centrifugar a 8.000 xg por 15 s;
- Adicionar 80 μ L de mix do DNase (10 μ L de solução estoque de DNase e 70 μ L de tampão RDD) e incubar a temperatura ambiente por 15 min;
- Adicionar 350 μ L de tampão RW1 e centrifugar a 8.000 xg por 15 s;
- Adicionar 500 μ L de tampão RPE e centrifugar a 8.000 xg por 15 s;
- Adicionar 500 μ L de tampão RPE e centrifugar a 8.000 xg por 2 min;
- Trocar o tubo coletor por um tubo novo e adicionar 30 μ L de água *RNAse free* na coluna e centrifugar a 8.000 xg por 15 s. Repetir mais uma vez, para eluir o RNA total da coluna.

A concentração e qualidade do RNA total foram analisadas pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*), com o kit RNA 6000 Nano LabChip®, segundo especificações do fabricante. O índice de integridade do RNA (RIN) gerado, varia de 0-10 em ordem crescente de integridade (Vitale, 2001).

4.12 PREPARO DAS BIBLIOTECAS

A preparação das bibliotecas para o sequenciamento foi feita com o kit *TruSeq Stranded mRNA HT Sample Prep* (ID do catálogo: RS-122-2103). A preparação foi feita seguindo as indicações do protocolo do kit, que envolve várias etapas, desde a purificação do mRNA até a normalização das bibliotecas, para o sequenciamento. Brevemente, o mRNA foi purificado do RNA total usando esferas magnéticas de oligo (dT) e logo depois, foi fragmentado mediante calor e cátions divalentes. Os fragmentos de mRNA foram usados para gerar o cDNA através da síntese da primeira fita com a transcriptase reverse *SuperScript II*, seguida da síntese da segunda fita. Uma adenina foi adicionada no extremo 3' dos cDNAs, para prevenir a ligação de uns com outros na reação de ligação. Adaptadores foram ligados aos fragmentos adenilados, preparando-os para a hibridização à *flow cell*. Para enriquecer os cDNA ligados aos adaptadores, foi feita uma PCR com poucos ciclos. O controle de qualidade das bibliotecas foi avaliado, preparando as amostras com o kit DNA

1000, processando-as no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer e analisando-as com o programa 2100 Expert. O tamanho mais abundante dos fragmentos das bibliotecas deveria ser de aproximadamente 260 pb. Este pode ser observado no eletroferograma da distribuição de fragmentos do cDNA.

Logo depois, as 30 bibliotecas foram quantificadas para sua normalização e o preparo dos *pools* para cada canaleta da placa de vidro. O protocolo de preparo, processamento e análise utilizado para o controle de qualidade, também mostra a concentração de cada amostra, mas o protocolo do kit de preparo sugere uma quantificação usando qPCR, que foi feita por triplicata e seguindo as indicações do protocolo do kit da Illumina, *Sequencing Library qPCR Quantification Guide (part # 11322363)*.

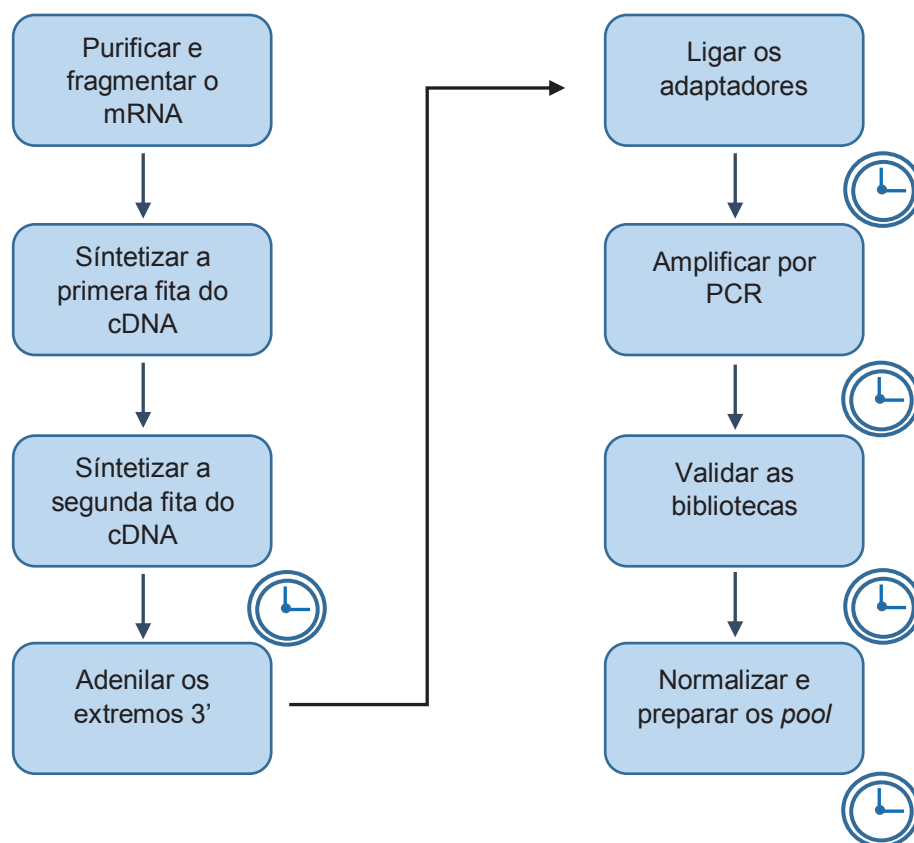
As bibliotecas foram normalizadas para 10 nM, como sugerido no kit de preparo das bibliotecas, e as amostras que foram sequenciadas na mesma canaleta, foram agrupadas em um mesmo *pool*. No total, foram preparados 6 *pools*; nos três primeiros *pools* se agruparam as amostras pertencentes a H9c2, cada uma das 3 réplicas foi colocada em diferentes *pools*. De modo igual, as amostras pertencentes a HeLa, foram agrupadas nos outros 3 *pools* restantes, os quais foram distribuídos nas 6 canaletas de sequenciamento disponíveis (tabela 1). Além das nossas amostras, cada *pool* tinha amostras de outros trabalhos, mas a concentração final de cada *pool* foi de 10 nM, seguindo o protocolo do kit, e o cálculo do agrupamento foi feito para que cada uma das nossas amostras gerasse aproximadamente 25 milhões de leituras.

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR CANALETA

CANALETA 1	CANALETA 2	CANALETA 3	CANALETA 4	CANALETA 5	CANALETA 6
H9c2_Controle (Réplica 1)	H9c2_Controle (Réplica 2)	H9c2_Controle (Réplica 3)	HeLa_Controle (Réplica 1)	HeLa_Controle (Réplica 2)	HeLa_Controle (Réplica 3)
H9c2_CL_06 (Réplica 1)	H9c2_CL_06 (Réplica 2)	H9c2_CL_06 (Réplica 3)	HeLa_CL_06 (Réplica 1)	HeLa_CL_06 (Réplica 2)	HeLa_CL_06 (Réplica 3)
H9c2_CL_24 (Réplica 1)	H9c2_CL_24 (Réplica 2)	H9c2_CL_24 (Réplica 3)	HeLa_CL_24 (Réplica 1)	HeLa_CL_24 (Réplica 2)	HeLa_CL_24 (Réplica 3)
H9c2_Dm_06 (Réplica 1)	H9c2_Dm_06 (Réplica 2)	H9c2_Dm_06 (Réplica 3)	HeLa_Dm_06 (Réplica 1)	HeLa_Dm_06 (Réplica 2)	HeLa_Dm_06 (Réplica 3)
H9c2_Dm_24 (Réplica 1)	H9c2_Dm_24 (Réplica 2)	H9c2_Dm_24 (Réplica 3)	HeLa_Dm_24 (Réplica 1)	HeLa_Dm_24 (Réplica 2)	HeLa_Dm_24 (Réplica 3)
Outras amostras	Outras amostras	Outras amostras	Outras amostras	Outras amostras	Outras amostras

FONTE: O autor. LEGENDA: CL, CL Brener; Dm, Dm28c; 06, 6 hpi; 24, 24 hpi.

FIGURA 9. FLUXO DE TRABALHO DO PREPARO DAS BIBLIOTECAS



FONTE: Modificado de Illumina (2013b). LEGENDA: O relógio indica um ponto de parada opcional.

4.13 ANÁLISES DOS DADOS DE RNA-SEQ

O sequenciamento foi feito na plataforma Illumina HiSeq 2500, utilizando o kit TruSeq SBS V3 –HS, gerando leituras *single-read*. As leituras foram filtradas mediante o “filtro de passagem” da Illumina, na qual as leituras que possuem uma média de escore de qualidade Phred menores a 30, são descartadas. Após a filtragem, a qualidade das leituras obtidas foi avaliada com a ferramenta FastQC (Andrews, 2010).

Nesse trabalho foram utilizados, ao total, 4 espécies, motivo pelo qual o mapeamento das leituras obtidas de cada infecção foi feito nos genomas das espécies envolvidas. Para mapear as leituras dos hospedeiros, HeLa e H9c2, foram escolhidos os genomas de humano (*Genome Reference Consortium Human GRCh38*) e rato (RGSC Rnor_6.0), respectivamente, obtidas do UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

No caso dos parasitos, os genomas usados foram de CL Brener, CL Brener Esmeraldo-like, CL Brener Non Esmeraldo-like e Dm28c cruzi cruzi, todos eles versão 41. Os 3 primeiros genomas foram concatenados para mapear as leituras de CL

Brener e o último, foi usado para mapear as leituras de Dm28c. Os genomas dos parasitos foram obtidos por meio da base de dados do TriTrypDB: *The Kinetoplastid Genomics Resource* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

O programa usado para realizar o mapeamento foi Bowtie 2 (versão 2.3.4.3) (Langmead e Salzberg, 2012), permitindo até duas bases não pareadas. Posteriormente, as leituras mapeadas foram quantificadas, usando o programa HTSeq (versão 0.11.1) (Ander *et al.*, 2015), contando só as leituras que tem uma intersecção completa com o gene.

Para observar a consistência entre as réplicas de uma mesma condição e a distância amostral, foram gerados gráficos de PCA (*Principal Component Analysis*) e mapas de calor, baseados na distância Euclidiana. A expressão diferencial foi avaliada com o pacote edgeR, descartando os genes que apresentam menos de dois leituras por milhão e considerando apenas os que são detectados, pelos menos em duas réplicas. Uma lista com a expressão diferencial dos genes foi gerada, mostrando os genes, o *fold-change*, o p-valor e o *false discovery rate* (FDR).

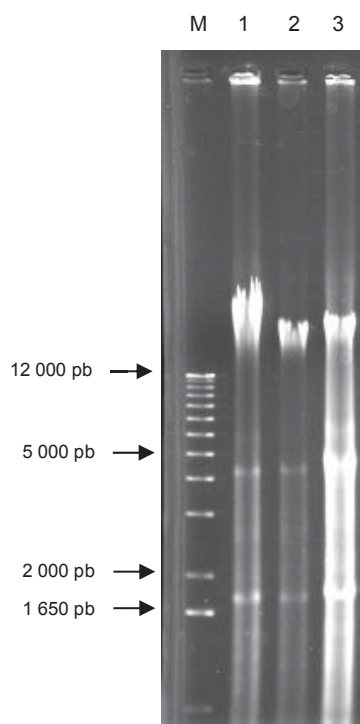
Com o intuito de gerar e analisar uma lista de genes diferencialmente expressos (DEG) com grande confiabilidade, usamos um FDR <0,05 e $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$ para filtrar o número de genes detectados, visando gerar poucos falsos positivos. O valor de FDR fornece uma significância estatística, enquanto o valor de *fold-change* fornece uma significância biológica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS CELULARES

O primeiro passo, antes de começar as infecções, foi a extração de DNA das linhagens celulares, para a sua respectiva detecção de *Mycoplasma* spp. Para evidenciar a presença de ácido nucleico das extrações de DNA, foi feita uma corrida de eletroforese num gel com 0,8 % de agarose, usando um marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen). Na figura 10, observa-se o DNA em cima da banda de 12 Kb nas 3 linhagens celulares e também duas bandas perto das bandas de 5 Kb e 1,6 Kb, as quais correspondem ao RNA ribossômico, rRNA 28S e rRNA 18S, respectivamente.

FIGURA 10. GEL DE AGAROSE DAS EXTRAÇÕES DE DNA



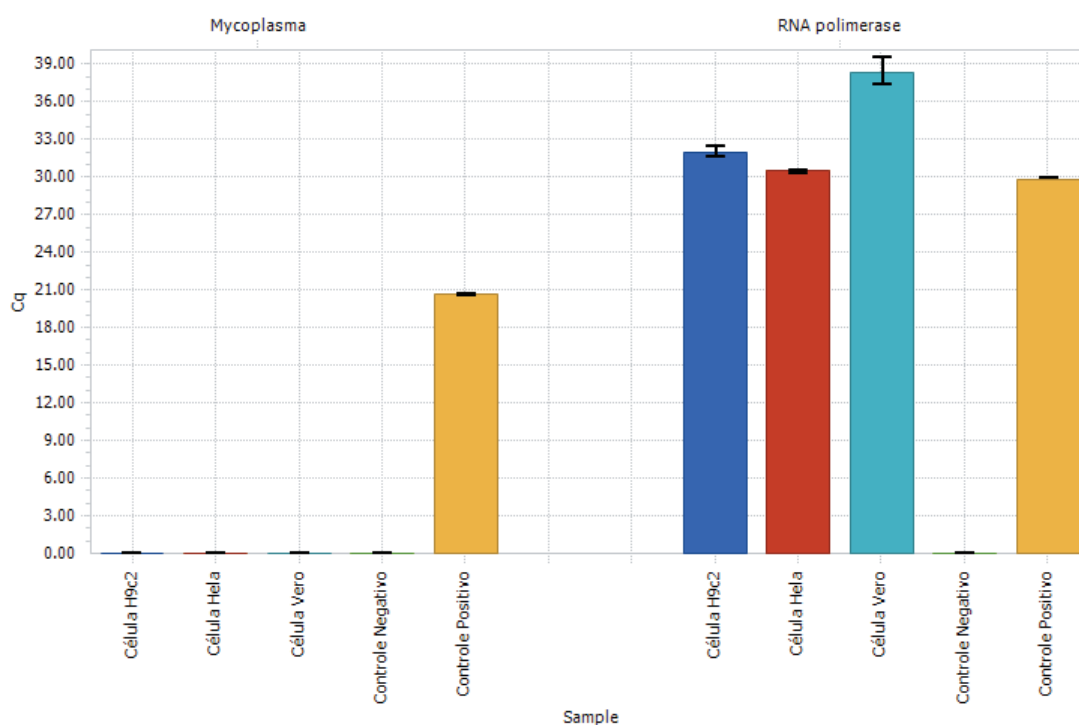
FONTE: O autor. LEGENDA: M; Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen); canaleta 1: amostra Vero; canaleta 2: amostra H9c2; canaleta 3: amostra HeLa.

5.2 DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

Um dos problemas mais comuns do cultivo celular é a contaminação com *Mycoplasma* spp., a qual pode interferir nos parâmetros medidos nos cultivos (Drexler e Uphoff, 2002). Em nosso laboratório não foi diferente, pois algumas linhagens já

tinham mostrado essa contaminação. Para garantir que as linhagens a trabalhar não estejam contaminadas, foi feita uma PCR em tempo real para detectar a presença da bactéria. O *Mycoplasma* spp. não foi detectado em nenhuma das linhagens celulares testadas, amplificando somente o controle positivo (uma amostra contaminada com *Mycoplasma* spp.). Para conferir que as amostras apresentassem DNA de qualidade e não tivessem inibidores da PCR, também foi realizada a amplificação uma região do gene da RNA polimerase II das linhagens celulares. O resultado foi positivo em todas as amostras. Como os *primers* usados foram desenhados baseados no gene da RNA polimerase humana, as amostras não humanas demoraram alguns ciclos a mais para atingir o *threshold*, como se observa no gráfico 1. Foi confirmado que as células usadas para os experimentos não estavam contaminadas com *Mycoplasma* spp.

GRÁFICO 1. GRÁFICO DE BARRAS DA DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp.

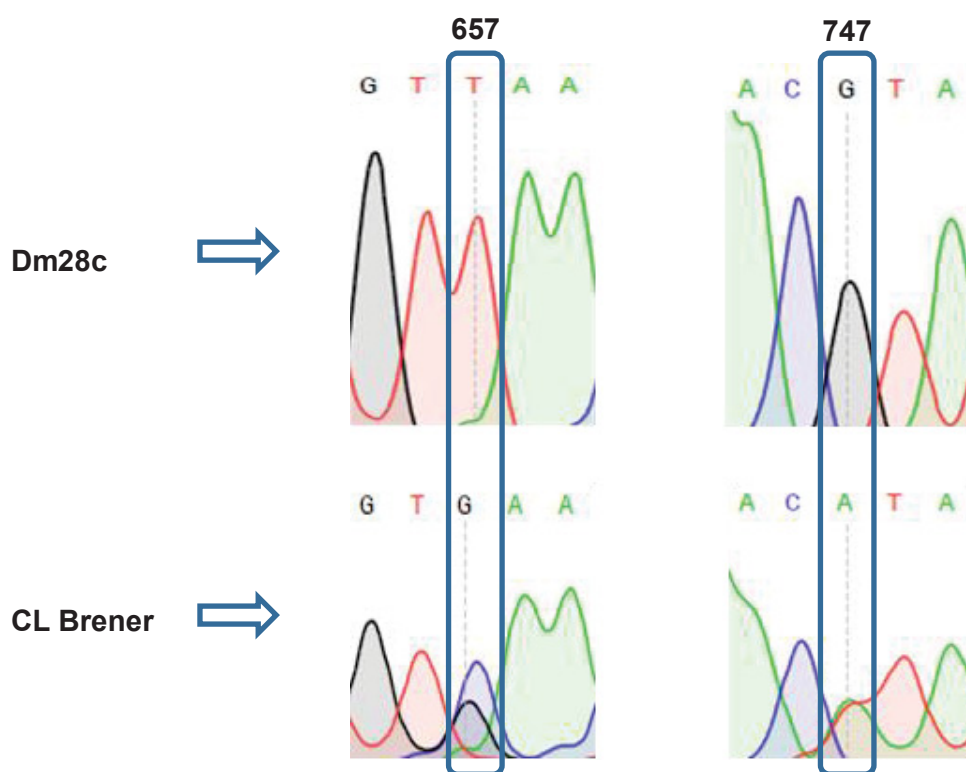


FONTE: Gráfico gerado pelo programa LightCycler® 96 SW 1.1. LEGENDA: As barras mostram o ciclo de amplificação das amostras por PCR em tempo real, para detecção de *Mycoplasma* spp. Os valores apresentados correspondem à média de duas réplicas. Cq, ciclo de quantificação; *Sample*, amostra.

5.3 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

Em um processo de repiques e infecções sucessivas, o risco de trocar as amostras é real. Portanto, para garantir que nossos clones não foram trocados nesse processo, foi realizado o sequenciamento do gene *TcSC5D*, que codifica uma esteroide desaturase putativa. Usando a informação de 2 polimorfismos, foi confirmado que os clones não foram trocados nos contínuos processos de infecção. Na posição 657, o clone Dm28c apresentou uma timina, a qual é característica da DTU I, enquanto o clone CL Brener apresentou uma citosina e uma guanina características da DTU VI. Na posição 747, o Dm28c mostrou uma guanina e o CL Brener uma adenina e uma timina, pertencentes às DTU I e VI, respectivamente, como observado na figura 11. A DTU VI apresenta dois nucleotídeos nos polimorfismos devido a sua natureza híbrida.

FIGURA 11. ELETROFEROGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES



FONTE: Imagem modificada do programa SnapGene™ 1.1.3. LEGENDA: Polimorfismos nas posições 657 e 747 do gene *TcSC5D*. Os clones Dm28c e CL Brener apresentam polimorfismos correspondentes aos DTU I e DTU VI, respectivamente. (Vermelho, timina; preto, guanina; verde, adenina; azul, citosina).

5.4 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DAS CÉLULAS

Para realizar as infecções, é necessário obter tripomastigotas de cultura, forma infectiva de *T. cruzi*. Para a sua obtenção, a princípio foi escolhida a linhagem celular Vero como célula hospedeira. Essa linhagem é usada no Instituto Carlos Chagas (ICC), para obtenção de tripomastigotas de cultura do clone Dm28c. Como esperado, a obtenção de tripomastigotas de cultura do clone Dm28c foi realizada com sucesso; entretanto, as infecções com o clone CL Brener não forneceram tripomastigotas em quantidade necessária para a realização dos experimentos, motivo pelo qual se decidiu avaliar outras linhagens que pudessem fornecer mais tripomastigotas. A linhagem H9c2, que é mioblasto de coração de rato, seria uma das linhagens utilizadas no experimento de infecção, tendo em vista que o coração é um dos órgãos mais afetados na doença de Chagas (Rassi *et al.*, 2000). Portanto, o parasito poderia ter uma maior afinidade por esse tipo de células. Esta linhagem celular se mostrou melhor que as células da linhagem Vero, para a obtenção de tripomastigotas de CL Brener.

Usando a linhagem H9c2 como célula hospedeira, conseguiu-se a quantidade suficiente de parasitos do clone CL Brener, para aumentar o número de garrafas com infecções, conseguindo assim uma maior quantidade de tripomastigotas de cultura, seja para fazer outras infecções ou para estocar. As infecções com a nova célula hospedeira reduziram o tempo do ciclo de liberação de tripomastigotas tanto de CL Brener, quanto de Dm28c, e aumentaram o número de tripomastigotas liberadas.

Com o clone Dm28c, o ciclo de liberação foi reduzido de 4 dias para, aproximadamente, 3,5 dias e o número de parasitos liberados aumentou de 4×10^7 para $6,8 \times 10^7$, como observado na tabela 2. Já com o clone CL Brener, que foi a causa da troca de hospedeiro, o ciclo de liberação foi reduzido de 7 dias para 6 dias, e a quantidade de tripomastigotas aumentou consideravelmente, de $1,6 \times 10^7$ para $4,8 \times 10^7$ parasitos (tabela 2). Apenas duas garrafas foram avaliadas com a célula Vero, portanto, as quantidades podem estar sujeitas a variações.

TABELA 2. CICLO DE LIBERAÇÃO E QUANTIDADE DE PARASITOS LIBERADOS

Linhagens celulares	Dias		Quantidade	
	Dm28c	CL Brener	Dm28c	CL Brener
Vero	4	7	4×10^7	$1,6 \times 10^7$
H9c2	3,5	6	$6,8 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$

FONTE: O autor. LEGENDA: A quantidade é o total de parasitos liberados numa garrafa de 75 cm².

A capacidade da célula H9c2 de diminuir o ciclo de liberação e aumentar o número de parasitos pode estar relacionada à natureza da célula, que por ser mioblasto de coração de embrião de rato possui uma abundante quantidade de receptores do tipo 2 de bradicinina (B₂R), ao contrário das células do rim (Figueroa *et al.*, 2001). Esses receptores, quando ativados, potencializam a invasão do hospedeiro (Scharfstein *et al.*, 2000).

Na invasão do parasito, esse mesmo expressa a cruzipaina, uma cisteína proteinase, que cliva o cininogênio da membrana da célula hospedeira, gerando a bradicinina, a qual pode se ligar aos B₂R da célula hospedeira. Estes receptores estão associados à proteína trimérica G, gerando uma sinalização celular intracelular que permite a liberação transiente de Ca²⁺ (Scharfstein *et al.*, 2000). Esse processo permite o recrutamento e fusão de lisossomos na membrana plasmática, em lugares onde o parasito está aderido, induzindo a internalização (Tardieux *et al.*, 1992).

Estabelecida a célula hospedeira para a obtenção de tripomastigotas, o próximo passo foi estabelecer a quantidade de células necessárias para conseguir uma quantidade adequada de RNA total, para começar o preparo das bibliotecas. A extração-teste foi feita de células não infectadas, pois a maior parte do RNA extraído pertence à célula hospedeira. Em vista que são 3 tempos de coleta do RNA total, decidiu-se medir a quantidade do RNA no tempo 0, já que em tempos posteriores, a quantidade do RNA total é maior.

A primeira opção para realizar as infecções foi na garrafa de 75 cm², obtendo uma quantidade de RNA de 36 e 53,6 µg para H9c2 e HeLa, respectivamente. A quantidade nessa garrafa foi exagerada, visto que segundo o kit de preparo de bibliotecas, a quantidade de RNA total necessária é de 0,1 - 4 µg. Visando não consumir muito material como meio, tripsina, garrafas, pipetas, entre outros; decidiu-se testar as infecções em placas de 6 poços, os quais têm uma área de 9,6 cm². A extração nos poços deu como resultado 4,3 e 8,2 µg para H9c2 e HeLa, respectivamente (tabela 3). Portanto, as infecções foram realizadas nos poços de 9,6 cm², já que a quantidade do RNA total adquirida foi suficiente para começar o preparo das bibliotecas. Os dados da tabela 3 referem-se apenas a uma extração, portanto, as quantidades podem estar sujeitas a variações.

TABELA 3. QUANTIDADE DO RNA TOTAL OBTIDO

Área de cultivo	Linhagens celulares	
	HeLa	H9c2
75 cm ²	53,6 µg	36 µg
9,6 cm ²	8,2 µg	4,3 µg

FONTE: O autor.

Outro ponto de decisão importante foi a escolha dos tempos para a avaliação do transcrito das células. Devido ao espaço na placa de vidro de sequenciamento e considerando que seriam duas células hospedeiras a infectar com dois clones, decidiu-se avaliar o transcrito em apenas dois tempos.

Utilizando micrarranjos que possui uma menor sensibilidade que o RNA-seq, dois trabalhos avaliaram a modulação gênica de células similares às nossas, em 3 dias. Nesse tempo, o parasito já está em um processo de divisão ativo. Adesse e colaboradores (2010) avaliaram o transcrito de mioblasto de rato (L₆E₉) infectado com a cepa CL. No mioblasto, foram detectados 763 genes modulados. Shigihara e colaboradores (2008) infectaram a célula HeLa e avaliaram sua modulação gênica, detectando 64 genes modulados.

A tecnologia que utilizamos para a avaliação do transcrito é sequenciamento em larga escala, pelo qual o esperado é detectar um maior número de genes modulados, quando comparado com os trabalhos que usam microarranjos. Os trabalhos que usaram microarranjos analisaram o transcrito em um dia ou mais, devido a sua pouca sensibilidade; pelo contrário, aqueles que usaram sequenciamento avaliaram tempos menores a um dia.

Após 24 horas de infecção, os parasitos se encontram num processo contínuo de divisão, completar o ciclo de replicação intracelular leva de 3-6 dias, dependendo da cepa e do hospedeiro usado. Com a finalidade de avaliar a resposta da célula em diferentes etapas, foram escolhidos os tempos de 6 e 24 hpi, um tempo precoce e um tardio, respectivamente. Já que no tempo de 6 hpi, as tripomastigotas estão destruindo e saindo do vacúolo parasitóforo (Li *et al.*, 2016). Por outro lado, no tempo de 24 hpi, o parasito já está fora do vacúolo parasitóforo e completou o processo de amastigogênese. Aproximadamente nesse tempo, começa o processo de divisão celular (Belew *et al.*, 2017; Burleigh e Woolsey, 2002).

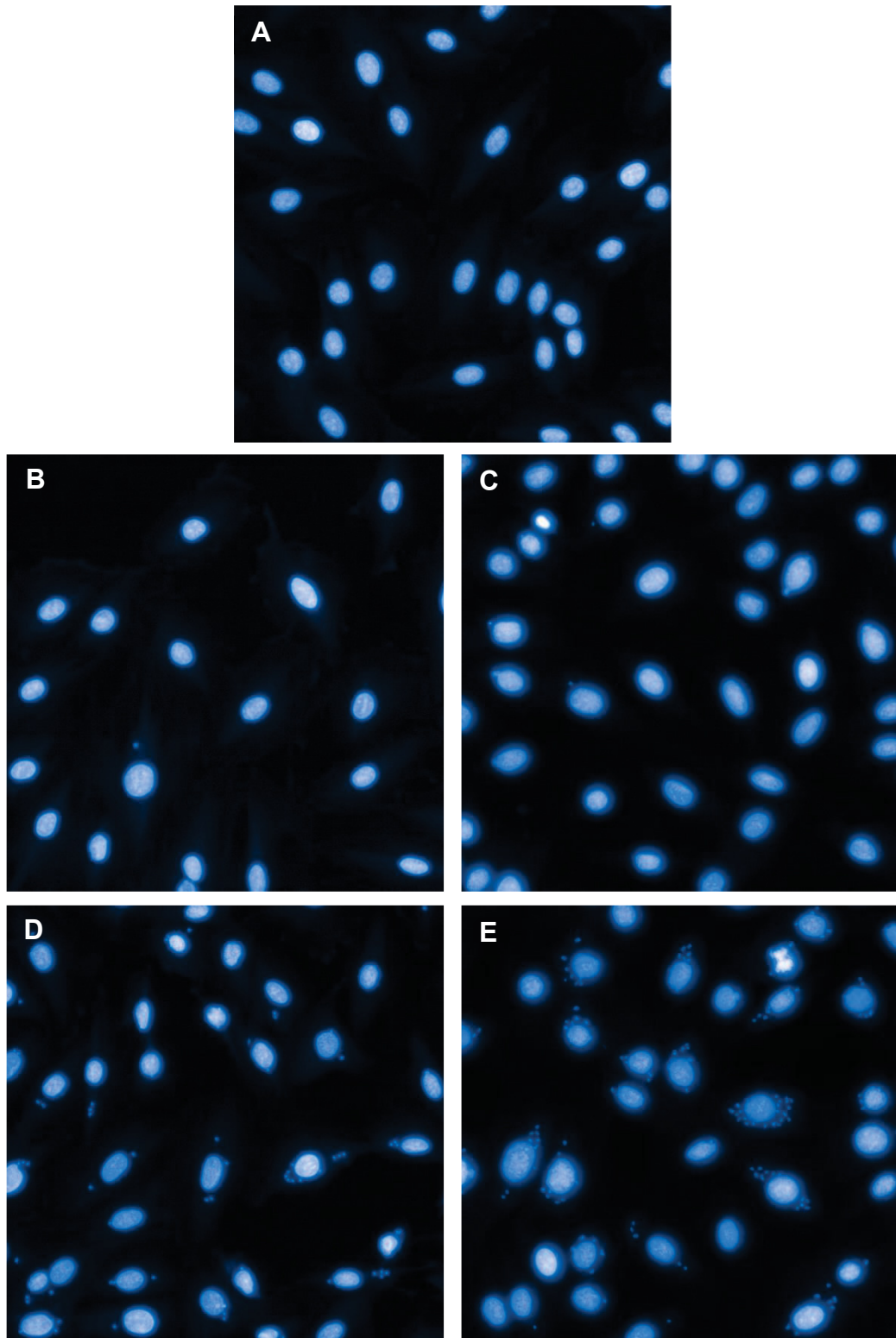
5.5 IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO DAS CÉLULAS INFECTADAS

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar as diferenças transcritômicas de duas células hospedeiras infectadas com dois clones de *T. cruzi*. Além do transcriptoma, as imagens de alto conteúdo também ajudam a ter uma melhor ideia do que está acontecendo em cada tipo celular infectado, avaliando o número de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares. As infecções a serem analisadas por imagens de alto conteúdo foram feitas em paralelo com as infecções para extrair o RNA total, visando uma alta correlação entre ambos experimentos. Nas figuras 12 e 13, observam-se as amastigotas intracelulares nos tempos de 6 e 24 hpi, nas infecções com ambos clones.

A infecção com o clone Dm28c, nas duas células, apresentou um número significativamente maior de porcentagem de células infectadas (>49%), enquanto o clone CL Brener não passou de 5 % (tabela 4). A alta porcentagem de células infectadas com Dm28c, nas primeiras 24 horas, já foi reportada anteriormente (Rampazzo, 2011; Kalb, 2013). O número tão baixo de células infectadas com CL Brener nesses tempos, corresponde com o observado nas células H9c2, no processo de obtenção de tripomastigotas de cultura. Embora o número de células infectadas com 5 dias pós-infecção (dpi), nesse processo, visualmente fosse maior a 50 %, nas primeiras 24 horas foi difícil observar células infectadas. Fibroblastos humanos infectados com o clone CL Brener, mostraram aproximadamente 6 % de células infectadas em 24 horas (Belew *et al.*, 2017). Esses resultados mostram um padrão geral de baixa porcentagem de células infectadas com CL Brener, em 24 horas.

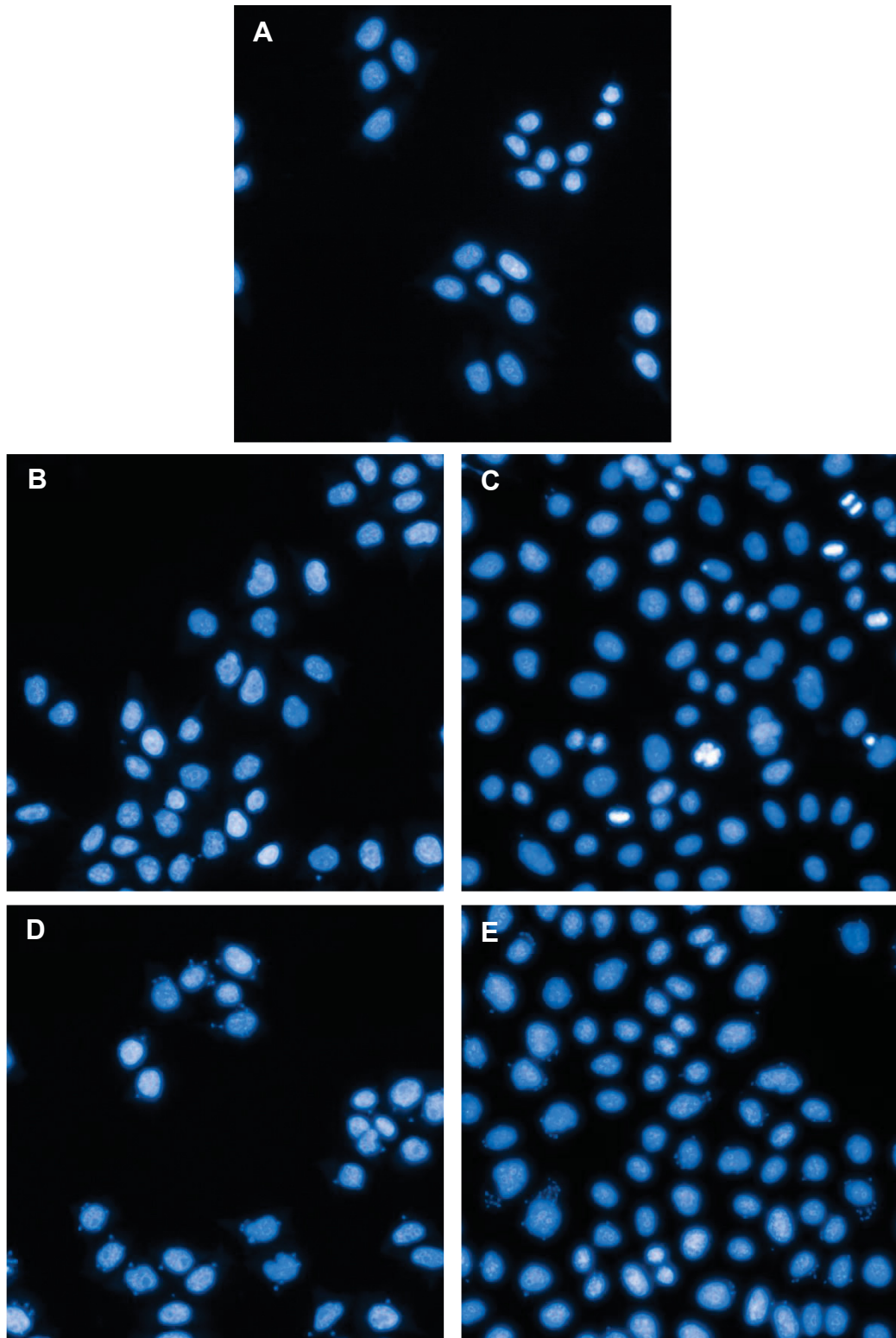
Contrariamente ao esperado, uma diminuição da porcentagem de células infectadas foi observada no tempo de 24 horas em relação ao de 6 horas (tabela 4). A diminuição da porcentagem poderia ser explicada pelo tempo de geração das linhagens celulares, já que as células não infectadas se duplicaram, enquanto as células infectadas ficaram bloqueadas na citocinese (Costales *et al.*, 2009). HeLa apresenta um tempo de geração variável, que pode ir desde 17 até 25 horas (Klevecz, 1976; Kumei *et al.*, 1989). Por outro lado, H9c2 tem um tempo geracional de aproximadamente 30 horas (Kimes e Brandt, 1976). Contando as primeiras 16 horas de incubação, para permitir a adesão das células, no tempo de 24 horas, ambas células se duplicaram pelo menos uma vez.

FIGURA 12. PROCESSO DE INFECÇÃO EM H9c2



FONTE: Imagem do *software* Harmony. LEGENDA: H9c2 infectada com dois clones em dois tempos. Núcleos são corados com DAPI. A, Célula sem infectar; B, CL Brener em 6 h; C, CL Brener em 24 h; D, Dm28c em 6 h; E, Dm28c em 24 h.

FIGURA 13. PROCESSO DE INFECÇÃO EM HeLa



FONTE: Imagem do *software* Harmony. LEGENDA: HeLa infectada com dois clones em dois tempos. Núcleos são corados com DAPI. A, Célula sem infectar; B, CL Brener em 6 h; C, CL Brener em 24 h; D, Dm28c em 6 h; E, Dm28c em 24 h.

O número de amastigotas por células, nas análises, não aumentou de 6 para 24 horas, porém o observado nas figuras 12E e 13E, não refletiu o mesmo. Isso pode indicar que verdadeiramente não tem uma diferença significativa entre 6 e 24 horas, levando em conta que o equipamento faz uma média de todas as imagens de muitos campos. Outra hipótese é que os parâmetros usados para contar as amastigotas não foram otimizados o suficiente, para conseguir avaliar corretamente o número de amastigotas por células.

TABELA 4. ANÁLISE DAS IMAGENS DE ALTO CONTEÚDO

	Células infectadas (%)		Amastigotas por célula	
	6 h	24 h	6 h	24 h
H9c2_CL Brener	4,7 ± 1	5,0 ± 1	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2
H9c2_Dm28c	74,2 ± 4	54,8 ± 4	3,9 ± 0,7	3,1 ± 0,5
HeLa_CL Brener	2,6 ± 1	1,2 ± 0,6	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
HeLa_Dm28c	78,1 ± 7	49,1 ± 6	3,4 ± 0,5	2,6 ± 0,3

FONTE: O autor. LEGENDA: Os números representam uma média de oito réplicas.

5.6 AVALIAÇÃO DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

As infecções e suas respectivas extrações de RNA total foram feitas em 4 réplicas, para garantir as 3 réplicas biológicas, caso se perdesse alguma amostra. A quantidade de RNA total de todas as amostras foi suficiente para começar o preparo das bibliotecas, no qual é preciso uma quantidade entre 0,1–4 µg. A menor quantidade de RNA total obtida foi de 3,55 µg em 50 µL, na amostra H9_00_A. Em geral, as amostras nas quais a célula hospedeira foi H9c2, apresentaram uma menor quantidade de RNA total, em comparação com as amostras onde a célula hospedeira foi HeLa (tabela 5). Isso pode ser devido a suas diferenças no tamanho genômico e tempo de duplicação. Na tabela 5, observa-se uma maior quantidade de RNA total nas células com 24 hpi, quando comparado com 6 hpi.

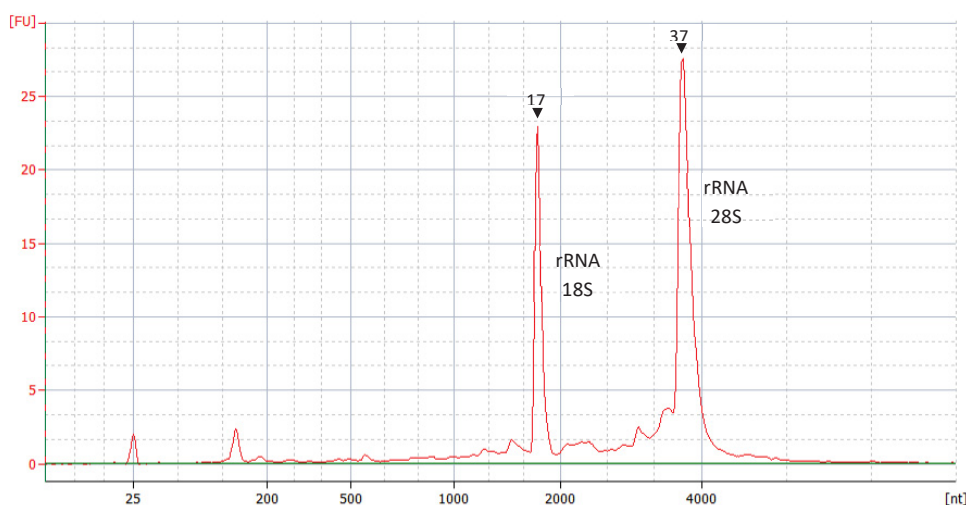
O número de integridade dos RNA (RIN) varia de 0 a 10, em ordem crescente de integridade. O RIN é calculado com um algoritmo do *software* 2100 Expert, levando em conta os picos do rRNA 28S e rRNA 18S e a degradação destes, como observado no gráfico 2. Segundo o protocolo do kit de preparação das bibliotecas, para começar a preparação das bibliotecas de cDNA, as amostras devem ter um RIN maior a 8, e todas as amostras apresentaram um valor de RIN acima de 9,2 (tabela 5), indicando uma ótima quantidade e integridade das amostras.

TABELA 5. QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA TOTAL OBTIDO DE CADA AMOSTRA

Tempo	Célula	Clone	Réplica	Nome	ng/ μ L	Total (μ g)	RIN
0	HeLa	-	A	He_00_A	196	9,8	9,9
0	HeLa	-	B	He_00_B	176	8,8	9,9
0	HeLa	-	C	He_00_C	177	8,85	9,9
0	HeLa	-	D	He_00_D	256	12,8	9,8
0	H9c2	-	A	H9_00_A	71	3,55	10
0	H9c2	-	B	H9_00_B	133	6,65	9,8
0	H9c2	-	C	H9_00_C	85	4,25	10
0	H9c2	-	D	H9_00_D	112	5,6	9,2
6	HeLa	Dm28c	A	He_Dm_06_A	202	10,1	10
6	HeLa	Dm28c	B	He_Dm_06_B	191	9,55	9,8
6	HeLa	Dm28c	C	He_Dm_06_C	171	8,55	10
6	HeLa	Dm28c	D	He_Dm_06_D	230	11,5	10
6	HeLa	CL Brener	A	He_CL_06_A	163	8,15	10
6	HeLa	CL Brener	B	He_CL_06_B	143	7,15	10
6	HeLa	CL Brener	C	He_CL_06_C	196	9,8	10
6	HeLa	CL Brener	D	He_CL_06_D	223	11,15	9,9
6	H9c2	Dm28c	A	H9_Dm_06_A	85	4,25	9,5
6	H9c2	Dm28c	B	H9_Dm_06_B	109	5,45	9,3
6	H9c2	Dm28c	C	H9_Dm_06_C	103	5,15	9,2
6	H9c2	Dm28c	D	H9_Dm_06_D	114	5,7	10
6	H9c2	CL Brener	A	H9_CL_06_A	93	4,65	9,4
6	H9c2	CL Brener	B	H9_CL_06_B	107	5,35	9,4
6	H9c2	CL Brener	C	H9_CL_06_C	98	4,9	9,8
6	H9c2	CL Brener	D	H9_CL_06_D	139	6,95	9,8
24	HeLa	Dm28c	A	He_Dm_24_A	558	27,9	10
24	HeLa	Dm28c	B	He_Dm_24_B	521	26,05	10
24	HeLa	Dm28c	C	He_Dm_24_C	510	25,5	10
24	HeLa	Dm28c	D	He_Dm_24_D	539	26,95	10
24	HeLa	CL Brener	A	He_CL_24_A	493	24,65	10
24	HeLa	CL Brener	B	He_CL_24_B	585	29,25	10
24	HeLa	CL Brener	C	He_CL_24_C	564	28,2	10
24	HeLa	CL Brener	D	He_CL_24_D	503	25,15	9,9
24	H9c2	Dm28c	A	H9_Dm_24_A	214	10,7	9,9
24	H9c2	Dm28c	B	H9_Dm_24_B	217	10,85	10
24	H9c2	Dm28c	C	H9_Dm_24_C	192	9,6	10
24	H9c2	Dm28c	D	H9_Dm_24_D	190	9,5	10
24	H9c2	CL Brener	A	H9_CL_24_A	170	8,5	10
24	H9c2	CL Brener	B	H9_CL_24_B	172	8,6	10
24	H9c2	CL Brener	C	H9_CL_24_C	240	12	9,8
24	H9c2	CL Brener	D	H9_CL_24_D	147	7,35	9,6

FONTE: O autor. LEGENDA: Nome de cada amostra, concentração e quantidade total do RNA total obtido e o índice de integridade (RIN) para cada uma delas.

GRÁFICO 2. EXEMPLO DO ELETROFEROGRAMA DO RNA TOTAL OBTIDO



FONTE: Imagem modificada do *software* 2100 Expert. LEGENDA: O eletroferograma apresenta dois picos intensos, os quais correspondem ao rRNA 18S e rRNA 28S, com tamanhos aproximados de 1.800 pb e 3.800 pb, respectivamente.

5.7 PREPARO DAS BIBLIOTECAS

Considerando-se que a extração de RNA total de todas as amostras cumpriram com a quantidade e o RIN pedidos pelo kit, foram escolhidas apenas as 3 primeiras réplicas para começar com preparo das bibliotecas. Após o preparo das bibliotecas, foi feito um controle de qualidade das amostras, gerando um eletroferograma com a distribuição de tamanhos dos fragmentos de cDNA. Segundo o protocolo do kit, o fragmento mais abundante devia ser aquele que tinha aproximadamente 260 pb. Os fragmentos mais abundantes em todas as amostras ficaram perto de 300 pb, o qual pode ter acontecido pela alta integridade das amostras. A faixa de 200-500 pb envolve a grande maioria dos fragmentos de cDNA (gráfico 3). Portanto, os fragmentos possuíam um comprimento ideal para o sequenciamento.

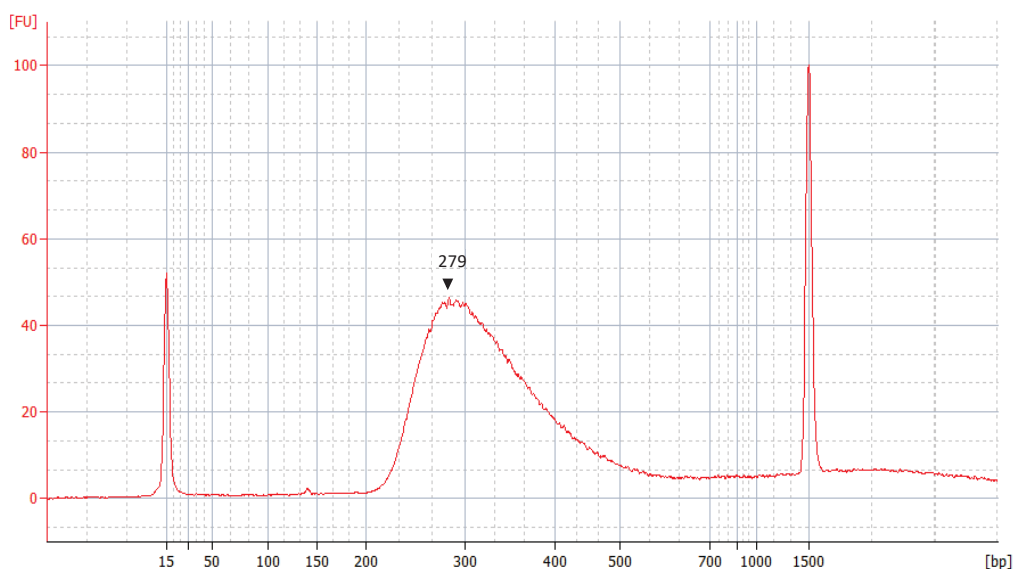
A quantificação da concentração dos cDNA feito com a qPCR deu valores muito altos, quando comparado com os valores gerados pelo 2100 Expert, principalmente das amostras de H9c2 (tabela 6). Além de diferenças significativas entre os valores das triplicatas e os valores entre as amostras, sendo que quase todas elas começaram o preparo das bibliotecas com um valor aproximado de 1,1 μ g. Segundo o protocolo do kit de preparo das amostras, as bibliotecas deviam ter uma concentração na faixa de 10-400 nM antes da sua normalização, valores distantes dos calculados com a qPCR para as amostras de H9c2. Pelos motivos já expostos, foi decidido usar os valores calculados com o programa 2100 Expert.

TABELA 6. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA

	2100 Expert (nM)	qPCR (nM)	Qi do RNA total (ng)
H9_00_A	134.95	689.60	1065
H9_00_B	124.30	1338.57	1064
H9_00_C	129.05	1641.33	1275
H9_Dm_06_A	115.75	1046.60	1020
H9_Dm_06_B	158.40	1872.67	1308
H9_Dm_06_C	218.70	815.67	1236
H9_CL_06_A	213.75	925.47	1116
H9_CL_06_B	137.60	1428.00	1284
H9_CL_06_C	186.60	1321.33	1176
H9_Dm_24_A	186.80	382.20	1284
H9_Dm_24_B	126.90	920.03	1302
H9_Dm_24_C	169.75	1184.50	1152
H9_CL_24_A	177.70	1243.87	1020
H9_CL_24_B	240.00	1426.20	1032
H9_CL_24_C	177.00	3072.33	1440
He_00_A	170.60	265.83	1176
He_00_B	203.75	331.27	1056
He_00_C	214.50	326.23	1062
He_Dm_06_A	210.55	147.83	1212
He_Dm_06_B	251.75	158.53	1146
He_Dm_06_C	195.00	209.68	1026
He_CL_06_A	45.35	87.21	1141
He_CL_06_B	189.60	221.37	1001
He_CL_06_C	206.00	266.40	1372
He_Dm_24_A	108.90	346.10	1116
He_Dm_24_B	154.70	219.93	1042
He_Dm_24_C	115.75	81.58	1020
He_CL_24_A	154.00	134.15	986
He_CL_24_B	141.95	145.02	1170
He_CL_24_C	182.55	272.50	1128

FONTE: O autor. LEGENDA: Os valores apresentados da quantificação pelo programa 2100 Expert e por qPCR representam uma média de duas e três réplicas, respectivamente. Qi, quantidade inicial.

GRÁFICO 3. EXEMPLO DO ELETROFEROGRAMA DOS FRAGMENTOS DE cDNA

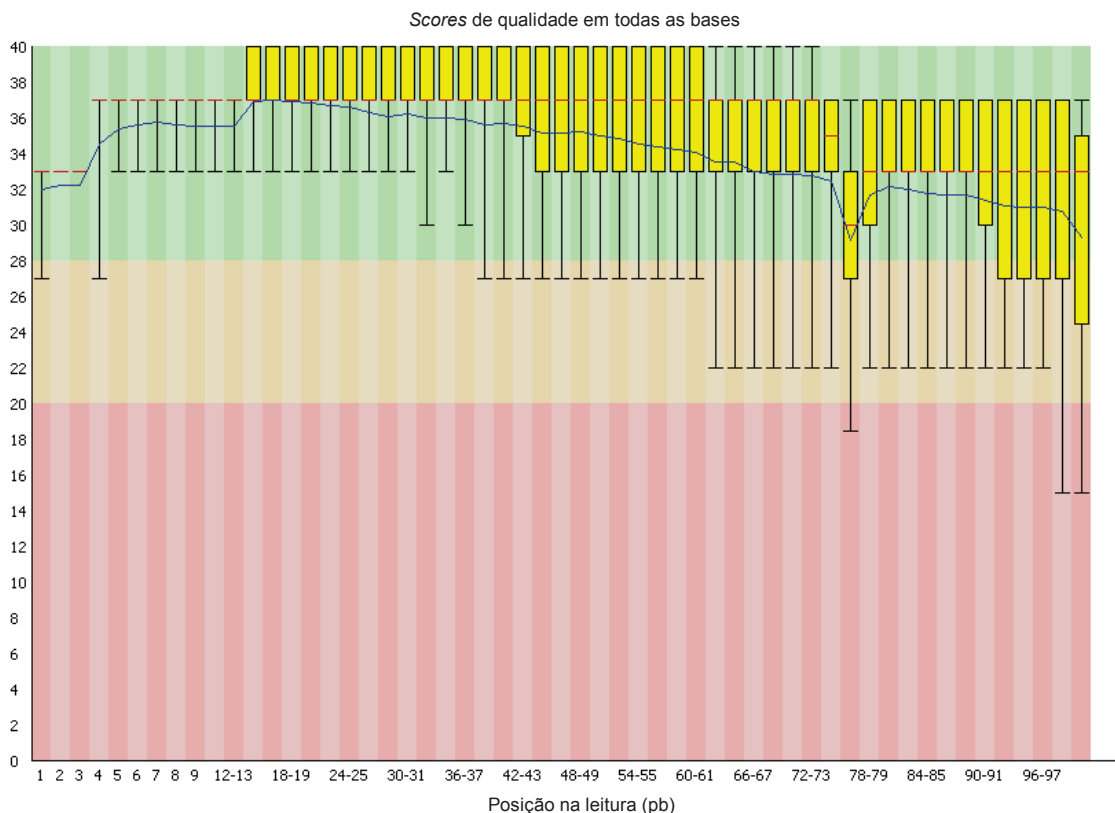


FONTE: Imagem modificada do *software* 2100 Expert. LEGENDA: Eletroferograma da distribuição de tamanhos dos fragmentos de cDNA das bibliotecas. A maior quantidade dos tamanhos de cDNA encontram-se na faixa de 200-500 pb.

5.8 ANÁLISE E MAPEAMENTO DOS DADOS DE RNA-SEQ

O primeiro passo, após obter as leituras do sequenciamento, foi observar a qualidade das leituras. O programa FastQC proporciona um gráfico, mostrando a qualidade de cada posição de todas as leituras. Usando esse programa, foi observado que em todas as amostras os escores da qualidade por cada posição apresenta uma queda no percorrer das posições. Esse fenômeno é normal e acontece pelos sucessivos ciclos na síntese e detecção dos nucleotídeos das moléculas de um mesmo *cluster*. Principalmente nos últimos ciclos dos *clusters*, algumas fitas ficam fora de fase, quer dizer, que apresentam um nucleotídeo diferente às demais fitas, diminuindo o escore de qualidade desse nucleotídeo. Em todas as amostras, as primeiras 70 posições tinham todos o escore de qualidade Phred em uma faixa de qualidade boa ou razoável e apenas umas poucas leituras tinham uma má qualidade nas últimas posições (gráfico 4).

GRÁFICO 4. EXEMPLO DE ESCORE DE QUALIDADE DE PHRED NO FastQC



FONTE: Imagem gerada pelo programa FastQC. LEGENDA: O diagrama de caixa representa os escores de qualidade de Phred para cada posição de todas as leituras (caixa: interquartil, varia de 25 a 75 %; whiskers: 10-90 %; linha vermelha: mediana). A linha azul representa a média dos escores de qualidade de Phred. O fundo do gráfico está dividido em 3 cores dependendo do escore de qualidade: verde, qualidade muito boa; laranja, qualidade razoável e vermelho, má qualidade.

O total de leituras, após a filtragem da Illumina, foi de 479.417.483 para as 30 amostras, as quais depois foram mapeadas. A quantificação do número de leituras de cada amostra é necessária para visualizar a profundidade de cada uma delas e também para normalizar as bibliotecas, para realizar análises posteriores. O número de leituras entre todas as amostras, foi muito variável (gráfico 5). Em geral, as amostras de H9c2 tiveram uma menor quantidade de leituras, que as amostras de HeLa. A mediana das amostras de H9c2 foi de $1,18 \times 10^7$, enquanto das amostras de HeLa foi de $2,05 \times 10^7$, quase o dobro.

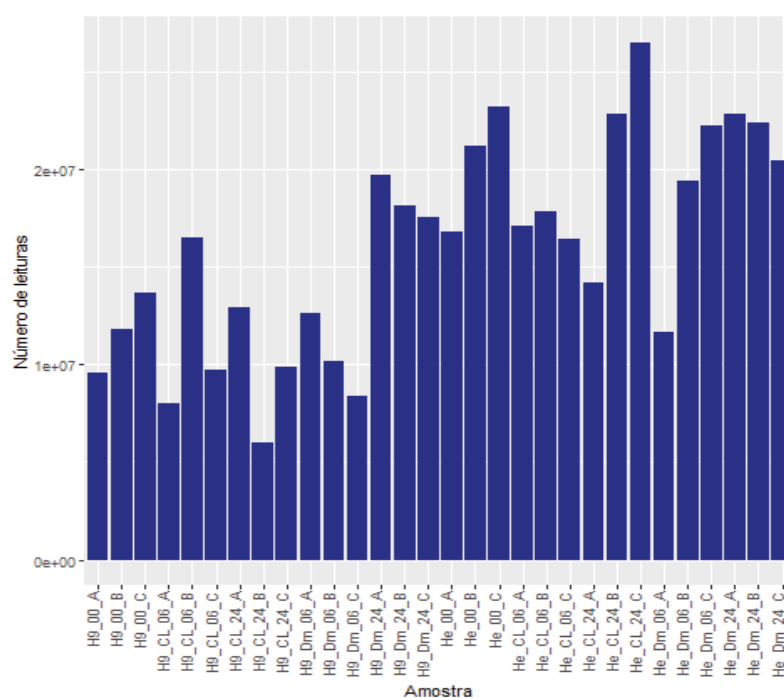
A amostra H9_CL_24_B teve a menor quantidade de leituras, apresentando 5.962.143, enquanto a amostra He_CL_24_C apresentou a maior quantidade de leituras, com 26.479.201. O intuito de leituras para cada amostra era de aproximadamente 25.000.000, o qual não foi atingido pela maioria das amostras. Possivelmente essa diferença tenha ocorrido por erros na quantificação ou no

processo de filtragem das leituras, com uma qualidade baixa. Se for no processo de quantificação, a escolha de usar os dados do programa 2100 Expert foi acertada, pois a quantificação com os dados de qPCR para as amostras de H9c2 foi significativamente maior. Isso significava uma maior diluição das amostras, a qual teria diminuído ainda mais o número de leituras por amostras.

Os tamanhos das leituras se encontraram entre 35 e 101 nucleotídeos. Contudo, mais de 96 % dessas leituras se situavam na faixa de 91-101 nucleotídeos para todas as amostras (tabela 7), indicando tamanhos ótimos para o mapeamento. As leituras com menor tamanho, como 35 nucleotídeos, têm uma maior probabilidade de mapear em mais de um lugar, em comparação com aquelas de maior tamanho. Mesmo assim, a probabilidade de mapear em um lugar único é grande.

Smircich e colaboradores (2015) avaliaram o transcrito de *Trypanosoma cruzi* utilizando a tecnologia de SOLiD, gerando leituras entre 18-50 nucleotídeos. Essas leituras, com um tamanho significativamente menor às nossas, foram mapeadas no genoma do parasito conseguindo detectar modulações gênicas. Portanto, as leituras com tamanhos menores a 101, também foram tomadas em conta para o mapeamento.

GRÁFICO 5. GRÁFICO DE BARRAS DO NÚMERO DE LEITURAS POR AMOSTRA



FONTE: O autor. LEGENDA: Cada barra mostra o número de leituras por cada amostra, evidenciando uma grande variabilidade entre as 30 amostras.

TABELA 7. NÚMERO E TAMANHOS DAS LEITURAS POR AMOSTRA

Amostra	35-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-101	Total de leituras
H9_00_A	0,02 %	0,08 %	0,31 %	0,94 %	2,12 %	96,53 %	9,56 x 10 ⁶
H9_00_B	0,03 %	0,07 %	0,22 %	0,65 %	1,72 %	97,32 %	1,18 x 10 ⁷
H9_00_C	0,04 %	0,09 %	0,27 %	0,78 %	2,04 %	96,78 %	1,37 x 10 ⁷
H9_CL_06_A	0,03 %	0,07 %	0,23 %	0,68 %	1,80 %	97,19 %	8,03 x 10 ⁶
H9_CL_06_B	0,03 %	0,09 %	0,30 %	0,93 %	2,33 %	96,31 %	1,65 x 10 ⁷
H9_CL_06_C	0,03 %	0,07 %	0,22 %	0,67 %	1,78 %	97,23 %	9,68 x 10 ⁶
H9_CL_24_A	0,04 %	0,10 %	0,30 %	0,89 %	2,33 %	96,34 %	1,29 x 10 ⁷
H9_CL_24_B	0,02 %	0,06 %	0,19 %	0,61 %	1,67 %	97,45 %	5,96 x 10 ⁶
H9_CL_24_C	0,03 %	0,06 %	0,18 %	0,54 %	1,44 %	97,75 %	9,86 x 10 ⁶
H9_Dm_06_A	0,04 %	0,08 %	0,22 %	0,60 %	1,51 %	97,55 %	1,26 x 10 ⁷
H9_Dm_06_B	0,03 %	0,07 %	0,23 %	0,68 %	1,78 %	97,22 %	1,02 x 10 ⁷
H9_Dm_06_C	0,03 %	0,07 %	0,22 %	0,68 %	1,85 %	97,16 %	8,37 x 10 ⁶
H9_Dm_24_A	0,03 %	0,07 %	0,21 %	0,62 %	1,62 %	97,45 %	1,97 x 10 ⁷
H9_Dm_24_B	0,03 %	0,07 %	0,20 %	0,60 %	1,59 %	97,51 %	1,81 x 10 ⁷
H9_Dm_24_C	0,03 %	0,07 %	0,19 %	0,57 %	1,52 %	97,63 %	1,76 x 10 ⁷
He_00_A	0,01 %	0,04 %	0,14 %	0,49 %	1,44 %	97,89 %	1,68 x 10 ⁷
He_00_B	0,01 %	0,02 %	0,07 %	0,22 %	0,64 %	99,04 %	2,12 x 10 ⁷
He_00_C	0,00 %	0,01 %	0,05 %	0,15 %	0,46 %	99,32 %	2,32 x 10 ⁷
He_CL_06_A	0,01 %	0,03 %	0,09 %	0,27 %	0,76 %	98,83 %	1,71 x 10 ⁷
He_CL_06_B	0,01 %	0,02 %	0,06 %	0,18 %	0,50 %	99,24 %	1,78 x 10 ⁷
He_CL_06_C	0,01 %	0,01 %	0,05 %	0,16 %	0,48 %	99,30 %	1,64 x 10 ⁷
He_CL_24_A	0,01 %	0,02 %	0,05 %	0,15 %	0,45 %	99,33 %	1,42 x 10 ⁷
He_CL_24_B	0,01 %	0,02 %	0,06 %	0,19 %	0,57 %	99,16 %	2,28 x 10 ⁷
He_CL_24_C	0,01 %	0,02 %	0,08 %	0,25 %	0,73 %	98,91 %	2,65 x 10 ⁷
He_Dm_06_A	0,03 %	0,08 %	0,26 %	0,81 %	2,14 %	96,68 %	1,16 x 10 ⁷
He_Dm_06_B	0,00 %	0,01 %	0,03 %	0,09 %	0,26 %	99,60 %	1,94 x 10 ⁷
He_Dm_06_C	0,01 %	0,01 %	0,03 %	0,10 %	0,29 %	99,56 %	2,22 x 10 ⁷
He_Dm_24_A	0,02 %	0,04 %	0,11 %	0,35 %	1,01 %	98,48 %	2,28 x 10 ⁷
He_Dm_24_B	0,01 %	0,02 %	0,06 %	0,20 %	0,62 %	99,09 %	2,24 x 10 ⁷
He_Dm_24_C	0,01 %	0,01 %	0,04 %	0,13 %	0,37 %	99,44 %	2,05 x 10 ⁷

FONTE: O autor. LEGENDA: O tamanho das leituras que vão de 35 até 101 nucleotídeos é apresentado em faixas. O número de leituras para cada faixa é mostrado em porcentagem.

O mapeamento das leituras foi realizado nos respectivos genomas de referências. As células hospedeiras utilizadas foram HeLa e H9c2, pertencentes às espécies *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus*, respectivamente. Os genomas de ambas espécies estão disponíveis no site da Universidade de California Santa Cruz (UCSC). Por outro lado, os parasitos usados são de dois clones diferentes que, além disso, pertencem a diferentes DTUs. Embora ambos parasitos pertençam à mesma espécie "*Trypanosoma cruzi*", as diferentes DTUs possuem diferenças nos seus genomas.

O clone Dm28c pertence à DTU I, a qual é considerada uma linhagem antiga (Zingales *et al.*, 2012). O genoma de referência usado para esse clone foi de Dm28c, nomeado como Tcruzicruzi no banco de dados do TriTrypDB. O sequenciamento desse clone foi feito usando a tecnologia de PacBio. Essa tecnologia permite obter leituras mais longas, que é uma vantagem para um organismo como *T. cruzi*, que possui sequências repetidas em mais de 50 % do seu genoma. O genoma sequenciado com PacBio apresenta apenas 1.030 *scaffolds*, quantidade baixa quando comparado com o sequenciamento com outras tecnologias.

O genoma de CL Brener foi o primeiro genoma de *T. cruzi* a ser sequenciado, no ano 2005 (El-Sayed *et al.*, 2005a). CL Brener é um clone híbrido pertencente à DTU VI (Sturm *et al.*, 2003), que devido a sua natureza híbrida, seu genoma teve que ser concatenado, unindo os diferentes arquivos das diferentes representações genômicas disponíveis no TriTrypDB (*Esmeraldo-like*, *Non-Esmeraldo-like* e *Unassigned*).

Após o mapeamento dos respectivos genomas com o programa Bowtie 2, foi analisado o número de leituras, por amostra, que foram mapeados nos respectivos genomas. Nas amostras de H9c2, uma média de 7 % das leituras não foram mapeadas nem no genoma do rato, nem do parasito. No caso da célula HeLa, uma média de 10,6 % não foram mapeadas em nenhum dos genomas, como observado na tabela 8. Observa-se também uma maior quantidade de leituras não mapeadas nas amostras de H9c2 "B" que foram sequenciadas na mesma canaleta, o que indica uma menor eficiência, no sequenciamento, nessa canaleta. O aumento de número de leituras não mapeadas em HeLa, pode ser devido à sua natureza cancerígena, visto que essa célula imortal possui um genoma instável, apresentando indels, variantes de único nucleotídeo e translocações intercromosomais, quando comparado com o genoma humano não cancerígeno (Landry *et al.*, 2013).

TABELA 8. MAPEAMENTOS DAS LEITURAS NOS SEUS GENOMAS

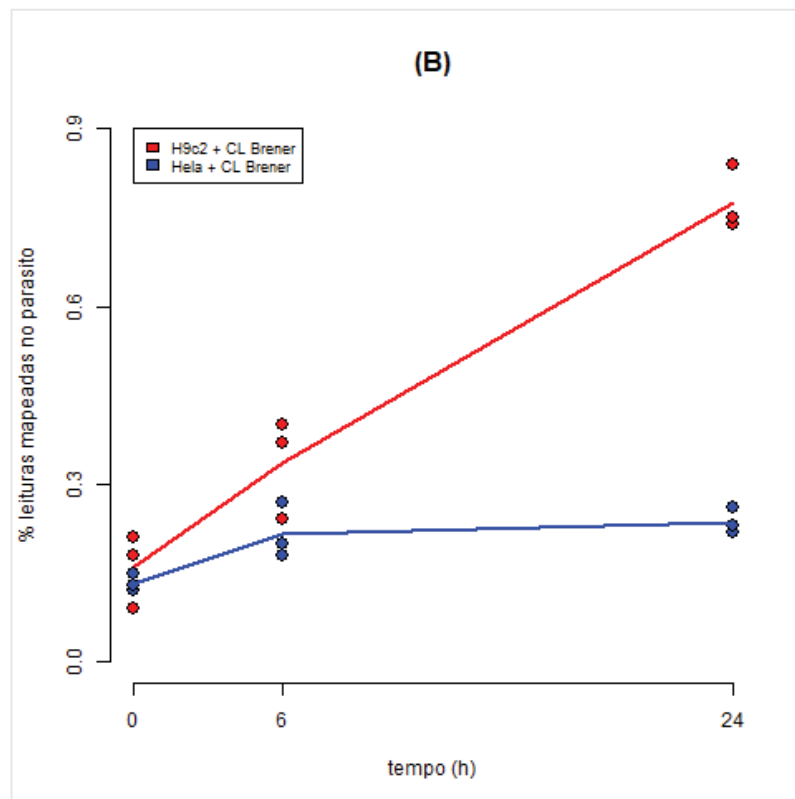
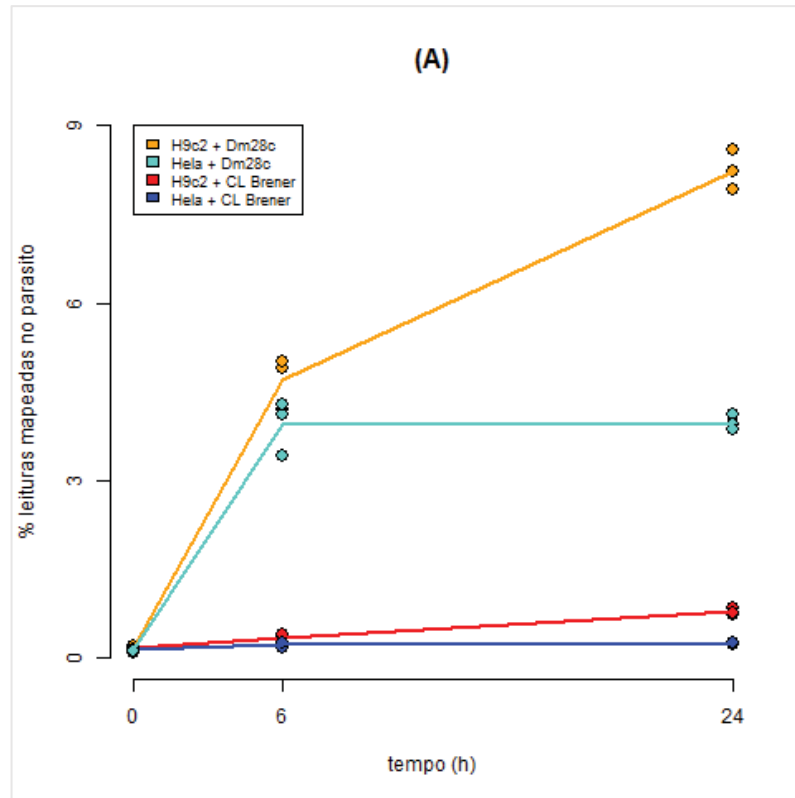
Amostra	Total de leituras	Mapeamento em mamífero	Mapeamento em parasito	Não mapearam
H9_00_A	9,56 x 10 ⁶	94,64 %	0,09 %	5,27 %
H9_00_B	1,18 x 10 ⁷	90,86 %	0,18 %	8,96 %
H9_00_C	1,37 x 10 ⁷	94,13 %	0,21 %	5,65 %
H9_CL_06_A	8,03 x 10 ⁶	93,88 %	0,37 %	5,75 %
H9_CL_06_B	1,65 x 10 ⁷	90,75 %	0,24 %	9 %
H9_CL_06_C	9,68 x 10 ⁶	93,45 %	0,4 %	6,14 %
H9_CL_24_A	1,29 x 10 ⁷	93,32 %	0,84 %	5,84 %
H9_CL_24_B	5,96 x 10 ⁶	90,2 %	0,74 %	9,06 %
H9_CL_24_C	9,86 x 10 ⁶	93,07 %	0,75 %	6,18 %
H9_Dm_06_A	1,26 x 10 ⁷	88,85 %	4,9 %	6,25 %
H9_Dm_06_B	1,02 x 10 ⁷	86,35 %	4,2 %	9,45 %
H9_Dm_06_C	8,37 x 10 ⁶	88,89 %	5,02 %	6,1 %
H9_Dm_24_A	1,97 x 10 ⁷	85,61 %	8,22 %	6,17 %
H9_Dm_24_B	1,81 x 10 ⁷	81,83 %	7,92 %	10,25 %
H9_Dm_24_C	1,76 x 10 ⁷	85,18 %	8,58 %	6,24 %
He_00_A	1,68 x 10 ⁷	91,04 %	0,15 %	8,81 %
He_00_B	2,12 x 10 ⁷	87,84 %	0,12 %	12,04 %
He_00_C	2,32 x 10 ⁷	88,63 %	0,13 %	11,23 %
He_CL_06_A	1,71 x 10 ⁷	91,38 %	0,2 %	8,42 %
He_CL_06_B	1,78 x 10 ⁷	87,61 %	0,18 %	12,21 %
He_CL_06_C	1,64 x 10 ⁷	88,14 %	0,27 %	11,59 %
He_CL_24_A	1,42 x 10 ⁷	90,85 %	0,22 %	8,93 %
He_CL_24_B	2,28 x 10 ⁷	87,89 %	0,23 %	11,88 %
He_CL_24_C	2,65 x 10 ⁷	89,2 %	0,26 %	10,54 %
He_Dm_06_A	1,16 x 10 ⁷	85,96 %	4,13 %	9,91 %
He_Dm_06_B	1,94 x 10 ⁷	84,53 %	3,41 %	12,06 %
He_Dm_06_C	2,22 x 10 ⁷	85,69 %	4,29 %	10,02 %
He_Dm_24_A	2,28 x 10 ⁷	87,92 %	4,11 %	7,97 %
He_Dm_24_B	2,24 x 10 ⁷	84,19 %	3,95 %	11,86 %
He_Dm_24_C	2,05 x 10 ⁷	85,15 %	3,87 %	10,97 %

FONTE: O autor. LEGENDA: Dados mostrados de um mapeamento feito com o programa HiSat 2 (versão 2.1.0) (Kim *et al.*, 2015), das mesmas amostras.

A porcentagem de leituras mapeadas no parasito na célula H9c2, mostram um incremento entre 6 e 24 horas. O incremento mais evidente é manifestado na amostra infectada com o clone Dm28c, a qual exibe uma porcentagem média de 4,71 % no tempo de 6 horas e 8,24 % em 24 horas. Com a célula H9c2 infectada com CL Brener, também foi evidenciado esse aumento, passando de 0,34 % em 6 horas para 0,78 % em 24 horas, como observado no gráfico 6. Esse aumento na porcentagem demonstra um aumento no número de parasitos, entre 6 e 24 horas. No caso da célula HeLa, a infecção com o clone Dm28c mostra uma média na porcentagem de 3,94 % em 6 horas e 3,98 % em 24 horas; e na infecção com CL Brener, mostra 0,22 % em 6 horas e 0,24 % em 24 horas, não evidenciando um aumento significativo, como observado no gráfico 6. Se compararmos a porcentagem de leituras mapeadas nos genomas dos parasitos entre os clones, tanto na infecção em H9c2, quanto em HeLa, nos dois tempos avaliados, o clone Dm28c apresenta uma maior porcentagem que o clone CL Brener, como observado no gráfico 6. O número de parasitos intracelulares, nas infecções com CL Brener, aumentou na célula de H9c2, enquanto na célula HeLa parece se manter entre 6 e 24 hpi (gráfico 6B).

Relacionando os dados das imagens de alto conteúdo com a porcentagem de leituras mapeadas nos genomas dos parasitos, confirmamos que as infecções com o clone Dm28c apresentaram uma maior quantidade de parasitos intracelulares, independente da célula hospedeira. Além do mais, de 6 para 24 hpi, observa-se um aumento na porcentagem de leituras mapeadas no parasito, na célula H9c2, independente do clone usado. Isso confirmaria a hipótese de que não existe uma verdadeira redução no número de células infectadas, senão que a porcentagem foi reduzida pelo aumento das células não infectadas ou pelos parâmetros usados nas medições.

GRÁFICO 6. LEITURAS MAPEADAS NO PARASITO EM CADA TEMPO



FONTE: O autor. LEGENDA: (A) Porcentagem de leituras mapeadas no genoma do parasito das células H9c2 e HeLa, infectadas com os clones Dm28c e CL Brener nos tempos de 6 e 24 horas. (B) Porcentagem de leituras mapeadas no genoma do parasito das células H9c2 e HeLa infectadas com o clone CL Brener nos tempos 6 e 24 horas.

5.9 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS

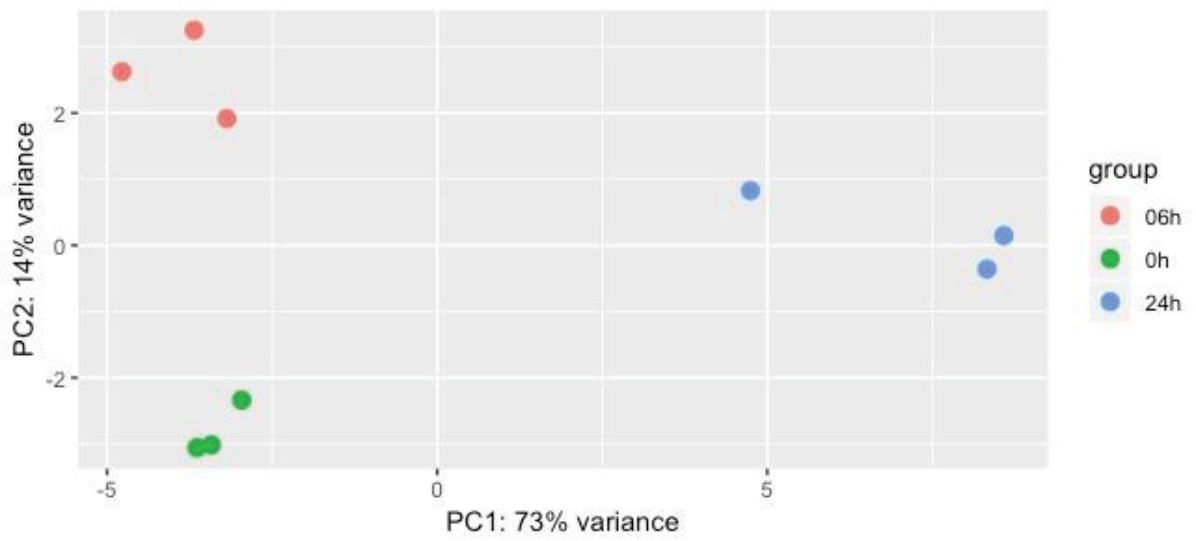
Para visualizar o nível de variação entre as réplicas e as diferentes condições ao longo do tempo, foram utilizadas as análises de correlação: análise de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico baseado em distâncias euclidianas. A PCA é um procedimento matemático que permite transformar os dados, permitindo a sua visualização em dimensões mais baixas. Portanto, pode-se avaliar visualmente, semelhanças e diferenças entre eles. O agrupamento hierárquico baseado em distâncias euclidianas é um algoritmo matemático que agrupa as amostras, refletindo similaridades entre amostras de um mesmo grupo e diferenças entre os grupos.

O modelo de infecção CL Brener-HeLa mostrou consistência entre as réplicas, revelando similaridade entre elas e diferenças entre os diferentes tempos. O tempo de 6 hpi foi mais similar ao controle que o tempo de 24 hpi, como observado nos gráficos 7 e 11. No gráfico 7, apenas uma amostra de 24 hpi encontra-se um pouco afastada das outras; ainda assim, apresenta uma maior diferença com os outros grupos.

O gráfico 8 de PCA mostra uma grande dispersão no tempo de 6 hpi para o modelo Dm28c-HeLa. Uma amostra de 6 hpi aparece mais próxima das amostras controles que do grupo de 6 hpi. Mesmo assim, encontra-se em um quadrante diferentes dos controles. Isso pode indicar uma baixa porcentagem de células infectadas, em comparação com as outras amostras de 6 hpi. O gráfico 12 confirma o observado no PCA, colocando essa amostra como atípica. Contudo, essa amostra apresenta uma maior similaridade com o grupo de 6 hpi e será avaliada nas análises posteriores.

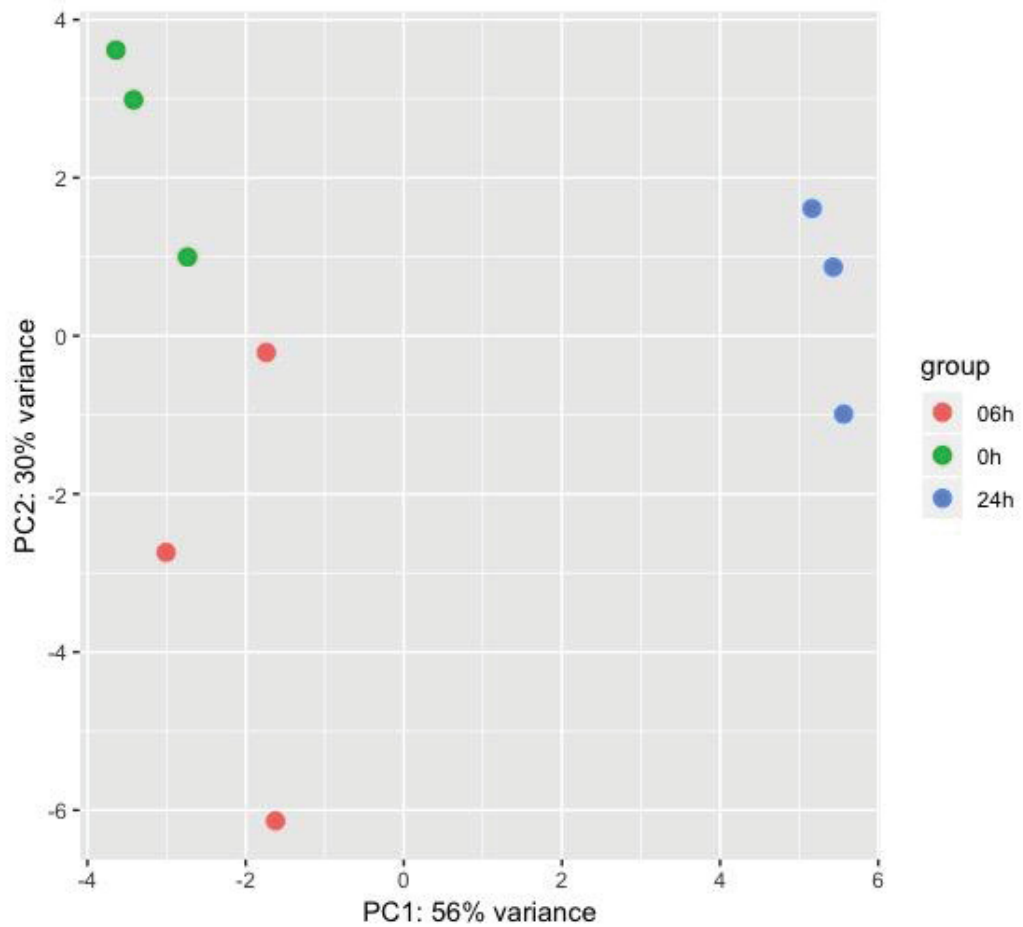
Os modelos de infecção Dm28c-H9c2 e CL Brener-H9c2 apresentaram uma grande similaridade nas réplicas deles e diferenças notáveis entre grupos. Nos gráficos 9 e 10 de PCA, observa-se as amostras de cada tempo bem agrupadas, e uma grande diferença entre o tempo de 24 hpi em relação ao controle, enquanto o tempo de 6 hpi ficou mais perto do controle e mais afastado de 24 hpi. Nos gráficos 13 e 14, o agrupamento de cada tempo é notório, com uma maior relação entre o tempo de 6 hpi e o controle. Analisando visualmente os gráficos, infere-se que há uma similaridade nas respostas da célula H9c2, aos clones Dm28c e CL Brener.

GRÁFICO 7. PCA DA CÉLULA HeLa INFECTADA COM CL Brener



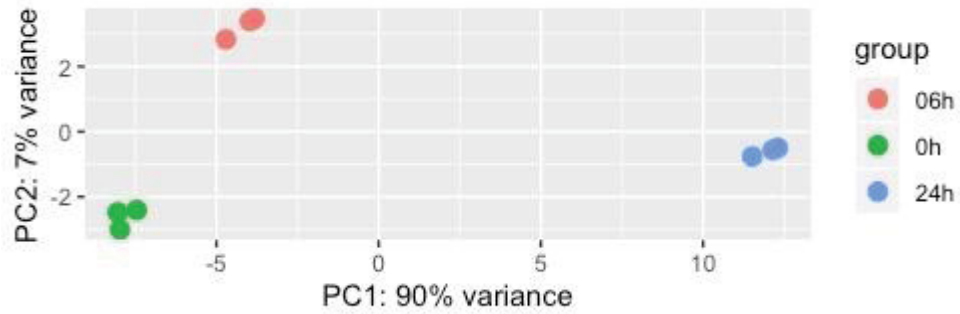
FONTE: O autor. LEGENDA: variance, variância; group, grupo.

GRÁFICO 8. PCA DA CÉLULA HeLa INFECTADA COM Dm28c



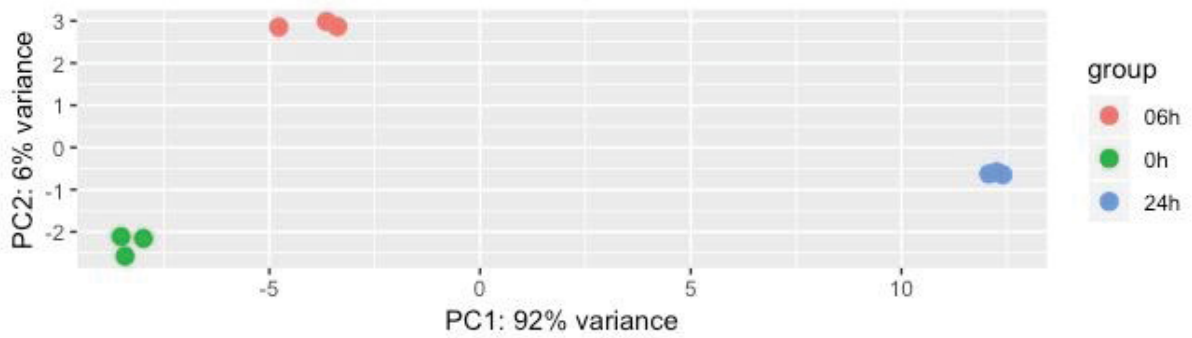
FONTE: O autor. LEGENDA: variance, variância; group, grupo.

GRÁFICO 9. PCA DA CÉLULA H9c2 INFECTADA COM CL Brener



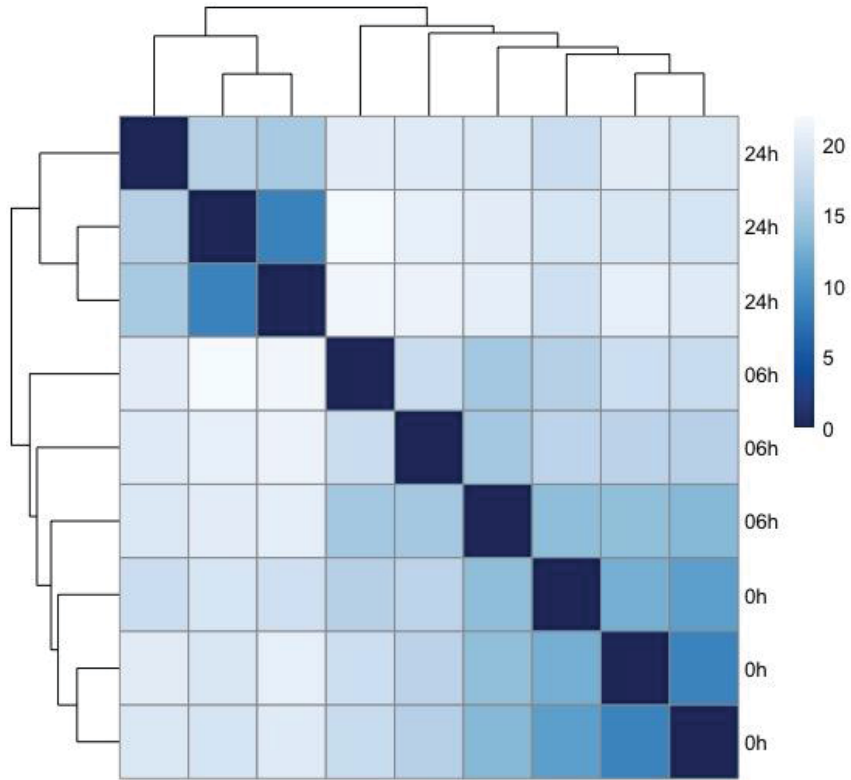
FONTE: O autor. LEGENDA: variance, variância; group, grupo.

GRÁFICO 10. PCA DA CÉLULA H9c2 INFECTADA COM Dm28c



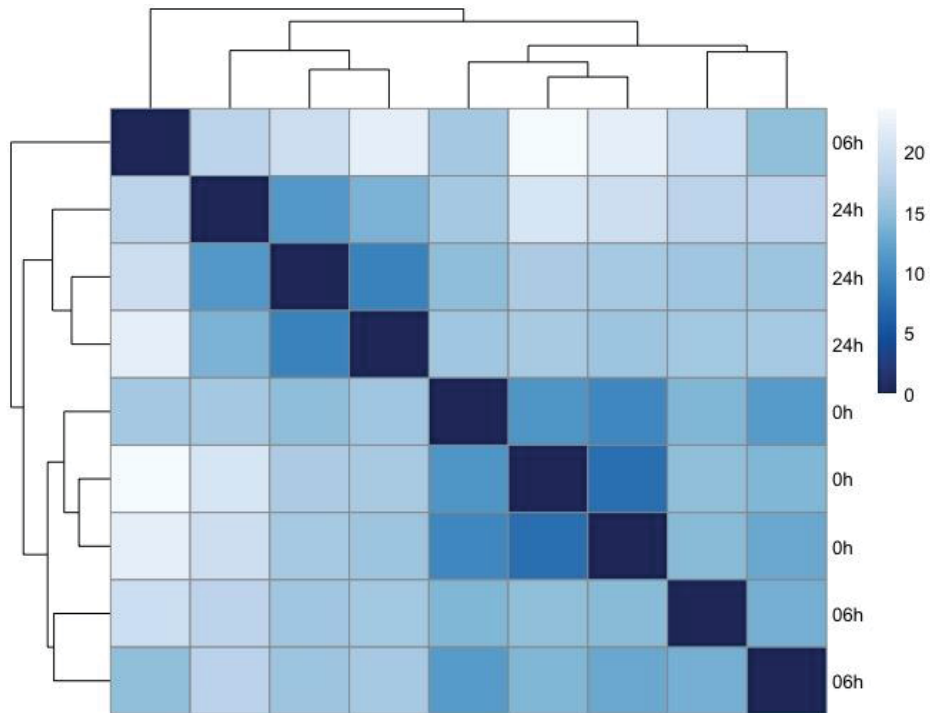
FONTE: O autor. LEGENDA: variance, variância; group, grupo.

GRÁFICO 11. MAPA DE CALOR DE HeLa INFECTADA COM CL Brener



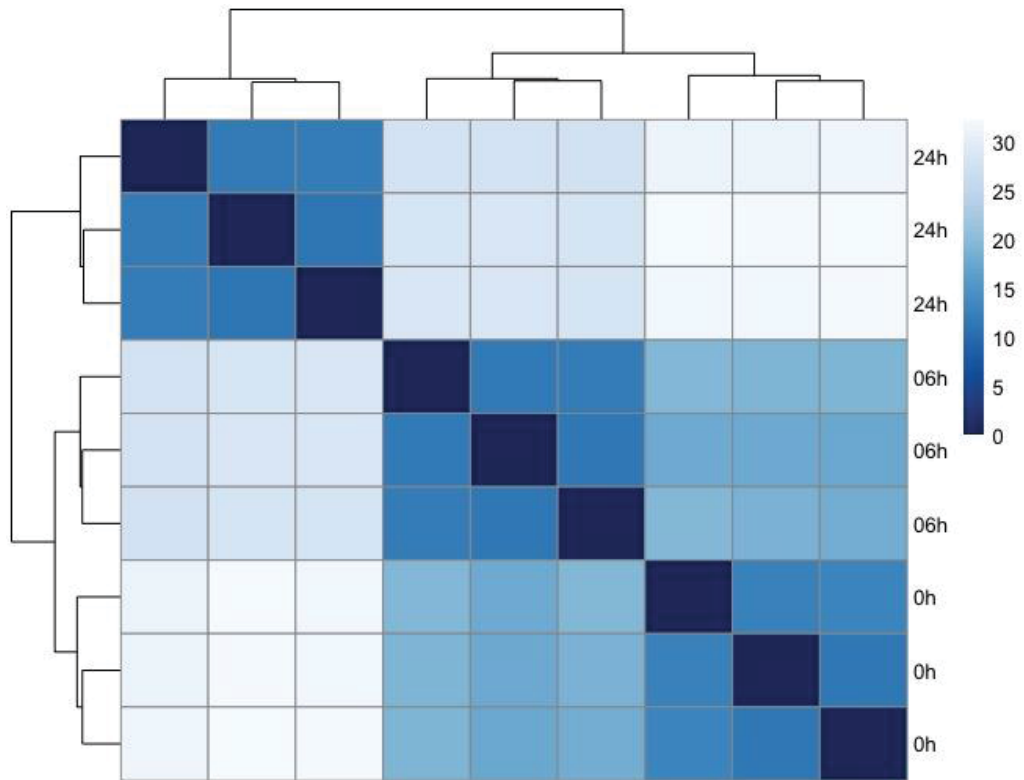
FONTE: O autor. LEGENDA: Mapa de calor mostrando a distância Euclidiana entre as amostras.

GRÁFICO 12. MAPA DE CALOR DE HeLa INFECTADA COM Dm28c



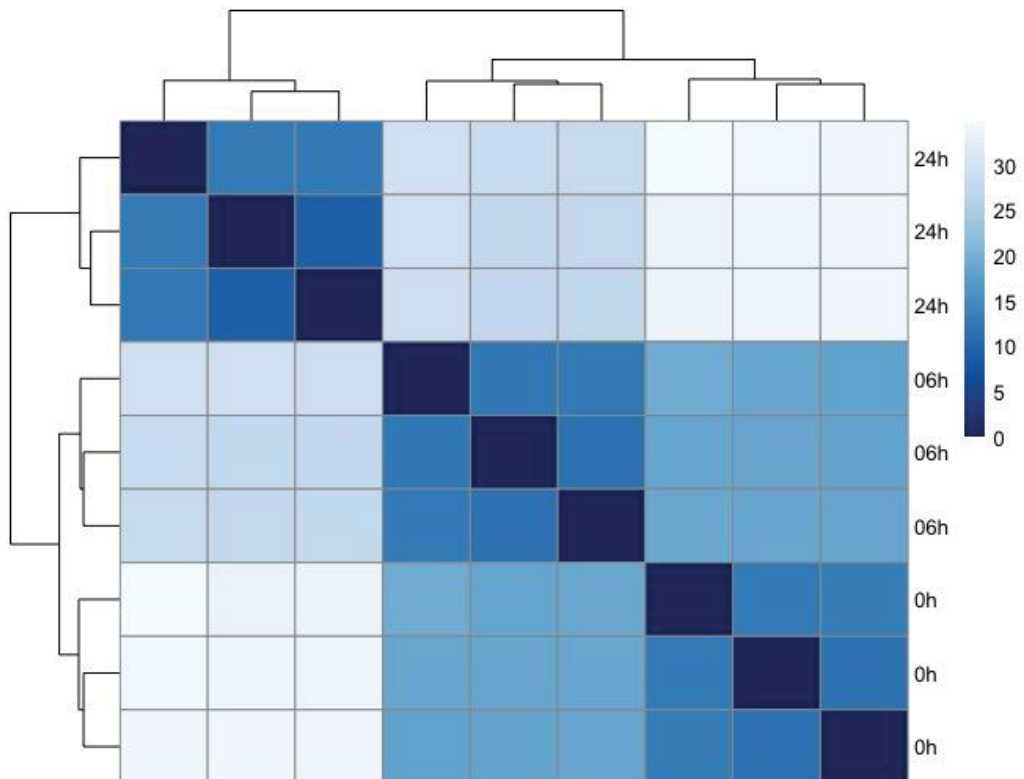
FONTE: O autor. LEGENDA: Mapa de calor mostrando a distância Euclidiana entre as amostras.

GRÁFICO 13. MAPA DE CALOR DE H9c2 INFECTADA COM CL Brener



FONTE: O autor. LEGENDA: Mapa de calor mostrando a distância Euclidiana entre as amostras.

GRÁFICO 14. MAPA DE CALOR DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c



FONTE: O autor. LEGENDA: Mapa de calor mostrando a distância Euclidiana entre as amostras.

5.10 ANÁLISES DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEG)

A expressão diferencial dos genes foi avaliada usando o pacote edgeR, que gera uma tabela com genes que foram detectados como expressos, comparando cada tempo em relação ao controle. Foram geradas 3 tabelas para cada modelo de infecção *T. cruzi*-célula mamífera: 00 hpi vs 06 hpi, 00 hpi vs 24 hpi e 06 hpi vs 24 hpi. O primeiro tempo de cada tabela, indica o tempo de referência.

Cada tabela mostra os genes que foram expressos, sua modulação em relação ao controle, mediante o *fold-change*, e valores estatísticos como p-valor e FDR (*False Discovery Rate*). As tabelas geradas por edge R mostram que a célula HeLa teve proximadamente 15.000 genes detectados e quantificados, enquanto a célula H9c2 teve aproximadamente, 12.000.

Para obter uma lista de DEG com uma menor quantidade de falsos positivos, utilizamos dois parâmetros para filtrar a lista de genes obtidos com o edgeR. O primeiro parâmetro foi $FDR < 0,05$, garantindo um máximo de 5 % de falsos positivos e o segundo parâmetro foi $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$, para ter uma lista com genes que tenham uma significância biológica.

Na lista de DEG gerada, o número de DEG foi mais baixo nas amostras de 6 hpi que nas de 24 hpi, independente da célula hospeira e do clone. Na célula HeLa infectada com CL Brener, o número de DEG em 6 hpi foi de 24, aumentando para 237 em 24 hpi. A célula HeLa infectada com Dm28c apresentou 40 DEG em 6 hpi e 256 em 24 hpi. No caso da célula H9c2, foi detectada uma maior quantidade de genes regulados. Na infecção com CL Brener, foram detectados 166 DEG em apenas 6 hpi e 1.218, em 24 hpi. O número de DEG na célula H9c2 infectada com Dm28c foi de 164 em 6 hpi e 1.447, em 24 hpi (tabela 9).

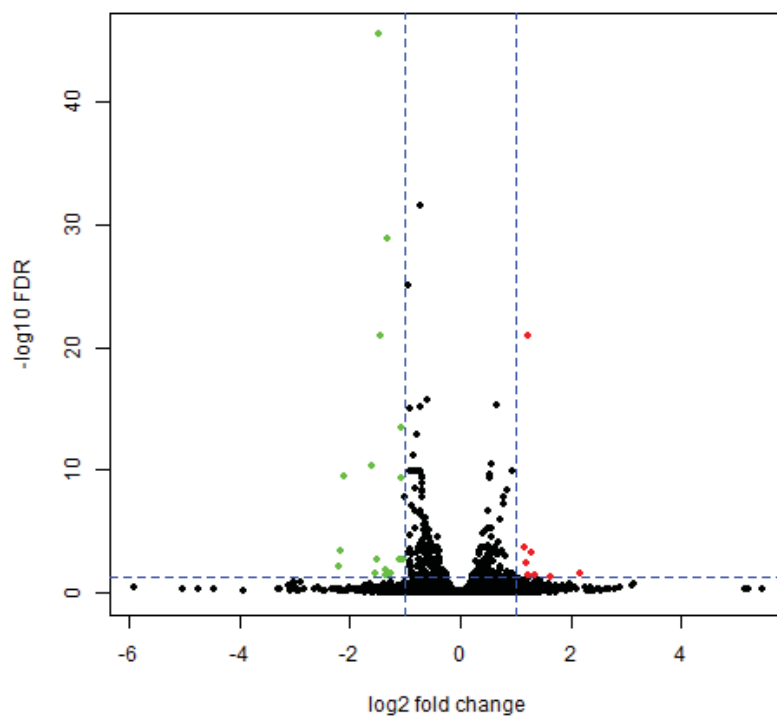
TABELA 9. NÚMERO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEG)

	DEG	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
HeLa_CL_00vs06	24	8	16
HeLa_CL_00vs24	237	68	169
HeLa_CL_06vs24	177	51	126
HeLa_Dm_00vs06	40	21	19
HeLa_Dm_00vs24	256	60	196
HeLa_Dm_06vs24	120	48	72
H9c2_CL_00vs06	166	70	96
H9c2_CL_00vs24	1.218	661	557
H9c2_CL_06vs24	939	479	460
H9c2_Dm_00vs06	164	71	93
H9c2_Dm_00vs24	1.447	745	702
H9c2_Dm_06vs24	818	378	440

FONTE: O autor.

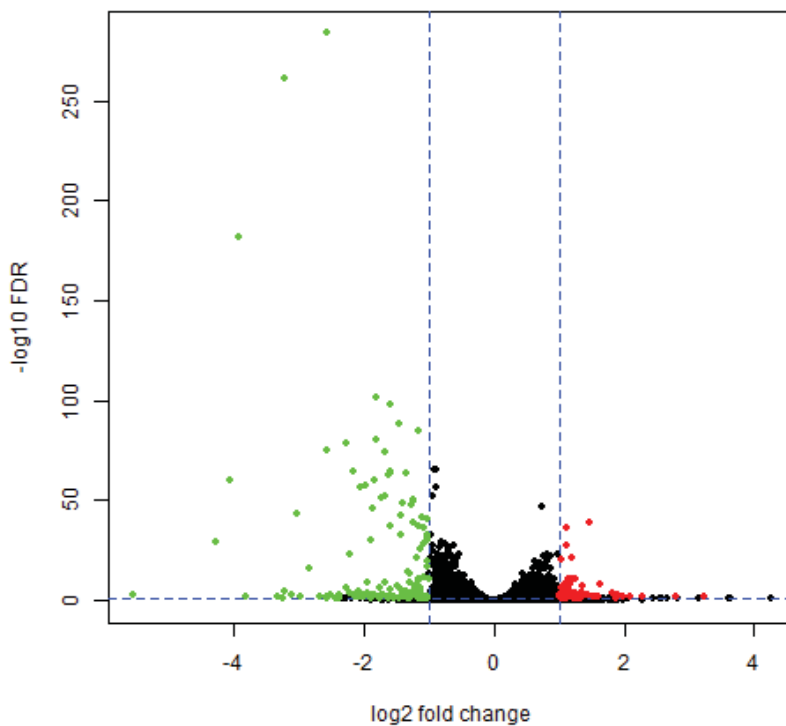
Os genes diferencialmente expressos para cada tempo foram mostrados em gráficos Volcano. Esse gráfico distribui os genes em duas dimensões: o eixo horizontal, que representa o $\log_2 fold-change$ para deixar as variações positivas e negativas equidistantes e o eixo vertical, que representa a significância estatística usando o $-\log_{10} p$ -valor para aumentar o valor do eixo, enquanto diminui o p-valor. Nos gráficos Volcano, a linha horizontal indica o ponto de corte estatístico (p-valor = 0,05). A linha vertical direita indica limite dos genes regulados positivamente ($\log_2 fold-change \geq 1$), a sua direita. A linha vertical esquerda indica limite dos genes regulados negativamente ($\log_2 fold-change \leq -1$) a sua esquerda. Em geral, pode-se observar nos gráficos, que enquanto aumenta a magnitude da mudança no gene, diminui a significância estatística.

GRÁFICO 15. VOLCANO HeLa - CL Brener (0 hpi vs 6 hpi)



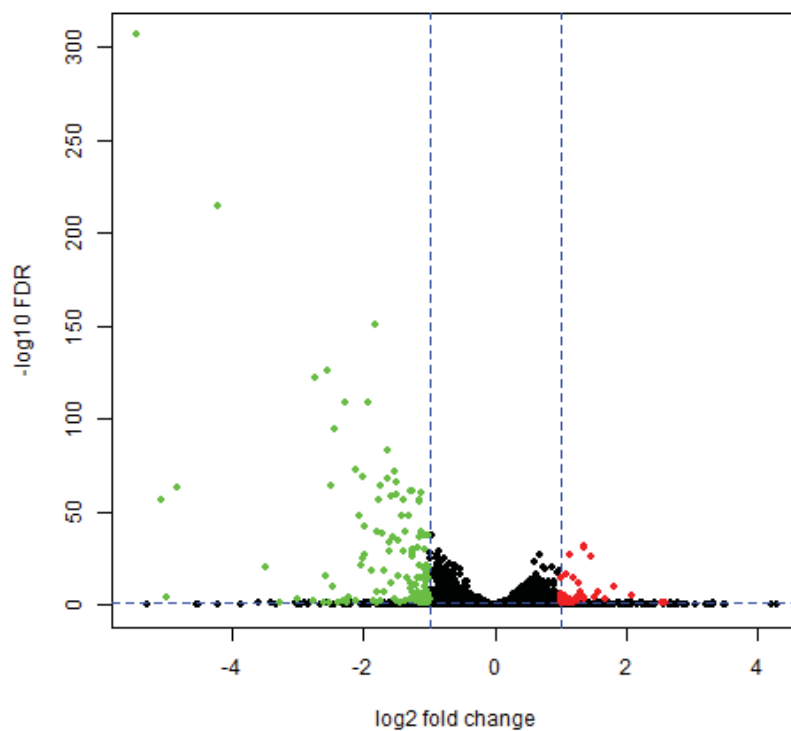
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (8); pontos verdes, genes regulados negativamente (16); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 16. VOLCANO HeLa - CL Brener (0 hpi vs 24 hpi)



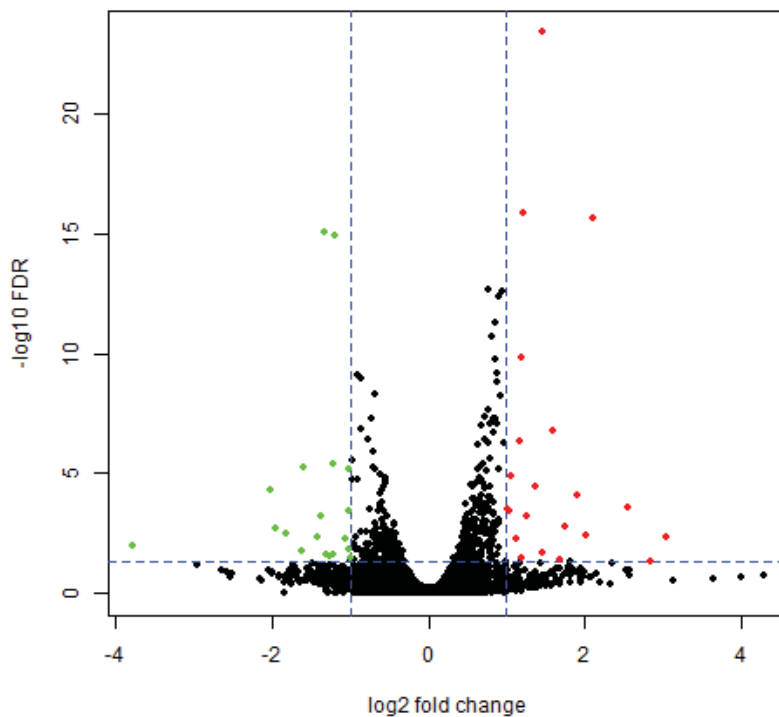
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (68); pontos verdes, genes regulados negativamente (169); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 17. VOLCANO HeLa - CL Brener (6 hpi vs 24 hpi)



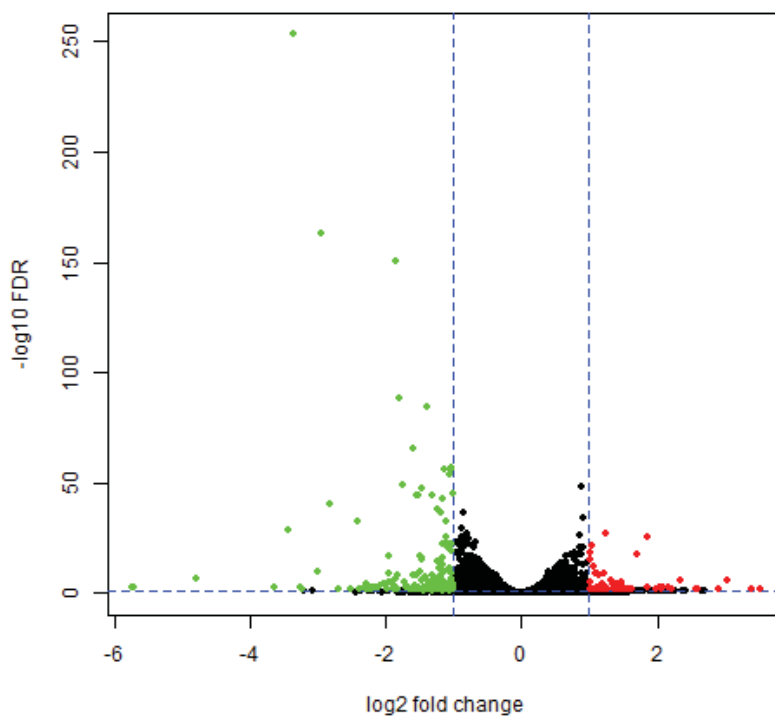
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (51); pontos verdes, genes regulados negativamente (126); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 18. VOLCANO HeLa – Dm28c (0 hpi vs 6 hpi)



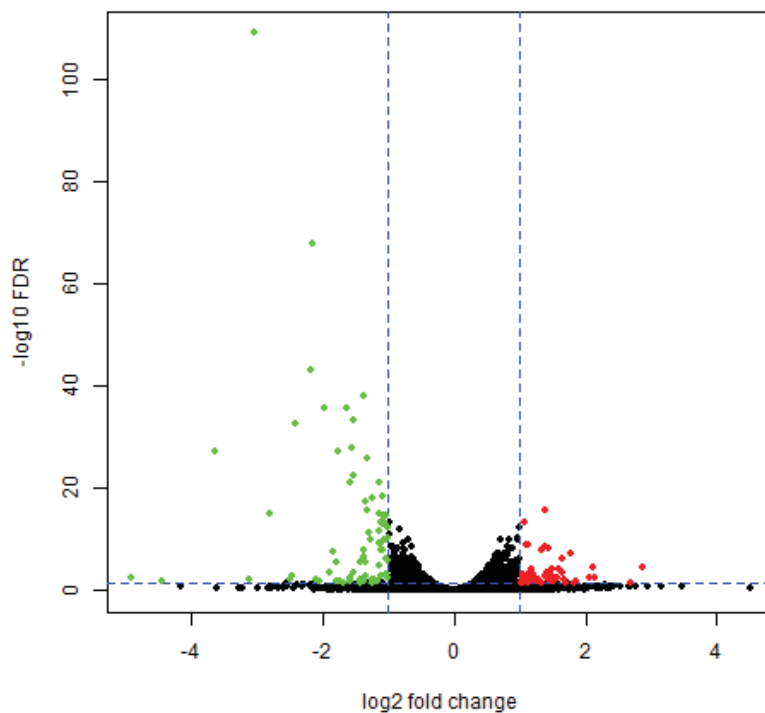
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (21); pontos verdes, genes regulados negativamente (19); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 19. VOLCANO HeLa – Dm28c (0 hpi vs 24 hpi)



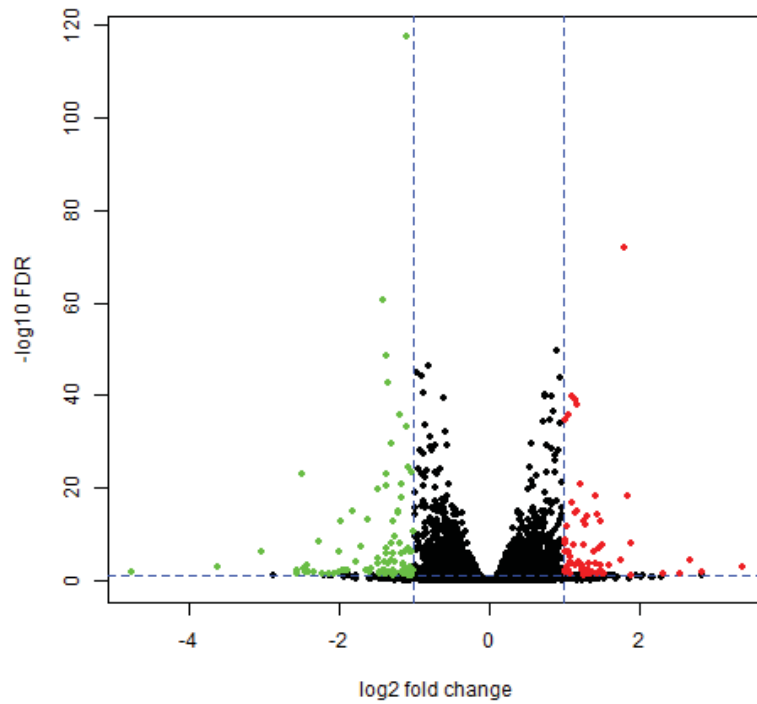
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (60); pontos verdes, genes regulados negativamente (196); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 20. VOLCANO HeLa – Dm28c (6 hpi vs 24 hpi)



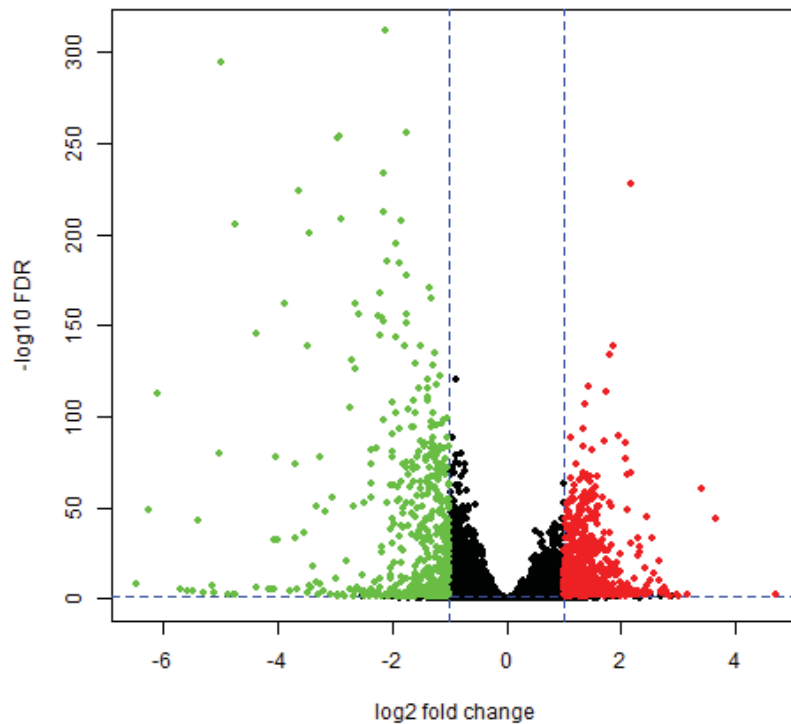
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (48); pontos verdes, genes regulados negativamente (72); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 21. VOLCANO H9c2 - CL Brener (0 hpi vs 6 hpi)



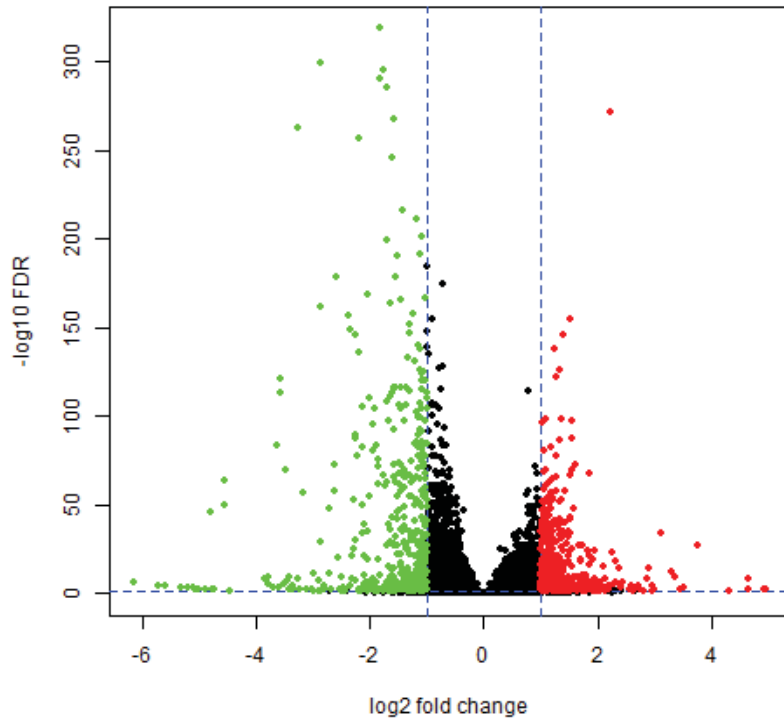
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (70); pontos verdes, genes regulados negativamente (96); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 22. VOLCANO H9c2 - CL Brener (0 hpi vs 24 hpi)



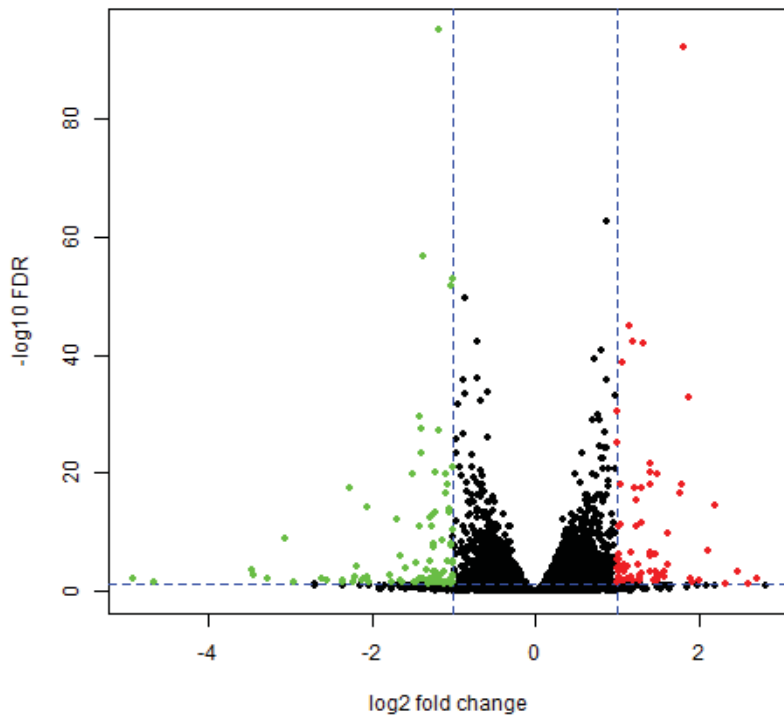
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (661); pontos verdes, genes regulados negativamente (557); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 23. VOLCANO H9c2 - CL Brener (6 hpi vs 24 hpi)



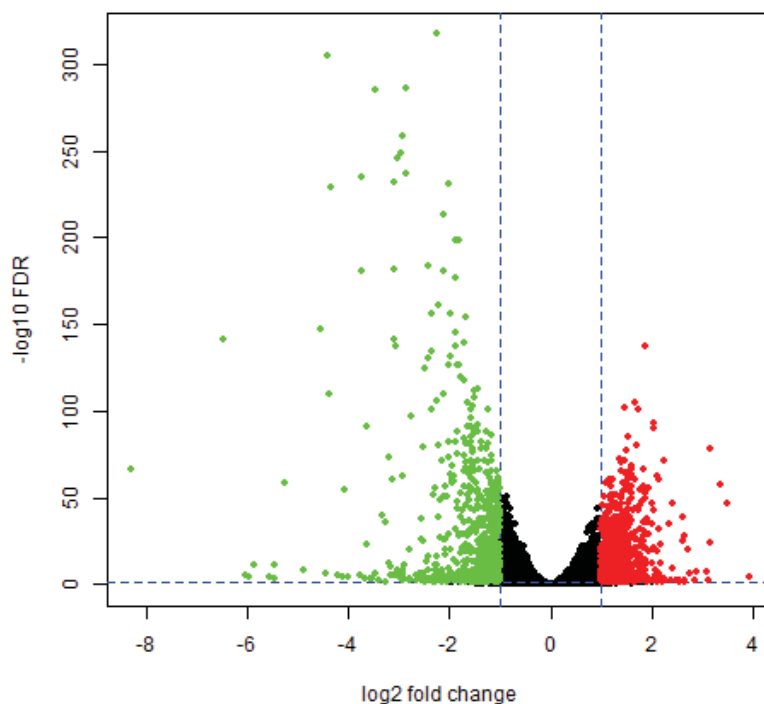
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (479); pontos verdes, genes regulados negativamente (460); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 24. VOLCANO H9c2 – Dm28c (0 hpi vs 6 hpi)



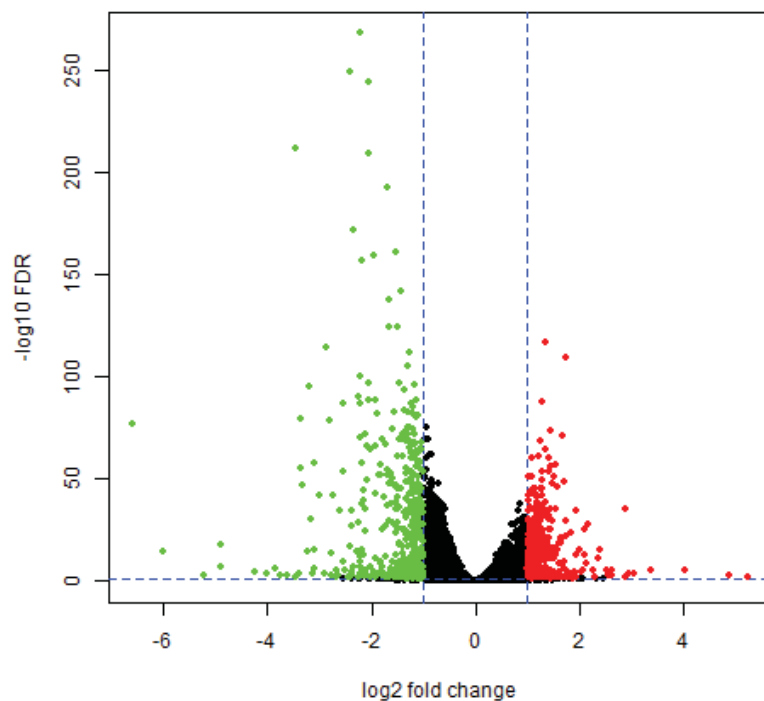
Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (71); pontos verdes, genes regulados negativamente (93); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 25. VOLCANO H9c2 – Dm28c (0 hpi vs 24 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (745); pontos verdes, genes regulados negativamente (702); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 26. VOLCANO H9c2 – Dm28c (6 hpi vs 24 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente (378); pontos verdes, genes regulados negativamente (440); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

Comparando os genes em comum que foram regulados para HeLa com 6 hpi, observamos 11 genes compartilhados como resposta entre ambos clones, representando 45,83 % para CL Brener e 27,5 % para Dm28c. Já no tempo de 24 hpi, foram detectados 86 genes em comum, representando o 36,29 % para CL Brener e 33,59 % para Dm28c (gráfico 27). Esse resultado, no qual, menos da metade da resposta para cada cepa é comum, evidencia que cada clone induz uma resposta, em parte, particular. Isso confirma o observado por Adesse e colaboradores (2010), que concluíram que cada cepa induz uma “impressão digital”, podendo explicar as diferenças nas diferentes patologias.

Comparando o nível de expressão dos DEG compartilhados da célula HeLa em resposta às infecções com CL Brener e com Dm28c, notamos uma grande similaridade, no padrão de expressão, entre 6 hpi e 24 hpi. Em 6 hpi, a resposta de HeLa frente à infecção pelos diferentes clones apresentou uma menor quantidade de genes regulados, quando comparados com o tempo de 24 hpi. Usando um $|\log_2 \text{fold-change}|$ maior a 1 e FDR <0,05, encontramos 3 DEG regulados negativamente para ambos clones (tabela 10). Encontramos também 8 DEG aumentados para os dois clones (tabela 10). Porém todos os genes em comum com um FDR <0,05, independentemente do *fold-change*, apresentaram o mesmo padrão de similaridade, como observado no gráfico 29.

No tempo de 24 hpi, encontramos uma grande semelhança na resposta de HeLa às infecções por CL Brener e Dm28c, igual ao observado em 6 hpi. Foram encontrados 12 genes significativamente aumentados, 73 genes significativamente diminuídos e apenas 1 gene significativamente aumentado com Dm28c e diminuído com CL Brener. Com um FDR <0,05 e independente do *fold-change*, a maioria dos genes se agrupam em dois blocos, um que é aumentado e outro que é diminuído em resposta aos dois clones (gráfico 30).

Em concordância com os nossos resultados, Houston-Ludlam e colaboradores (2016) observaram uma forte similaridade nos genes comumente regulados nos fibroblastos quando infectados com as cepas Y e Sylvio, no tempo de 24 hpi. No entanto, os genes que se encontraram igualmente regulados foram todos regulados positivamente. Pelo contrário, no nosso trabalho, notamos que a maioria dos DEG foram regulados negativamente e um grupo menor, positivamente.

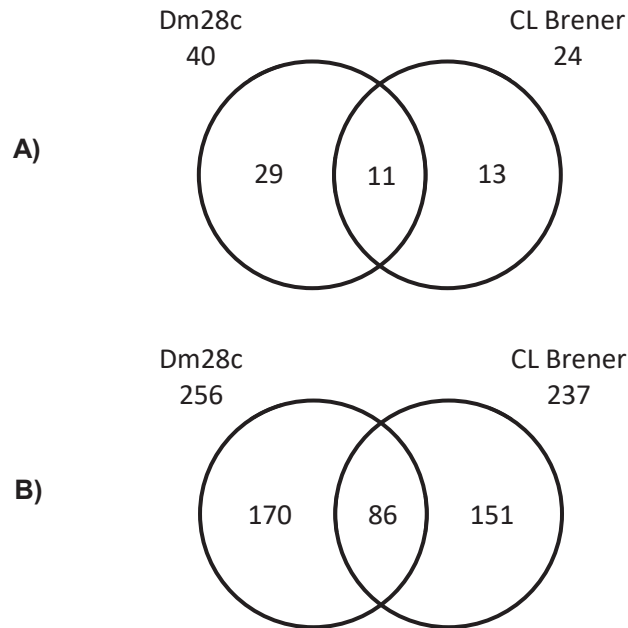
Na célula HeLa, o gene *CXCL8* que codifica a Interleucina 8 (IL-8), no tempo de 6 hpi é regulado positivamente, independentemente do clone usado para infectar a célula. Já em 24 hpi, observa-se uma regulação negativa na infecção com o clone CL Brener. O fibroblasto quando infectado com a cepa Y mostra um aumento de IL-8 em 24 hpi, mas com 72 hpi, diminui (Houston-Ludlam *et al.*, 2016). Considerando que Y pertence à DTU II e CL Brener pertence à DTU VI, híbrido de DTU II e DTU III, poderia-se especular que essa variação na regulação de *CXCL8* é uma característica das infecções do DTU II. Essa hipótese só pode ser verificada avaliando uma maior quantidade de hospedeiros, cepas de diferentes DTUs e ensaios *in vivo*.

Por outro lado, a infecção de HeLa com CL Brener levou a uma diminuição de *CXCL8* em 24 hpi. Esse resultado difere do encontrado por Shigihara e colaboradores (2008) que encontraram um aumento de IL-8 como resposta da célula HeLa à infecção por Tulahuen, pertencente a DTU VI. Essa diferença poderia ser explicada pelos diferentes tempos avaliados, já que Shigihara e cols. avaliaram a resposta no tempo de 72 hpi. A diferença das cepas também poderia explicar a diferente resposta; embora as duas pertençam à DTU VI, a natureza híbrida desse grupo revela uma maior complexidade. Fibroblastos infectados com a cepa Sylvio (DTU I) também mostraram um aumento de IL-8, em 72 hpi (Houston-Ludlam *et al.*, 2016).

O gene *AMIGO2* que codifica a proteína 2 induzida por anfoterina, medeia a interação tanto homofílica, quanto heterofílica, célula-célula. A proteína de aderência G acoplada ao receptor G1, codificada pelo gene *ADGRG1*, é responsável pela adesão na matrix extra-celular, interação célula-célula. O gene *SERPINE1* que codifica o inibidor do ativador de plasminógeno 1, regula a adesão e a propagação celular. Esses 3 genes que estão envolvidos no processo de adesão celular, encontram-se regulados positivamente na célula HeLa, independentemente do clone usado para infectá-la, em 6 hpi.

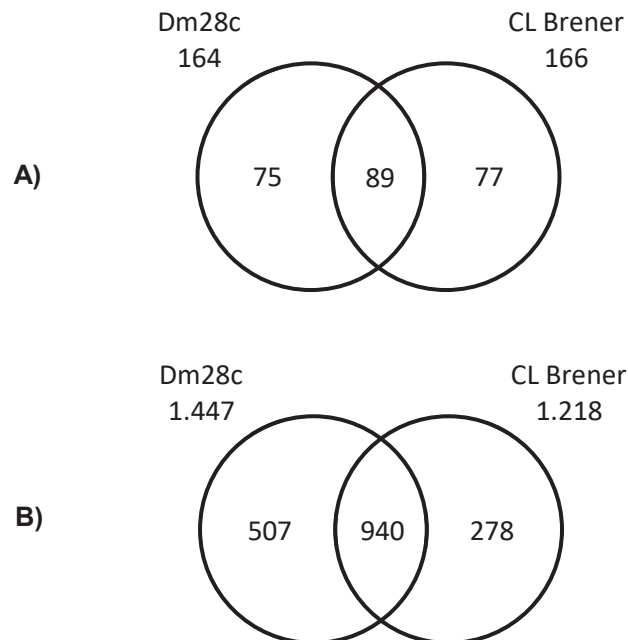
A análise comparativa dos DEG na célula H9c2 mostrou, no tempo de 6 hpi, 89 DEG compartilhados quando infectada com CL Brener ou Dm28c, representando 53,61 % do total de DEG da célula infectada com CL Brener e 54,27 %, quando infectada com Dm28c (gráfico 27). Com 24 hpi, 940 DEG foram compartilhados nas respostas frente aos dois clones, representando 77,18 % do total de DEG, quando infectada com CL Brener e 64,96 % quando infectada com Dm28c (gráfico 28).

GRÁFICO 27. NÚMERO DE GENES COMPARTILHADOS DETECTADOS EM HeLa



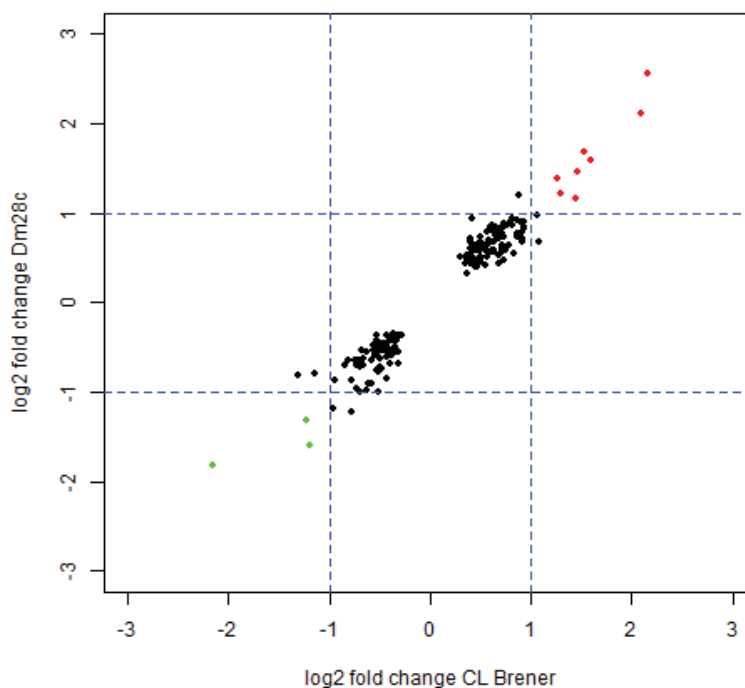
Fonte: O autor. LEGENDA: Os números referem-se aos genes diferencialmente expressos (DEG) na célula HeLa infectada. A) 6 horas pós-infecção B) 24 horas pós-infecção.

GRÁFICO 28. NÚMERO DE GENES COMPARTILHADOS DETECTADOS EM H9c2



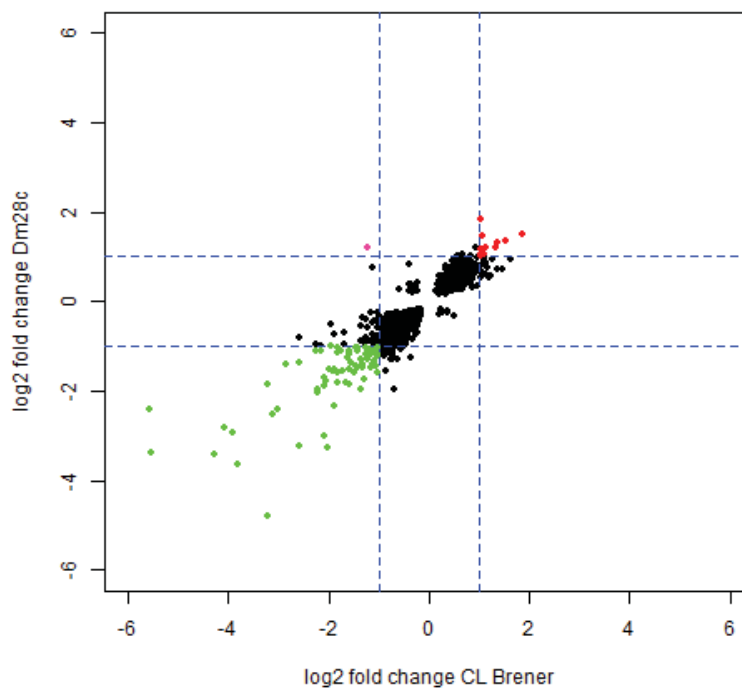
Fonte: O autor. LEGENDA: Os números referem-se aos genes diferencialmente expressos (DEG) na célula H9c2 infectada. A) 6 horas pós-infecção B) 24 horas pós-infecção.

GRÁFICO 29. COMPARAÇÃO DE HeLa INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (6 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente com ambos clones (8); pontos verdes, genes regulados negativamente com ambos clones (3); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 30. COMPARAÇÃO DE HeLa INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (24 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente com ambos clones (12); pontos verdes, genes regulados negativamente com ambos clones (73); pontos rosas, genes regulados positivamente com Dm28c e negativamente com CL Brener (1); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

TABELA 10. GENES REGULADOS EM HeLa EM 6 hpi

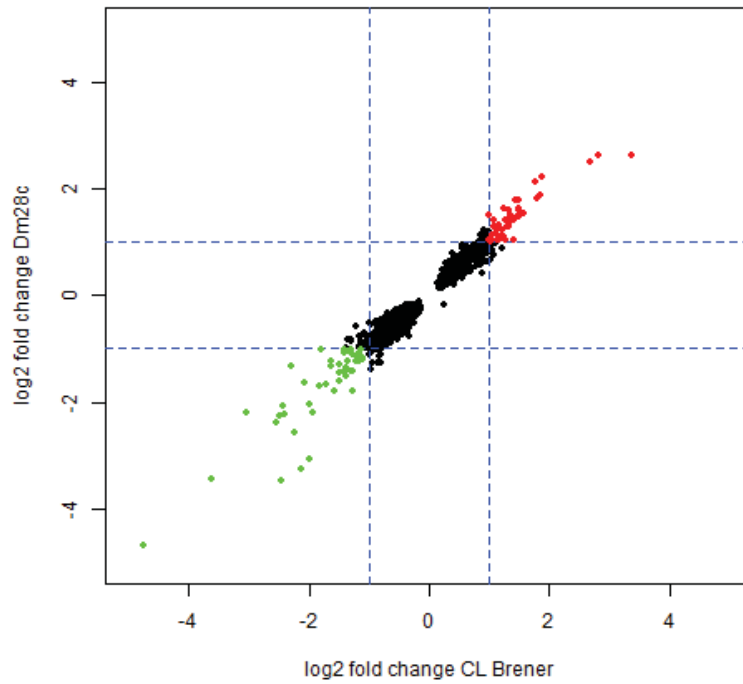
ID	GENE	Log ₂ fold-change	
		CL Brener	Dm28c
ENSG00000173237.4	<i>C11ORF86</i>	- 1,20	-1,59
ENSG00000125968.8	<i>ID1</i>	- 1,22	-1,32
ENSG00000225431.1	<i>LINC01671</i>	- 2,16	-1,82
ENSG00000169429.10	<i>CXCL8</i>	2,16	2,56
ENSG00000056558.10	<i>TRAF1</i>	2,10	2,11
ENSG00000139211.6	<i>AMIGO2</i>	1,59	1,59
ENSG00000139547.7	<i>RDH16</i>	1,53	1,69
ENSG00000205336.11	<i>ADGRG1</i>	1,47	1,47
ENSG00000164236.11	<i>ANKRD33B</i>	1,44	1,16
ENSG00000106366.8	<i>SERPINE1</i>	1,30	1,22
ENSG00000070190.12	<i>DAPP1</i>	1,26	1,38

FONTE: O autor.

Dentre os DEG compartilhados da célula H9c2 em 6 hpi, observou-se 43 genes significativos regulados positivamente e 46 genes, negativamente, em resposta para ambos clones. Com 24 hpi, o número de genes regulados positivamente aumentou para 519 e os genes regulados negativamente também aumentaram para 421. O nível de expressão dos DEG compartilhados em 6 hpi manifestam o mesmo padrão que em 24 hpi; ou seja, se um gene é aumentado ou diminuído em resposta a um clone, também será aumentado ou diminuído em resposta ao outro clone (gráficos 31 e 32). Nos gráficos 31 e 32, observa-se que independentemente do *fold-change*, a maioria dos genes estatisticamente significativos apresentam um padrão similar de expressão, como resposta aos dois clones.

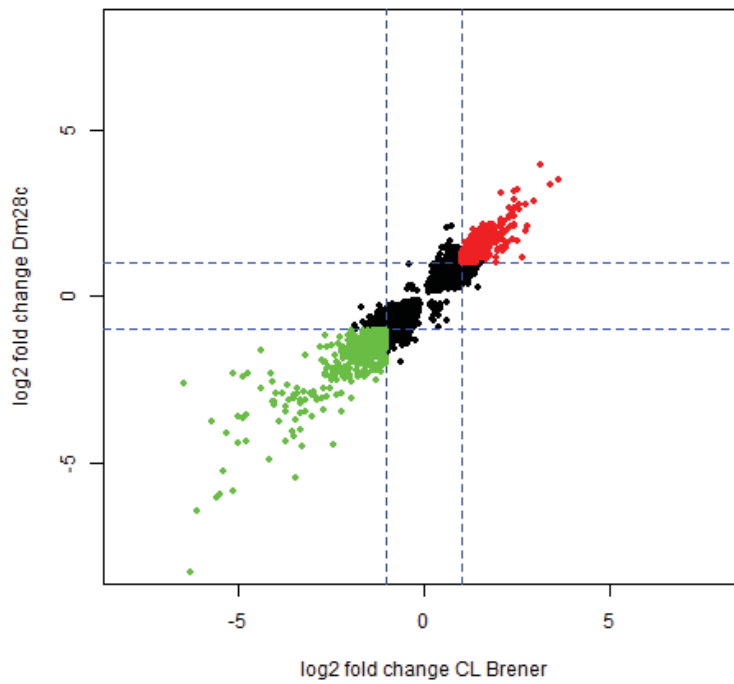
Como observado nos gráficos 29, 30, 31 e 32, a resposta das duas células hospedeiras testadas, HeLa e H9c2, frente à infecção dos clones, Dm28c e CL Brener, de *T. cruzi*, apresenta um alta padrão de similaridade, independentemente dos tempos avaliados, 6 e 24 hpi. Sendo que, ambos clones mostraram diferentes ciclos de liberação, tanto na quantidade de parasitos liberados, quanto nos dias de liberação. Isto pode sugerir que, pelo menos, nas primeiras 24 hpi, a resposta das células frente aos parasitos é independente do ciclo intracelular dos parasitos.

GRÁFICO 31. COMPARAÇÃO DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (6 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente com ambos clones (43); pontos verdes, genes regulados negativamente com ambos clones (46); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

GRÁFICO 32. COMPARAÇÃO DE H9c2 INFECTADA COM Dm28c VS CL Brener (24 hpi)



Fonte: O autor. LEGENDA: Pontos vermelhos, genes regulados positivamente com ambos clones (519); pontos verdes, genes regulados negativamente com ambos clones (421); pontos pretos, genes com expressão diferencial não significativa.

Dos genes regulados positivamente em resposta a ambos clones, com 6 hpi, na célula H9c2, 17 (39,53 %) deles ainda se mantiveram significativamente regulados com 24 hpi. Já dos genes regulados negativamente, 22 (47,83 %) também foram regulados negativamente com 24 hpi. A tabela 11 mostra os genes que foram regulados positivamente na célula H9c2 em resposta a ambos clones, tanto em 6, quanto em 24 hpi. A tabela 12 mostra os genes regulados negativamente.

As quimiocinas exercem um papel fundamental durante a resposta imune sistêmica, recrutando células como linfócitos, neutrófilos, células NK, monócitos, macrófagos, entre outras. Dos transcritos de quimiocinas identificados em nossos experimentos, todos estão modulados em 24 hpi, sendo que alguns já apresentam modulação em 6h. O gene *Cxcl12* tem sua expressão aumentada (tabela 11), enquanto que *Cxcl1*, *Cxcl10*, *Cxcl16*, *Ccl2* e *Ccl7* apresentaram uma modulação negativa em H9c2 infectada com CL Brener. A regulação negativa que observamos em relação em *Cxcl10* e *Ccl2* é observada apenas em 72 hpi em outro trabalho, no qual foi avaliada a resposta de fibroblastos à infecção por *T. cruzi* (Li Yuan et al., 2016). Neste trabalho, há uma regulação positiva destas e de outras citocinas nos momentos precoces. A ausência de regulação positiva de citocinas em nosso modelo parece ser contraditório, uma vez que a infecção ativa mecanismos inflamatórios. De fato, o termo “*inflammatory response*” está enriquecido entre os genes regulados negativamente, 24 hpi. De qualquer forma, cada tipo celular pode ter uma resposta à infecção, e o recrutamento de células imunes ao local da infecção pode estar sendo ativado por outros tipos celulares, que não as células musculares.

Percebemos, também, a diminuição da transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e na migração como os genes *Pdgf*. Os produtos aumentados desses genes estão implicados na proliferação células musculares lisas da artéria pulmonar (Zhao et al., 2014). O fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF (*platelet derived growth factor*) foi descrito como um mitógeno liberado por plaquetas durante a coagulação sanguínea, mas cuja produção se dá por vários tipos celulares, exercendo uma função parácrina. Duas de suas três subunidades, PDGFA e PDGFB, têm seus transcritos diminuídos na célula H9c2 após 24h de infecção, independente do clone usado.

TABELA 11. DEG REGULADOS POSITIVAMENTE EM H9c2 COM 6 E 24 hpi

ID	GENE	CL Brener		Dm28c	
		6 hpi	24 hpi	6 hpi	24 hpi
ENSRNOG00000013944	<i>Zc3hav1l</i>	3,37	2,97	2,61	2,86
ENSRNOG00000001514	<i>Cdca7</i>	1,89	3,40	2,20	3,35
ENSRNOG00000013589	<i>Cxcl12</i>	1,79	1,28	1,81	1,43
ENSRNOG000000057092	<i>Slfn4</i>	1,44	2,44	1,78	3,16
ENSRNOG000000031576	<i>Zfp455</i>	1,24	1,87	1,62	1,77
ENSRNOG000000046480	<i>Aabr07005779.3</i>	1,35	1,35	1,49	1,77
ENSRNOG000000008841	<i>Orc1</i>	1,47	2,30	1,47	2,65
ENSRNOG000000018349	<i>Polr1b</i>	1,31	1,65	1,42	1,90
ENSRNOG000000027787	<i>Cdc6</i>	1,27	2,18	1,41	2,26
ENSRNOG000000004572	<i>Zfp472</i>	1,39	2,33	1,40	2,11
ENSRNOG000000013970	<i>Cdt1</i>	1,15	2,12	1,29	2,16
ENSRNOG000000053869	<i>Ppp1r3d</i>	1,15	1,44	1,26	1,36
ENSRNOG000000030416	<i>Zfp870</i>	1,05	1,35	1,14	1,13
ENSRNOG000000015585	<i>Suv39h2</i>	1,20	1,79	1,09	2,17
ENSRNOG000000056209	<i>Exo1</i>	1,25	2,30	1,08	2,41
ENSRNOG000000049215	<i>Cbx2</i>	1,28	2,10	1,03	2,03
ENSRNOG00000001323	<i>Zfp157</i>	1,13	1,52	1,03	1,26

FONTE: O autor. LEGENDA: Os números representam o $\text{Log}_2\text{fold-change}$.

Genes envolvidos na modificação de histonas, *Cbx2* e *Suv39h2*, e genes envolvidos na replicação de DNA como *Cdt1*, *Cdc6* e *Orc1* são regulados positivamente na célula H9c2, em resposta aos dois clones em ambos tempos (tabela 11). Isto corresponde ao observado por Li e colaboradores (2016), no qual a infecção pelos parasitos empurra à célula hospedeira para fase S do ciclo celular nas primeiras 24 horas do ciclo de infecção.

Os genes *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Nr4a1* e *Nr4a3* associados ao crescimento, diferenciação e mitogênese foram regulados negativamente na célula H9c2 no processo de infecção, independentemente do clone usado e do tempo avaliado (tabela 12). Isso evidencia uma regulação negativa na via de ciclo celular.

Os genes de ativação imediata incluem majoritariamente os genes *Egr* (*early growth response*, 3 isoformas com domínio de dedos de zinco C2H2), os genes da família *Fos* (*Fos*, *FosB*, *Fosl1* e *Fosl2*), os genes *Jun*, cujos produtos se associam aos produtos *FOS*, formando o complexo AP-1. O termo *Fosb-Junb DNA-protein complex* foi identificado como regulado negativamente em 6 hpi na célula H9c2, infectada com CL Brener. A regulação negativa de seus transcritos ocorre através da associação a

microRNAs (Aitken *et al.*, 2015, Avraham *et al.*, 2010) e significa que a célula interrompe a sinalização para proliferação e/ou diferenciação e entra em um contexto celular de alerta para lidar com um estímulo específico, como o contexto de uma infecção.

Os genes de ativação imediata são ativados e transcritos em minutos, após o estímulo celular. São essenciais na resposta a estresses e na diferenciação celular. Codificam fatores transcricionais transientes, que iniciam uma cascata de ativação de genes, cujos produtos estão associados com proliferação, diferenciação e morte celular. Em um contexto de infecção, como no nosso modelo, espera-se que estes genes sejam regulados em momentos precoces.

TABELA 12. DEG REGULADOS NEGATIVAMENTE EM H9c2 COM 6 E 24 hpi

ID	GENE	CL Brener		Dm28c	
		6 hpi	24 hpi	6 hpi	24 hpi
ENSRNOG00000017602	<i>Il34</i>	-4,76	-4,74	-4,67	-2,30
ENSRNOG00000017828	<i>Egr3</i>	-2,48	-6,26	-2,26	-8,30
ENSRNOG00000031971	<i>Prss42</i>	-1,94	-2,35	-2,21	-1,96
ENSRNOG00000062261	<i>AC111804.2</i>	-2,42	-5,13	-2,06	-5,86
ENSRNOG00000000640	<i>Egr2</i>	-1,98	-5,41	-2,05	-5,27
ENSRNOG00000014610	<i>Anpep</i>	-1,58	-3,41	-1,79	-2,91
ENSRNOG00000013869	<i>Kcnj4</i>	-1,26	-2,61	-1,78	-2,15
ENSRNOG00000005964	<i>Nr4a3</i>	-1,83	-3,70	-1,70	-3,33
ENSRNOG00000004149	<i>Mgat4c</i>	-1,49	-1,01	-1,59	-1,49
ENSRNOG00000027445	<i>AABR07060293.1</i>	-1,38	-2,36	-1,51	-2,19
ENSRNOG00000013720	<i>Aebp1</i>	-1,48	-1,50	-1,45	-1,68
ENSRNOG00000006859	<i>Insig1</i>	-1,30	-2,36	-1,41	-2,14
ENSRNOG00000019422	<i>Egr1</i>	-1,35	-2,22	-1,40	-3,47
ENSRNOG00000016690	<i>Idi1</i>	-1,38	-1,57	-1,37	-1,66
ENSRNOG00000004660	<i>Fzd6</i>	-1,20	-1,55	-1,24	-2,10
ENSRNOG00000015382	<i>Arid5a</i>	-1,36	-3,70	-1,23	-4,36
ENSRNOG00000020981	<i>Prss46</i>	-1,17	-3,27	-1,22	-4,53
ENSRNOG00000007607	<i>Nr4a1</i>	-1,20	-4,76	-1,18	-4,36
ENSRNOG00000014293	<i>Nkd1</i>	-1,09	-1,41	-1,17	-1,95
ENSRNOG00000043465	<i>Arc</i>	-1,41	-4,99	-1,08	-4,42
ENSRNOG00000013437	<i>LOC691083</i>	-1,31	-1,58	-1,01	-2,44
ENSRNOG00000000569	<i>Vsir</i>	-1,78	-3,33	-1,00	-3,21

FONTE: O autor. LEGENDA: Os números representam o $\text{Log}_2\text{fold-change}$.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na atualidade, as únicas drogas disponíveis contra a doença de Chagas, Benznidazol e Nifurtimox foram desenvolvidas nos anos 70's, apresentando vários efeitos colaterais e uma efetividade baixa em pacientes crônicos (Guedes *et al.*, 2011). As principais estratégias para desenvolver novas drogas estão focadas nas vias metabólicas dos parasitos, com uma grande taxa de fracasso, motivo pelo qual é necessário outro tipo de abordagens (Chatelain, 2015). Identificar os mecanismos celulares e metabólicos regulados, na célula hospedeira, requeridos pelo parasito para estabelecer a infecção, é uma alternativa para criar novas estratégias de tratamentos. Cardonna e colaboradores (2013) silenciaram o gene do hospedeiro *TPRT*, gene envolvido na biossíntese de Coenzima Q10, reduzindo drasticamente o crescimento de amastigotas intracelulares, sem ter um efeito negativo na célula hospedeira, demonstrando a importância de identificar os processos celulares no processo de interação.

A ideia por trás do presente trabalho é a identificação de mecanismos em comum e idiossincráticos de cada modelo de infecção *T. cruzi*-célula mamífera. Cepas ou clones diferentes de *T. cruzi* podem ocasionar respostas diferentes em uma mesma célula hospedeira, assim como diferentes células hospedeiras respondem de uma forma ou de outra, à infecção por uma mesma cepa de *T. cruzi*. Os resultados dos diferentes trabalhos de interação *T. cruzi*-célula hospedeira usando cepas diferentes e hospedeiros diferentes fornecem dados que devem ser analisados em conjunto, para se elucidar o complexo processo de interação entre os dois tipos celulares. Além disso, resta o desafio de transpor os dados obtidos da análise de um tipo celular infectado *in vitro*, para o que acontece em nível sistêmico em um organismo.

Barribeau e colaboradores (2014) registraram, no modelo de interação do bicho-da-seda (*Bombus terrestris*) com um tripanossomatídeo (*Crithidia bombi*), que a infecção por um genótipo virulento ativa genes do hospedeiro associados ao controle da expressão gênica, ao passo que a infecção por genótipos pouco infectivos ativa genes de resposta imune, incluindo codificadores de peptídeos anti-microbianos.

Esperamos que, com a utilização de dois tipos de *T. cruzi*, um clone da cepa CL Brener, e um clone Dm28c, com propriedades diferentes no que se refere à infecção, e a utilização de dois tipos de células de mamíferos, uma linhagem muscular

e uma linhagem epitelial, de rato e humano, respectivamente, possa fornecer mais informações sobre como o parasito interage com a célula do hospedeiro. Resultados de experimentos em que foi avaliado o transcrito da célula hospedeira após infecção com *T. cruzi* utilizando microarranjos, já são divulgados há mais de uma década. Poucos são os trabalhos em que esta avaliação utilizou sequenciamento em larga escala. Apenas com esta tecnologia, pode-se avaliar o transcrito do parasito em sua plenitude.

De forma geral, não obtivemos uma cobertura de sequenciamento compatível com o esperado pela tecnologia utilizada, por causa de problemas na quantificação. Ainda assim, nossos dados podem ser analisados para aprofundar o entendimento do processo de infecção por este parasito.

A interpretação dos resultados de um experimento em larga escala, não é uma tarefa fácil. O primeiro grande desafio é identificar resultados espúrios (já que a comparação de 10.000 genes entre condições distintas, por probabilidade, vai detectar resultados extremos que consideraremos como significativos quando, na verdade, não o são). Fazemos isto, considerando pragmaticamente os critérios estatísticos *a priori* definidos. Genes regulados com um *fold-change* grande (significância biológica) e com um FDR ou p-valor pequeno (significância estatística) têm mais chance de refletirem um resultado verdadeiro. Entretanto, variações pequenas no *fold-change* podem estar associadas a uma função desencadeadora de uma cascata com significado biológico importante.

Em um primeiro momento, o pesquisador examina os resultados tentando encontrar uma corroboração do que foi observado, pelo que já está descrito na literatura. Isto porque o primeiro impulso é convencer a comunidade científica que nosso experimento foi bem conduzido. Só nesta primeira abordagem, já nos deparamos com dificuldades, visto que alguns resultados indicam que o sistema está funcionando como seria esperado; outros, entretanto, indicam uma regulação oposta ao que se “esperaria”. Mais difícil se torna o entendimento dos resultados quando não sabemos, ao certo, se o “esperado” é correto em todas as situações, incluindo as do nosso experimento. O supressum da análise acontece, entretanto, em um momento posterior, quando o desafio é perceber um cenário ainda não descrito ou visualizado nos experimentos divulgados por outros pesquisadores.

Outra característica de nossos resultados que não pode deixar de ser pontuada é que estamos avaliando a fração de RNA das nossas células. Embora nas

células hospedeiras a regulação da expressão gênica ocorra predominantemente no início da transcrição, de forma que podemos correlacionar a quantidade de RNA à quantidade proteica, há outras etapas de regulação pós-transcricional (no processamento, no transporte núcleo-citoplasma, na estabilidade do RNA, na tradução e até em momentos pós-traducionais) que não podem ser ignoradas. Se considerarmos os *T. cruzi*, a correlação RNA-proteína é ainda mais frágil, visto que o parasita aparentemente transcreve grande parte do genoma durante seu ciclo de vida. Portanto, nossas conclusões a respeito da fisiologia deste processo de infecção podem estar sujeitas a falhas e as ideias que estamos expondo neste trabalho devem ser avaliadas com esta preocupação em mente.

Uma primeira consideração que podemos fazer é com relação à quantidade de genes modulados na célula hospedeira em nosso experimento em momentos precoces, é que a célula responde de forma ampla ao desafio enfrentado, como pontuado por Li Yuan (2016). Mesmo com uma perda de sensibilidade em virtude da baixa cobertura alcançada em nosso sequenciamento, em 6 hpi já observamos um conjunto de genes diferencialmente expressos, 24 e 40 na célula HeLa e 166 e 164 na célula H9c2.

Esse trabalho agrega o rol de estudos comparativos da interação *T. cruzi* - célula mamífera. Os resultados sugerem que a modulação do transcrito da célula hospedeira nas primeiras 24 horas parece ser independente do ciclo intracelular do parasito. A modulação gênica dos hospedeiros, nas primeiras 24 horas, parece ser influenciada principalmente pela interação por contato com os parasitos.

7. CONCLUSÕES

- O tempo de 24 horas pós-infecção mostra uma maior quantidade de genes modulados em comparação ao tempo de 6 hpi, compatível com uma cascata de sinalização.
- A resposta das células hospedeiras, HeLa e H9c2, frente a infecção por *T. cruzi* de diferentes DTU, Dm28c e CL Brener, mostram um alto padrão de similaridade.
- A modulação do transcrito da célula hospedeira, nas primeiras 24 horas, parece ser independente do ciclo intracelular do parasito.

8. PERSPECTIVAS

- Sequenciar novamente as amostras, já preparadas, para aumentar o número de leituras e poder assim, avaliar a expressão diferencial em nível de transcritos de forma estatisticamente mais robusta.
- Amplificar o mRNA dos parasitos a partir do conjunto do mRNA total da célula infectada, para avaliar com maior profundidade as alterações na expressão gênica do parasito, no processo de infecção.
- Apesar de os estudos de transcritômica nos permitirem dar uma olhada profunda do que acontece dentro da célula quando é infectada, estudos de proteômica nos permitiriam complementar o panorama, especialmente no estudo do parasito, uma vez que sua regulação ocorre principalmente em nível pós-transcricional.

REFERÊNCIAS

- ADESSE, D.; IACOBAS, D. A.; IACOBAS, S.; GARZONI, L. R.; DE NAZARETH MEIRELLES, M.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 5, p. 846-854. 2010.
- AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157-1160. 1990.
- AITKEN, S., MAGI, S., ALHENDI, A. M., ITOH, M., KAWAJI, H., LASSMANN, T.,..., HAYASHIZAKI, Y. Transcriptional dynamics reveal critical roles for non-coding RNAs in the immediate-early response. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 4, p. e1004217. 2015.
- ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 274-279. 2007.
- ANDERS, S., PYL, P. T., HUBER, W. HTSeq -a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169. 2015.
- ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi* - host cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-823. 2005.
- ANDREWS S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível *online* em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. 2010.
- APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. **Research in microbiology**, v. 162, n. 7, p. 655-663. 2011.
- AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039. 2004
- ÁVILA, A. R.; DALLAGIOVANNA, B.; YAMADA-OGATTA, S. F.; MONTEIRO-GÓES, V.; FRAGOSO, S. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 159-168. 2003.
- AVRAHAM, R., SAS-CHEN, A., MANOR, O., STEINFELD, I., SHALGI, R., TARCIC, G., ... ENERLY, E. EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 124, p. ra43-ra43. 2010.
- BARBOSA, H. S.; DE NAZARETH, M.; DE MEIRELLES, S. L. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCAI-, and ConA binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 78, n. 5, p. 404-409. 1992.
- BARRIAS, E. S.; DUTRA, J. D. M. F.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. D. Participation of macrophage rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 363, n. 3, p. 828- 834. 2007.
- BARRIBEAU, S. M., SADD, B. M., DU PLESSIS, L., & SCHMID-HEMPEL, P. Gene expression differences underlying genotype-by-genotype specificity in a host-parasite system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 9, p. 3496-3501. 2014.
- BASTOS, T. M. **Uso das sirtuínas do *Trypanosoma cruzi* como alvos moleculares no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de chagas**. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Instituto Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.
- BELEW, A. T.; JUNQUEIRA, C.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; VALENTE, B. M.; OLIVEIRA, A. E. R.; POLIDORO, R. B....; BURLEIGH, B. A. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent

Trypanosoma cruzi underlines the role of surface proteins during infection. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006767. 2017.

BERN, C., MARTIN, D. L., & GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in parasitology**. Academic Press, v. 75, p. 19-47. 2011.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C.,...; BÖHME, U. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422. 2005.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 5, n. 5, p. 220-224. 1963.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 95-105. 2000.

BUERMANS, H. P. J.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 10, p. 1932-1941. 2014.

BURLEIGH, B.A.; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 3, p. 609–620. 1997.

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701-711. 2002.

BURLEIGH, B. A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Sci. STKE**, v. 2005, n. 293, p. 36-36. 2005.

CALVET, C. M.; OLIVEIRA JR, F. O.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; PEREIRA, M. C. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 4, p. 301-312. 2009.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100. 1964.

CAMARGOS, E. R.; FRANCO, D. J.; GARCIA, C. M.; DUTRA, A. P.; TEIXEIRA JR, A. L.; CHIARI, E.; MACHADO, C. R. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 5, p. 604-612. 2000.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and infection**, v. 5, n. 13, p. 1231-1240. 2003.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M. E. A. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 273-278. 1995.

CARADONNA, K. L.; ENGEL, J. C.; JACOBI, D.; LEE, C. H.; BURLEIGH, B. A. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 1, p. 108-117. 2013.

CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 3-4, p. 97-104. 1980.

CASTILLO, C.; CARRILLO, I.; LIBISCH, G.; JUIZ, N.; SCHIJMAN, A.; ROBELLO, C.; KEMMERLING, U. Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 479. 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218. 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of biomolecular screening*, v. 20, n. 1, p. 22-35. 2015.

CLAYTON, C. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 11, p. e1003680. 2013.

CONTRERAS, V. T., SALLES, J. M., THOMAS, N., MOREL, C. M., & GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327. 1985.

CONTRERAS, V.T.; ARAUJO-JORGE, T.C.; BONALDO, M.C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L. & GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123-133. 1988.

COSENTINO, R. O.; AGÜERO, F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 7, p. e1777. 2012.

COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 252. 2009.

COURA J. R.; DIAS J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40. 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S6-S7. 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. **A systemic review. Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13. 2010.

COVARRUBIAS, C.; CORTEZ, M., FERREIRA, D.; YOSHIDA, N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1609-1616. 2007.

CUNHA-NETO, E.; DZAU, V. J.; ALLEN, P. D.; STAMATIOU, D.; BENVENUTTI, L.; HIGUCHI, M. L.,...; LIEW, C. C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 2, p. 305-313. 2005.

De Avalos, S. V.; Blader, I. J.; Fisher, M.; Boothroyd, J. C.; Burleigh, B. A. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 639-644. 2002.

DE BORBA, L.; DE ARAUJO M.R.T. Protocolo para extração de DNA mitocondrial de roedor para identificação da espécie. **Instituto Carlos Chagas**, 2012.

DE LANA, M.; DE MENEZES MACHADO, E. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. **American Trypanosomiasis**. p. 339-363. 2010.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269-285. 2002.

DE SOUZA, W. O Parasita e a sua interação com os hospedeiros. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanossoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. [S.l.]: **Guanabara Koogan S.A.** p. 88-126. 2000.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010. 2010.

DELAPORTE, F. Romana's Sign. **Journal of the History of Biology**, v. 30, n. 3, p. 357–366, 1997.

DIEHN, M; RELMAN, D. A. Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host–pathogen interactions. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 1, p. 95-101. 2001.

DI NOIA, J. M.; D'ORSO, I.; ÅSLUND, L.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 10843-10850. 1998.

DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E. M.; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 285-289. 1995.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75-90. 2002.

DUHAGON, M. A.; DALLAGIOVANNA, B.; GARAT, B. Unusual features of poly [dT-dG]-[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 1, p. 98-103. 2001.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; PINTO-DIAS, J. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R. L.; CARVALHO-PARRA, J. F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Scandinavian journal of immunology**, v. 45, n. 1, p. 74-80. 1997.

DUZ, A. L. C.; VIEIRA, P. M. D. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARDOSO, J. M. D. O.; OLIVEIRA, F. C. B. D.; ...; CARNEIRO, C. M. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1005-1013. 2014.

ELIAS, M. C. Q.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79-90. 2001.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N....; WESTENBERGER, S. J. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415. 2005a.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.;...; GHEDIN, E. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409. 2005b.

FERNÁNDEZ M. A.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ M. A.; FRESNO M. Involvement of β 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. **European journal of immunology**, v. 23, n. 2, p. 552-557. 1993.

FIGUEROA, C. D.; MARCHANT, A.; NOVOA, U.; FÖRSTERMANN, U.; JARNAGIN, K.; SCHÖLKENS, B.; MÜLLER-ESTERL, W. Differential distribution of bradykinin B2 receptors in the rat and human cardiovascular system. **Hypertension**, v. 37, n. 1, p. 110-120. 2001.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. ...; MACHADO, C. R. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24. 2006.

GARG, N.; POPOV, V. L.; PAPAConstantinou, J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease**, v. 1638, n. 2, p. 106-120. 2003.

GARZONI, L. R.; MASUDA, M. O.; CAPELLA, M. M.; LOPES, A. G.; MEIRELLES, M. D. N. S. L. Characterization of $[Ca^{2+}]_i$ responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 487-493. 2003.

GOMEZ, C.; ESTHER RAMIREZ, M.; CALIXTO-GALVEZ, M.; MEDEL, O.; RODRÍGUEZ, M. A. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **BioMed Research International**, v. 2010. 2010.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F. ...; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078-47086. 2001.

GUEDES, P. M., SILVA, G. K., GUTIERREZ, F. R., & SILVA, J. S. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 9, n. 5, p. 609-620. 2011.

HELLER, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 4, n. 1, p. 129-153. 2002.

HIGO, H.; MIURA, S.; HORIO, M.; MIMORI, T.; HAMANO, S.; AGATSUMA, T. ...; MATTA, V. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitology international**, v. 53, n. 4, p. 337-344. 2004.

HOUSTON-LUDLAM, G. A.; BELEW, A. T.; EL-SAYED, N. M. Comparative Transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the Sylvio and Y strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS one**, v. 11, n. 8, p. e0159197. 2016.

HUMMEL, H. S.; GILLESPIE, R. D.; SWINDLE, J. Mutational analysis of 3'splice site selection during trans-splicing. **Journal of Biological Chemistry**, 2000.

IANTORNO, S. A.; DURRANT, C.; KHAN, A.; SANDERS, M. J.; BEVERLEY, S. M.; WARREN, W. C.; GRIGG, M. E. Gene expression in *Leishmania* is regulated predominantly by gene dosage. **MBio**, v. 8, n. 5, p. e01393-17. 2017.

ILLUMINA. Illumina Sequencing Technology. Youtube (5:03 min). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>>. Acesso em: 14 fev. 2013a.

ILLUMINA. TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Guide. Disponível em: <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqstrandedmna/truseq-stranded-mrna-sample-prep-guide-15031047-e.pdf>. 2013b.

IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A., MURPHY, L., AGGARWAL, G., BERRIMAN, M.; ANUPAMA, A. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442. 2005.

JUIZ, N. A.; TORREJÓN, I.; BURGOS, M.; TORRES, A. M.; DUFFY, T.; CAYO, N. M. ...; SCHIJMAN, A. G. Alterations in Placental Gene Expression of Pregnant Women with Chronic Chagas Disease. **The American journal of pathology**, v. 188, n. 6, p. 1345-1353. 2018.

KALB, A. L. **Análise do transcrito do *Trypanosoma cruzi* e da célula hospedeira durante o processo de infecção**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas, Curitiba, 2013.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 7, p. 533. 2007.

KESSLER, R. L.; CONTRERAS, V. T.; MARLIÈRE, N. P.; APARECIDA GUARNERI, A.; VILLAMIZAR SILVA, L. H.; MAZZAROTTO, G. A. C. A....; PROBST, C. M. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712-736. 2017.

KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature methods**, v. 12, n. 4, p. 357. 2015.

KIMES, B. W.; BRANDT, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Experimental cell research**, v. 98, n. 2, p. 367-381. 1976.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). In: Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, part A, p. 1-18. 2011.

KLEVECZ, R. Quantized generation time in mammalian cells as an expression of the cellular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976, v. 73, n. 11, p. 4012-4016. 1976.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 181, n. 2, p. 61-72. 2012.

KUMEI, Y.; NAKAJIMA, T.; SATO, A.; KAMATA, N.; ENOMOTO, S. Reduction of G1 phase duration and enhancement of c-myc gene expression in HeLa cells at hypergravity. **Journal of cell science**, v. 93, n. 2, p. 221-226. 1989.

LANDRY, J. J.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STÜTZ, A. M.; GAGNEUR, J. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, p. g3. 113.005777. 2013.

LANGMEAD B.; SALZBERG S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. v. 9, n. 4, p. 357-359. 2012.

LI, Y.; SHAH-SIMPSON, S.; OKRAH, K.; BELEW, A. T.; CHOI, J.; CARADONNA, K. L.....; EL-SAYED, N. M. Transcriptome remodeling in *Trypanosoma cruzi* and human cells during intracellular infection. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511. 2016.

LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; ACOSTA, N.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; SEGOVIA, M.,; GAUNT, M. W. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 9, p. e510. 2009.

LOW, H. P.; PAULIN, J. J.; KEITH, C. H. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. **The Journal of protozoology**, v. 39, n. 4, p. 463-470. 1992.

MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J.; TEIXEIRA, M. M.; FACTOR, S. M.,; GARG, N. J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H. O.; BISHOP, J. R.....; STERN, L. S. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **Rna**, v. 6, n. 2, p. 163-169. 2000.

MANQUE, P. A.; PROBST, C.; PEREIRA, M. C. D. S.; RAMPAZZO R., R.; OZAKI, L. S.; PAVONI, D. P.....; ALVES, J. M. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infection and immunity**. 2011.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C. V.; VELUDO, H. H.; DA SILVA, F. M.....; TEIXEIRA, M. M. G. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by

phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641-655. 2009a.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C....; LLEWELLYN, M. S. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCI1c: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1265-1274. 2009b.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327-329. 1993.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of parasitology**, p. 475-482. 1978.

MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, C.; CRAMER, S.; TRUMPFHELLER, C.; FLEISCHER, B....; FROSCH, S. *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. **Clinical and experimental immunology**, v. 110, n. 3, p. 378-385. 1997.

MILES, M. A.; POVOA, M. M.; PRATA, A.; CEDILLOS, R. A.; DE SOUZA, A. A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause venezuelan and brazilian forms of chagas' disease? **The Lancet**, v. 317, n. 8234, p. 1338-1340. 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 05 setembro. 2018.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Secretaria de Vigilância em saúde, **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.

MONTEÓN V. M.; FURUZAWA-CARBADELLA J.; ALEJANDRE-AGUILAR R.; ARANDA-FRAUSTRO A.; ROSALESENCINA J. L.; REYES P. A. American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. **Experimental parasitology**, v. 83, n. 3, p. 267-274. 1996.

MOORE-LAI, D.; ROWLAND, E. Microarray data demonstrate that *Trypanosoma cruzi* downregulates the expression of apoptotic genes in BALB/c fibroblasts. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 893-895. 2004.

MOTT, G. A.; BURLEIGH, B. A. The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. **Subcell. Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**, p. 165-173. 2008.

MUKHERJEE, S.; BELBIN, T. J.; SPRAY, D. C.; IACOBAS, D. A.; WEISS, L. M.; KITSIS, R. N....; TANOWITZ, H. B. Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. **Parasitology research**, v. 91, n. 3, p. 187-196. 2003.

MUTZ K. O.; HEILKENBRINKER A.; LÖNNE M.; WALTER J. G.; STAHL F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22-30. 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **TcruziDm28cPB1**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002219105.2>. Acesso em: 18 novembro. 2018.

NDE, P. N.; SIMMONS, K. J.; KLESHCHENKO, Y. Y.; PRATAP, S.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Silencing of the laminin γ -1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and immunity**, vol. 74, n. 3, p. 1643-1648. 2006.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic Surface Molecule gp82 in Adhesion to Gastric Mucin and Invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 557-561. 2003.

OCAÑA-MAYORGA, S.; LLEWELLYN, M. S.; COSTALES, J. A.; MILES, M. A.; GRIJALVA, M. J. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e915. 2010.

PARSONS, M.; NELSON, R. G.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 309-316. 1984.

PASTRO, L.; SMIRCICH, P.; DI PAOLO, A.; BECCO, L.; DUHAGON, M. A.; SOTELO-SILVEIRA, J.; GARAT, B. Nuclear compartmentalization contributes to stage-specific gene expression control in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 5, p. 8. 2017.

PEREIRA, M. C. S.; SINGER, R. H.; DE MEIRELLES, M. D. N. S. *Trypanosoma cruzi* infection affects actin mRNA regulation in heart muscle cells. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 2000, v. 47, n. 3, p. 271-279. 2000.

PERRY, K. L.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 23, p. 8190-8194. 1987.

RAMÍREZ, J. D.; GUHL, F.; RENDÓN, L. M.; ROSAS, F.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e899. 2010.

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

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402. 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883-889. 2000.

RIBEIRO, M.; NITZ, N.; SANTANA, C.; MORAES, A.; HAGSTRÖM, L.; ANDRADE, R....; HECHT, M. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, v. 162, p. 1-6. 2016.

ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Front Biosci**, v. 8, p. e94-109. 2003.

RUIZ, C. R.; FAVORETO, S.; DORTA, L. M.; OSHIRO, E. M.; FERREIRA, T. A.; MANQUE, M. P.; Yoshida, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p. 505-511. 1998.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 147-159. 2013.

SANTANA, R. A. G.; MAGALHÃES, L. K. C.; MAGALHÃES, L. K. C.; PRESTES, S. R.; MACIEL, M. G.; DA SILVA, G. A. V....; GUERRA, J. A. O. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 267. 2014

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M.; LIMA, A. P. C.; MORROT, A....; MÜLLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289-1300. 2000.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitology Today**, v. 9, n. 6, p. 218-222. 1993.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 645-654. 1991.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 101, n. 4, p. 895-905. 1992.

SCHÜRCH, N.; HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 6, p. 3668-3675. 1994.

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. **Parasitology research**, v. 102, n. 4, p. 715-722. 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; BRISOLA MARCONDES, C.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C. P...; LOPES, M. H. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351-357. 1991.

SILVA, J. S. D.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169-174. 1992.

SIMPSON, L. Structure and function of kinetoplast DNA. **The Journal of protozoology**, v. 20, n. 1, p. 2-8. 1973.

SMIRCICH, P.; EASTMAN, G.; BISPO, S.; DUHAGON, M. A.; GUERRA-SLOMPO, E. P.; GARAT, B....; SOTELO-SILVEIRA, J. R. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 443. 2015.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 3, p. 269-279. 2003

SUTTON, R. E.; BOOTHROYD, J. C. Evidence for trans splicing in trypanosomes. **Cell**, v. 47, n. 4, p. 527-535. 1986.

TAN, T. H.; PACH, R.; CRAUSAZ, A.; IVENS, A.; SCHNEIDER, A. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 11, p. 3707-3717. 2002.

TANOWITZ, H. B.; GUMPRECHT, J. P.; SPURR, D.; CALDERON, T. M.; VENTURA, M. C.; RAVENTOS-SUAREZ, C....; BERMAN, J. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 3, p. 598-603. 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017-1022. 1994.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J. A.; HEUSER, J. E.; ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-1130. 1992.

TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The challenges of Chagas disease—Grim outlook or glimmer of hope? **PLoS medicine**, v. 4, n. 12, p. e332. 2007.

THOMAS, S.; GREEN, A.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A.; MYLER, P. J. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 152. 2009.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85-104. 1998.

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Revista médica de Chile**, v. 139, n. 2, p. 258-266. 2011.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481. 2001.

VAN KUPPEVELD, F. J.; JOHANSSON, K. E.; GALAMA, J. M.; KISSING, J.; BÖLSKE, G.; VAN DER LOGT, J. T.; MELCHERS, W. J. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 1, p. 149-152, 1994.

VILLALTA, F.; MADISON, M. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; NDE, P. N.; LIMA, M. F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 3714. 2008.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host-cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: Role of cell surface galactose residues. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 119, n. 1, p. 228-235. 1984.

VITALE D. Interpreting mRNA electropherograms. **Agilent Technologies**, 2001.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, 2009, v. 10, n. 1, p. 57. 2009.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 255. 2009.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 527-543. 2005.

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 618. 2012.

WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J. L.; BLANGERO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Genetic epidemiology of Chagas disease. **Advances in parasitology. Academic Press**, v. 75, p. 147-167. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>>. Acesso em: 05 setembro. 2018a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 05 setembro. 2018b.

YOSHIDA, N., CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Sub-Cellular Biochemistry**, p. 82-91, 2008.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111. 2006.

ZHAO, Y.; LV, W.; PIAO, H.; CHU, X.; WANG, H. Role of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 34, n. 4, p. 254-260. 2014.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. D. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O....; MILES, M. A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision

meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054. 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; ANDRADE, S. G. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253. 2012.