

ANDRÉ NICOLAU AQUIME GONÇALVES

**ANÁLISE GLOBAL DO TRANSCRIPTOMA DE PEQUENOS  
RNAs E RNAs MENSAGEIROS DURANTE A INTERAÇÃO  
MACRÓFAGO-*Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte

28 de Junho de 2016

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática

**ANÁLISE GLOBAL DO TRANSCRIPTOMA DE PEQUENOS  
RNAs E RNAs MENSAGEIROS DURANTE A INTERAÇÃO  
MACRÓFAGO-*Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioinformática.

ANDRÉ NICOLAU AQUIME GONÇALVES

Belo Horizonte  
28 de Junho de 2016

043

Gonçalves, André Nicolau Aquime.

Análise global do transcriptoma de pequenos RNAs e RNAs mensageiros durante a interação Macrófago-Trypanosoma cruzi [manuscrito] / André Nicolau Aquime Gonçalves. – 2016.

119 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: João Trindade Marques.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Bioinformática - Teses. 2. Sequência de Bases. 3. MicroRNAs. 4. Genes. 5. Trypanosoma cruzi. I. Marques, João Trindade. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 573:004

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”.

Sócrates

## **Agradecimentos**

Ao prof. João Marques pelo acolhimento, paciência e ensino durante os quatro anos do doutorado, os quais foram determinantes para me tornar o profissional que sou hoje.

A profa. Fabíola pelo ótimo convívio no laboratório e pela colaboração realizada.

Aos meus amigos do laboratório de RNA de Interferência pelas contribuições científicas e pelo excelente convívio dentro e fora do laboratório.

Ao programa de Pós-Graduação de Bioinformática representado pelo excelente coordenador Prof. Vasco e pelas secretarias Sheila e Natália, os quais sempre foram presentes e atenciosos com os alunos.

Ao prof. Eric Miska, do Instituto Gurdon em Cambridge na Inglaterra, que me recebeu e orientou durante o doutorado sanduíche. A todos os pós-docs, doutorandos e apoio técnico pelo apoio científico e pessoal durante a minha estadia.

Agradeço a minha família em geral por participarem de forma direta ou indireta na minha formação como um bom profissional e, mais importante, como uma boa pessoa. Especialmente aos meus pais, José Maria Dias Gonçalves e Maria Benedita Pantoja Aquime Gonçalves, pelo apoio incondicional ao longo da minha jornada acadêmica e principalmente nas dificuldades. Aos meus irmãos, Paulo José Aquime Gonçalves e Daliane Aquime Gonçalves, por todos os momentos fantásticos vividos nesses poucos 30 anos de vida. A minha namorada, Ana Paula Pessoa Vilela, agradeço amorosamente pela compressão da minha ausência quando estava estudando ou trabalhando na madrugada, pelo apoio nos momentos bons e nos momentos ruins durante esta jornada, e por me agradecer com uma nova família, amo muito você.

## Sumário

Resumo .....	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras .....	9
Lista de Tabelas.....	15
Equações.....	18
1 Introdução.....	19
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
1.1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas .....	19
1.1.2 O agente etiológico.....	20
1.2 Interação parasito hospedeiro.....	22
1.3 A via de RNA de Interferência .....	25
1.4 Vias de RNAi em animais.....	27
2 Justificativa.....	32
3 Objetivos.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4 Metodologia.....	34
4.1 Cultivo de células LLC-MK2 e <i>T. cruzi</i> cepa CLBrenner .....	34
4.2 Cultivo de células L-929 .....	34
4.3 Macrófagos derivados da medula óssea.....	35
4.4 Infecção dos macrófagos derivados da medula óssea com formas tripomastigotas da cepa CLBrenner: cinética de infecção .....	36
4.5 Extração de RNA .....	37
4.6 Quantificação de RNA por NanoDrop e BioAnalyzer.....	38
4.7 Transcrição reversa .....	38
4.8 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	38
4.9 Preparo do RNA para sequenciamento de nova geração por Illumina .....	40
4.10 Análises de bioinformática.....	40
4.11 Análises estatísticas.....	43
5 Resultados e discussão.....	44
5.1 Padronização da cinética de infecção .....	44
5.2 Análise Bioinformática dos pequenos RNAs .....	51
5.2.1 Análise das sequências mapeadas no genoma do <i>T. cruzi</i> .....	53
5.2.2 Análise dos pequenos RNAs mapeados no genoma do <i>Mus musculus</i> ....	57
5.3 Transcriptoma de RNAs mensageiros durante a infecção .....	80
5.4 Busca por alvos preditos e validados para os miRNAs diferencialmente expressos.....	85
5.5 Análise do comportamento dos alvos para miRNAs expressos diferencialmente .....	87
5.6 Análise de vias enriquecidas nos genes regulados positivamente ao longo da infecção .....	93
5.7 Correlação da expressão dos alvos no transcriptoma por genes ou vias.....	101
5.8 Discussão geral .....	106
6 Conclusões.....	108

7	Perspectivas .....	109
8	Bibliografia.....	110
9	Trabalhos desenvolvidos em colaboração durante o doutorado .....	117
9.1	Projeto: Análise da expressão diferencial de microRNAs em Macrófagos derivados da medula óssea infectados com bactéria intracelular <i>Brucella abortus</i> 117	
9.2	Projeto: Identificação de microRNAs com expressão alterada em Camundongos modelos para a Doença de Huntington.....	117
9.3	Projeto: Identificação de genes regulados por heme em macrófagos murinos 118	
9.4	Identificação e Caracterização da Argounata TcPIWI e de Pequenos RNAs em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	119

## Resumo

A doença de Chagas é causada pelo parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*, que é capaz de infectar vários tipos celulares. A interação inicial entre parasito e hospedeiro envolve a ativação de vias responsáveis pela internalização do parasito, resposta imune inata do hospedeiro e o combate aos parasitos intracelulares. Diversas mudanças na expressão gênica acontecem na célula hospedeira em resposta ao patógeno e vice-versa. As vias de RNA de interferência (RNAi) estão relacionadas à regulação pós-transcricional da expressão gênica mediada por pequenos RNAs não codificantes como os microRNAs (miRNAs), que permitem um ajuste fino de várias respostas biológicas e são alteradas em infecções parasitárias. Macrófagos infectados por *Leishmania sp.* ou *Toxoplasma sp.* tem a expressão alterada de miRNAs que regulam a resposta à estes parasitos. Até o momento, não há descrição do papel de miRNAs durante a infecção do *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos. Neste trabalho, realizamos o sequenciamento de pequenos RNAs de macrófagos murinos infectados com o parasito *Trypanosoma cruzi* nos tempos de 2, 4, 8 e 48 horas após infecção, para avaliar a expressão geral do transcriptoma de pequenos RNAs, especialmente os miRNAs do hospedeiro. A expressão da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  foi avaliada como indicador da resposta imune inata durante a infecção, bem como o crescimento dos parasitos intracelulares. Não houve mudanças qualitativas no perfil de pequenos RNAs derivados do genoma do parasito ao longo da infecção. Em contraste, entre os pequenos RNAs do hospedeiro, observamos a expressão diferencial de vários miRNAs entre os tempos de 2 e 48 horas. Dos 18 miRNAs que apresentaram expressão diferencial em algum tempo da infecção, somente 1 foi expresso positivamente em pelo menos dois tempos analisados, o miR-34c-5p. Identificamos pela ferramenta TargetScan e pela base de dados StarBase, alvos preditos e validados para os miRNAs diferencialmente expressos e utilizamos os alvos encontrados em ambos para o estudo das funções dos miRNAs. A análise de enriquecimento dos mRNAs alvos para vias biológicas sugerem que os miRNAs estão relacionados com vias como, sinalização de TGF- $\beta$ , atividade transcricional das Smads, cascata de sinalização de PI3K, sinalização de morte celular via JNK bem como a ativação de NF $\kappa$ B via TRAF6. O miR-34c-5p mostrou regulação positiva significativa ao longo da infecção e validamos a expressão por RT-qPCR. A análise dos mRNAs alvos do miR-34c-5p mostrou enriquecimento para processos biológicos como resposta de apoptose e sinalização por Notch. Como os miRNAs agem através da regulação da estabilidade de seus mRNAs alvos, o transcriptoma dos macrófagos após 4 e 8 horas de infecção foi sequenciado e analisado. Ao todo, 274 mRNAs foram regulados: 33 foram regulados negativamente e 241 foram regulados positivamente em algum dos tempos analisados. Entretanto, não houve nenhuma correlação direta, positiva ou negativa, entre os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos durante a infecção e sua expressão no transcriptoma. Apesar disto, nós observamos a intersecção de vias biológicas enriquecidas para os mRNAs alvos dos miRNAs diferencialmente expressos e vias biológicas enriquecidas para os mRNAs diferencialmente expressos no transcriptoma. As vias biológicas enriquecidas foram, sinalização de Rho GTPases, transporte de membrana, controle do ciclo celular, sinalização por Notch e transporte e modificação pelo complexo de Golgi. Assim, os miRNAs induzidos pela infecção do *T. cruzi* em macrófagos estão, provavelmente, envolvidos no ajuste fino de atividades das vias biológicas importantes na resposta à infecção, podendo atuar como reguladores indiretos dos componentes dessas vias. Como perspectiva futura, os miRNAs diferencialmente expressos serão bloqueados e avaliados o seu impacto na resposta à infecção pelo *T. cruzi* em macrófagos murinos.

## Abstract

Chagas disease is caused by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*, which is capable of infecting several cell types. The initial interaction between parasite and host involves the activation of pathways responsible for the internalization of the parasite, the innate immune response of the host and the fight against intracellular parasites. Several changes in gene expression occur in the host cell in response to the pathogen and vice versa. Interfering RNA pathways (RNAi) are related to post-transcriptional regulation of gene expression mediated by small non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs), which allow fine-tuning of various biological responses and are altered in parasitic infections. Macrophages infected with *Leishmania* sp. or *Toxoplasma* sp. has the altered expression of miRNAs that regulate the response to these parasites. To date, there is no description of the role of miRNAs during *Trypanosoma cruzi* infection in murine macrophages. In this work, we performed the sequencing of small RNAs from murine macrophages infected with the parasite *Trypanosoma cruzi* at 2, 4, 8 and 48 hours after infection to evaluate the general expression of the transcriptome of small RNAs, especially the host miRNAs. Expression of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  was evaluated as an indicator of the innate immune response during infection, as well as the growth of intracellular parasites. There were no qualitative changes in the profile of small RNAs derived from the genome of the parasite throughout the infection. In contrast, among the small host RNAs, we observed the differential expression of several miRNAs between the times of 2 and 48 hours. Of the 18 miRNAs that showed differential expression at some time of infection, only 1 was expressed positively in at least two analyzed times, miR-34c-5p. We identified the predicted and validated targets for the miRNAs differentially expressed by the TargetScan tool and the StarBase database, and used the targets found in both for the study of miRNAs functions. The enrichment analysis of target mRNAs for biological pathways suggests that miRNAs are related to pathways such as TGF- $\beta$  signaling, Smads transcriptional activity, PI3K signaling cascade, signaling of cell death via JNK as well as the activation of NF $\kappa$ B via TRAF6. The miR-34c-5p showed significant positive regulation throughout the infection and validated the expression by RT-qPCR. Analysis of miR-34c-5p target mRNAs showed enrichment for biological processes as apoptosis response and Notch signaling. As the miRNAs act by regulating the stability of their target mRNAs, the macrophage transcriptome after 4 and 8 hours of infection was sequenced and analyzed. In all, 274 mRNAs were regulated: 33 were down-regulated and 241 were down-regulated at any of the times analyzed. However, there was no direct correlation, either positive or negative, between the miRNA targets differentially expressed during infection and their expression in the transcriptome. In spite of this, we observed the intersection of enriched biological pathways for the mRNAs targets of the differentially expressed miRNAs and biological pathways enriched for the mRNAs differentially expressed in the transcriptome. Enriched biological pathways were Rho GTPases signaling, membrane transport, cell cycle control, Notch signaling and transport and modification by the Golgi complex. Thus, the miRNAs induced by *T. cruzi* infection in macrophages are probably involved in the fine-tuning of activities of the biological pathways important in the response to infection and may act as indirect regulators of the components of these pathways. As a future perspective, differentially expressed miRNAs will be blocked and evaluated for their impact on *T. cruzi* infection response in murine macrophages.

## Lista de Figuras

- Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas no mundo. Distribuição de indivíduos infectados em países endêmicos e não endêmicos, mostrando que a doença de Chagas não é mais exclusiva dos países latinos onde há registros do inseto vetor (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). .....19
- Figura 2 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O inseto vetor durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado, pode adquirir formas tripomastigotas sanguíneas. Ao longo do trato digestivo do inseto vetor o *T. cruzi* passa pelas formas epimastigota e tripomastigota metacíclicos, no intestino médio e posterior, respectivamente. Os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes ou urina durante ou logo após o repasto sanguíneo e contaminar o hospedeiro pelo local da picada ou mucosa. Após alcançar a corrente sanguínea o *T. cruzi* tem capacidade de infectar diversos tipos celulares mudando para a forma amastigota. A replicação das amastigotas multiplicam por fissão binária até não houver mais espaço intracelular, mudando para a forma tripomastigota e rompendo a célula para retomar o ciclo de vida (Adaptado de ASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). .....22
- Figura 3 – Resposta imunidade inata e adquirida na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. A resposta imunidade inata é crucial como a primeira barreira de resistência contra infecções. Células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas e células NK) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) além de moléculas efetoras (RNIs) para o controle da replicação parasitária. Por outro lado, células dendríticas do sistema imune inato realiza a conexão entre imunidade inata e adquirida, com a produção de IL-12 e na diferenciação e expansão de células T *helper* 1 (Th1) CD4+ bem como células T CD8+ e células plasma B. IFN- $\gamma$  produzidos por essas células levam a ativação de mecanismos efetores em macrófagos para destruição dos parasitos intracelulares. Anticorpos produzidos pelas células B levam a lise dos parasitos extracelulares ou facilitando a fagocitose dos parasitos opsonizados com IgG. Adaptado do paper: (JUNQUEIRA et al., 2010). .....24
- Figura 4 – Modelo simplificado da via de RNAi. Os pequenos RNAs podem ser originados de diversas fontes para a ativação das vias de RNAi. O processamento dos pequenos RNAs não codificadores (ncRNA) podem ter natureza fita simples longa de RNA (ssRNA) ou dupla fita longa de RNA (dsRNA). No caso dos precursores dsRNA, enzimas de RNase III, tais como Dicers e Droshas estão envolvidas na biogênese dos pequenos ncRNAs. No caso dos precursos ssRNA, não há evidências de quais enzimas estão envolvidas no processamento dos pequenos ncRNAs. Após o processamento os pequenos ncRNA são carregados nas proteínas Ago para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Uma das fitas é escolhida no processo da associação entre o ncRNA e a Ago, denominando como fita “guia” e a fita não carregada denominada fita “passageira”. A formação do complexo RISC mediará o reconhecimento da sequência específica em alvos potenciais e implicará na função biológica baseado no conjunto de alvos regulados (BATISTA; MARQUES, 2011). .....26
- Figura 5 – Sítios complementares canônicos dos miRNAs. Sítio 6mer corresponde a complementariedade perfeita da *seed* do miRNA (nucleotídeo 2 a 7) com sequência 3' UTR do mRNA alvo. Sítio 7mer-m8 corresponde a complementariedade perfeita na *seed* do miRNA na posição de 2 a 8 do miRNA. Sítio 7mer-A1 corresponde a complementariedade nas posições de 1 a 7 do miRNA e na presença de uma Adenina na posição complementar do mRNA na

posição 1. Sítio 8mer combina os sítios 7mer-A1 e 7mer-m8 com complementariedade de 8 nucleotídeos. ....	29
Figura 6 – Desenho experimental da cinética de infecção. Macrófagos derivados da medula óssea e infectados com <i>T. cruzi</i> MOI 5:1. Amostras coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção foram submetidas a extração/quantificação do RNA, síntese do cDNA e avaliação dos genes do hospedeiro e patógeno por RT-qPCR. ....	37
Figura 7 – Pipeline de análise do transcriptoma de pequenos RNAs. Reads brutas foram tratadas retirando sequências adaptadoras do sequenciamento e selecionadas por tamanho. As reads filtradas foram mapeadas contra o genoma do <i>Mus musculus</i> e <i>T. cruzi</i> concatenados. As reads mapeadas foram anotadas para os genes dos dois genomas. Os miRNAs foram normalizados pela equação 4 e 5 e determinado os miRNAs diferencialmente expressos entre amostras infectadas e controle. ....	42
Figura 8 – Multiplicação do <i>T. cruzi</i> intracelular na cinética de infecção em macrófagos murinos determinado por microscopia óptica. Macrófagos plaqueados em lamínulas circulares e fixados com kit panótico. Nos tempos 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção (h.a.i.) contém esferas escuras no citoplasma celular no qual corresponde aos parasitos intracelulares. Foi determinada a quantidade de células infectadas, controle e parasitos intracelulares por microscopia invertida. A amostra controle foi coletada no tempo de 1 hora após a infecção. As setas vermelhas indicam os parasitos intracelulares. ....	44
Figura 9 – Representação gráfica do número relativo de parasitos intracelulares na cinética de infecção em macrófagos. Relação do total de parasitos intracelulares e total de células contadas multiplicado pelas células infectadas. ....	46
Figura 10 – Análise da qualidade da extração pela quantificação do RNA total no NanoDrop. Amostras quantificadas no equipamento NanoDrop com 1,5 µL de RNA. As amostras com a letra C no início correspondem a amostras controle (barras brancas) e amostras com a letra I no início correspondem a amostras infectadas (barras pretas). ....	46
Figura 11 – Amplificação do gene constitutivo Rpl32 de <i>M. musculus</i> mostrando homogeneidade da extração do RNA total. Sinal de RT-qPCR para o gene Rpl32 específico da espécie <i>Mus musculus</i> normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e nas amostras RT(-). ....	47
Figura 12 – Amplificação do gene constitutivo Rpl9 do <i>T. cruzi</i> mostrando o crescimento do parasito ao longo da infecção. Sinal de RT-qPCR para o gene Rpl9 normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e amostras RT(-). ....	48
Figura 13 – Amplificação do gene Actina do <i>M. musculus</i> o qual foi alterado nas amostras infectadas em relação ao controle. O Ct de Actina das amostras infectadas e controle foram normalizadas por Rpl32 e realizado teste de significância para amostras não pareadas com <i>t-Student</i> p-valor < 5%. Amostras Controle (NI) e amostras Infectadas (I). ....	49
Figura 14 – Amplificação do gene da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$ e aumento da expressão nas amostras infectadas indicando ativação da resposta imune. O Ct de TNF- $\alpha$ das amostras infectadas e controle foram normalizadas pelo sinal de Rpl32 ao longo da infecção e realizado teste de significância para amostras não pareadas com <i>t-Student</i> p-valor < 5%. Amostras Controle (NI) e amostras Infectadas (I). ....	49
Figura 15 – Estratégia de mapeamento das sequências nos genomas concatenados do <i>M. musculus</i> e <i>T. cruzi</i> . As sequências foram mapeadas considerando zero	

<i>mismatches</i> e permitindo alinhamento múltiplo. Genoma do <i>M. musculus</i> ilustrado na cor verde e as sequências mapeadas exclusivas da mesma, genoma do <i>T. cruzi</i> em roxo e as sequências mapeadas exclusivas da mesma cor e em azul ilustrando as sequências mapeadas em ambos genomas.....	52
Figura 16 – Proporção de mapeamento das bibliotecas de pequenos RNAs presentes no genoma do hospedeiro, patógeno e em ambos. Sequências mapeadas no genoma do <i>Mus musculus</i> (verde) foram detectadas em todas as amostras e <i>T. cruzi</i> (roxo) detectadas apenas nas amostras infectadas ou em ambos os genomas (azul). .....	53
Figura 17 – Os pequenos RNAs de <i>T. cruzi</i> são predominantemente das anotações de rRNA e tRNAs. As sequências mapeadas no genoma do <i>T. cruzi</i> foram distribuídas para as anotações mRNA, snRNA, rRNA, tRNA e sem anotação ao longo da infecção. ....	54
Figura 18 – Distribuição de tamanho das sequências do <i>T. cruzi</i> presentes ao longo da cinética de infecção. O tamanho das <i>sequências</i> mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do <i>T. cruzi</i> . ....	55
Figura 19 – Distribuição de tamanho das sequências de <i>T. cruzi</i> presentes na cinética de infecção normalizado pelo sinal do gene constitutivo do parasito RpL9. O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4. ....	56
Figura 20 – Os pequenos RNAs derivados do genoma do <i>M. musculus</i> foram predominantemente das anotações dos miRNAs. O total de sequências mapeados foram distribuídas em cada biblioteca e cada anotação distribuída segundo sua proporção. De forma geral não há diferenças nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção, somente no tempo de 48 horas há uma diferença grande que pode ser explicada pelo viés de sequenciamento ou o macrófago com grandes alterações gênicas. ....	57
Figura 21 – Distribuição de tamanho dos pequenos RNA identificados por sua origem no genoma de <i>Mus musculus</i> . O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do <i>M. musculus</i> . Não observamos diferença significativa na expressão dos miRNAs ao longo da infecção, apenas no tempo de 48 horas amostra infectada onde apresenta aparente diminuição da expressão dos miRNAs. Mas essa diminuição é explicada por motivos técnicos do sequenciamento. Com o aumento de pequenos RNAs derivados de tRNAs do <i>Mus musculus</i> , a probabilidade de sequenciamento do miRNAs diminui. Quando normalizamos os miRNAs pela expressão total dos miRNAs essa diferença desaparece. ....	58
Figura 22 – Distribuição de tamanho dos miRNAs derivados do <i>Mus musculus</i> ao longo da cinética de infecção. O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) total mapeado nos miRNAs segundo a equação 5. Não houve diferenças visíveis nos tempos precoces, no entanto uma leve diminuição da expressão no tempo de 48h. ....	60
Figura 23 – Distribuição de tamanho das sequências derivadas do tRNA do <i>Mus musculus</i> . O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) total mapeado no genoma segundo a equação 4. Não houve diferenças visíveis nos tempos precoces para amostras infectadas e controle, apenas no tempo de 48h houve aumento de 20 vezes da expressão dos pequenos RNAs derivados de tRNA do <i>Mus musculus</i> . ....	61

Figura 24 – <i>Scatter plot</i> da expressão dos miRNA. Correlação da expressão dos miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Cada círculo em azul representa um miRNA com expressão nas amostras controle e infectadas. ....	64
Figura 25 - <i>Volcano plot</i> para expressão dos miRNAs nos tempos de 2 e 8 horas após a infecção. Comparação da expressão dos miRNA nas amostras infectadas e controle baseado apenas da diferença em <i>foldchange</i> , a biblioteca de 4 horas após a infecção não foi feita em replicas técnicas como as bibliotecas de 2 e 8 horas após a infecção. O histograma as margens do gráfico mostra a distribuição dos miRNAs ao longo da expressão normalizada. ....	66
Figura 26 – Diagrama de <i>Venn</i> para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção. ....	68
Figura 27 – Curva da expressão acumulada dos miRNAs expressos nas bibliotecas de pequenos RNAs. A expressão de sequências dos miRNAs foi ordenada, somada acumulada e representada graficamente. A linha vertical representa o valor de 1% das sequências acumuladas e indicado o limite de número de sequências. Na parte inferior contém o número de miRNAs abaixo e acima do 1% acumulado.	70
Figura 28 – Diagrama de <i>Venn</i> para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção. ....	72
Figura 29 – Análise de dispersão para todas as anotações do <i>M. musculus</i> . Todas as anotações foram utilizadas para determinar a dispersão geral das bibliotecas e contribuir para determinar quais miRNAs possuem tendência de expressão diferencial. ....	73
Figura 30 – Diagrama de <i>Venn</i> para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção. ....	75
Figura 31 – Diagrama de <i>venn</i> para a comparação entre os métodos de seleção de miRNAs diferencialmente expressos. Os miRNAs expressos nas bibliotecas de pequenos RNAs foram submetidos a diferentes métodos como, seleção por <i>foldchange</i> , seleção pela distribuição gaussiana e seleção pela ferramenta DESeq2. ....	77
Figura 32 – <i>Heatmap</i> para os miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Calculado o z-score de cada miRNA na amostra infectadas em relação a amostra controle. ....	78
Figura 33 – Expressão no RNA-Seq e RT-qPCR para o miRNA miR-34c-5p tempo 8 horas. Expressão do miR-34c-5p medida por RT-qPCR normalizada pelo gene Rpl32. Expressão da expressão do miRNA no RNA-Seq pela ferramenta DESeq2. ....	79
Figura 34 – Diagrama de <i>venn</i> para os genes diferencialmente expressos no transcriptoma de 4 e 8 horas após infecção. Os genes regulados positivamente estão representados por 4h Pos ou 8h Pos. Os genes regulados negativamente representados por 4h Neg ou 8h Neg. ....	81
Figura 35 – <i>Heatmap</i> da expressão normalizada pelo DESeq2 para as bibliotecas infectadas e controle do transcriptoma. A expressão dos mRNAs expressos no transcriptoma 4 e 8 horas foi normalizada pelo <i>zscore</i> da linha para construção do <i>heatmap</i> . A coluna com diferentes cores abaixo do dendrograma da linha	

- representa os *clusters* de genes com expressão similar. As duas primeiras colunas correspondem as amostras controle do 4 e 8 horas. As duas últimas colunas correspondem as amostras infectadas do 4 e 8 horas. ....82
- Figura 36 – *Heatmap* da expressão *foldchange* dos mRNAs regulados positivamente nos tempos de 4 e 8 horas após infecção. A expressão do *foldchange* das amostras infectadas em relação ao controle foram utilizadas para a construção do *heatmap*. A coluna com as duas cores (vermelho e preto) abaixo do dendrograma da linha representa os *clusters* de genes com expressão similar. A primeira coluna corresponde a amostra 4 horas e a segunda coluna corresponde a amostra 8 horas. *Cluster* preto corresponde ao “grupo A” no qual os genes regulados positivamente aumentam a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. *Cluster* preto corresponde ao “grupo B” no qual os genes regulados positivamente diminuem a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. ....83
- Figura 37 – *Heatmap* da expressão *foldchange* dos mRNAs diferencialmente nos tempos de 4 e 8 horas após infecção. A expressão do *foldchange* das amostras infectadas em relação ao controle foram utilizadas para a construção do *heatmap*. A primeira coluna corresponde a amostra 4 horas e a segunda coluna corresponde a amostra 8 horas. ....84
- Figura 38 – Diagrama de *venn* para os genes alvos preditos e validados para os miRNAs regulados negativamente e positivamente. Os alvos preditos (circulo azul) foram detectados com a ferramenta TargetScan e alvos validados foram pesquisados na base de dados StarBase (circulo laranja).....86
- Figura 39 – Representação dos genes alvos para os miRNAs regulados positivamente e miR-34c-5p no Top 20 das vias biológicas enriquecidas. O eixo x representa os genes presentes nas vias enriquecidas representadas no eixo y. A) Vias enriquecidas para os genes alvos para os miRNAs regulados positivamente. B) Vias enriquecidas para os genes alvos para o miR-34c-5p.....92
- Figura 40 – Ferramenta *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) para análise de enriquecimento de vias biológicas. A ferramenta DESeq2 avalia o enriquecimento das vias biológicas sem necessidade de definição dos genes diferencialmente expressos. A partir de duas bibliotecas com fenótipos diferentes, calcula-se e ordena-se o *foldchange*. Com esse conjunto de dados o GSEA classifica os genes nas vias biológicas anotadas e por fim, avalia o score de enriquecimento. Quando os genes estão agrupados nas extremidades, o score de enriquecimento apresenta significância estatística. Figura adaptada do (SUBRAMANIAN et al., 2005). ....93
- Figura 41 – Análise de enriquecimento de vias para genes regulados positivamente nos grupos A e B de genes regulados positivamente. Genes regulados positivamente classificados em grupo A e B pelo padrão de expressão nos tempos 4 e 8 horas. Para cada grupo foi realizado o enriquecimento para vias biológicas utilizado o Teste Exato Fisher, considerando valor de p inferior a 5% ..... 100
- Figura 42 – Relação das vias enriquecidas e genes regulados positivamente para os Grupos A e B. Grupo A corresponde ao genes regulados positivamente que aumentaram a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. Grupo B corresponde ao genes regulados positivamente que aumentaram a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. No eixo x corresponde ao genes regulados positivamente para as vias enriquecidas do eixo y. .... 101

Figura 43 – Diagrama de *venn* para as vias enriquecidas dos alvos dos miRNAs regulados positivamente versus as vias enriquecidas do transcriptoma 4 e 8 horas. As vias enriquecidas para os alvos foram determinadas por Teste Exato Fisher e as vias enriquecidas para os genes expressos no transcriptoma foram determinadas pela ferramenta GSEA. Valor de significância inferior a 5%. ....103

Figura 44 – Diagrama de *venn* para as vias enriquecidas dos alvos do miR-34c-5p expresso positivamente versus as vias enriquecidas do transcriptoma 4 e 8 horas. As vias enriquecidas para os alvos foram determinadas por Teste Exato Fisher e as vias enriquecidas para os genes expressos no transcriptoma foram determinadas pela ferramenta GSEA. Valor de significância inferior a 5%. ....103

Figura 45 – Modelo teórico da atividade dos miRNAs diferencialmente expressos e a expressão da via regulada. Os resultados obtidos com o enriquecimento para os alvos dos miRNAs regulados positivamente e alvos para miR-34c-5p comparados com as vias enriquecidas positivamente e negativamente para os mRNAs expressos no transcriptoma 4 e 8 horas. A presença do miRNA (em verde) regula a expressão da via em níveis suficientes para manter a expressão da via na zona ideal (em cinza) e sem o miRNA (em azul) a expressão da via estaria fora da zona ideal..... 105

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Número de genes da família Argonaute em diferentes espécies.....	27
Tabela 2 – Iniciadores para detecção dos genes constitutivos e específicos desenhados pelo software Primer3Plus para RT-qPCR.....	38
Tabela 3 – Número relativo de parasitos intracelulares na cinética de infecção em macrófagos. Em média foram contadas 300 células e classificadas como células infectadas e controle. Percentual de células infectadas foi em relação ao total de células contadas.....	45
Tabela 4 – Descrição geral das bibliotecas de pequenos RNAs sequenciadas utilizadas para análises. Amostras para os tempos 2, 8 e 48 horas foram sequenciadas replicas técnicas (mesma construção de biblioteca sequenciada três vezes). Para a biblioteca de 4 horas foram sequenciadas duplicatas técnica (mesma amostra tratada e não tratada com polifosfatase). As réplicas técnicas foram somadas e agrupadas em uma biblioteca por não apresentarem grande diferenças entre si. Amostras sequenciadas no <i>Gurdon Institute</i> . ....	51
Tabela 5 – MiRNAs diferencialmente expressos selecionados pelo critério de <i>foldChange</i> . Os miRNAs foram normalizados por RPM e o <i>foldchange</i> (amostra infectadas em relação ao controle) calculado para cada miRNA. Apenas aqueles miRNAs que apresentaram <i>foldchange</i> superior a 1,5 vezes foram classificados como diferencialmente expressos.....	67
Tabela 6 – Pré-seleção pela curva acumulada da expressão dos miRNAs. Foi avaliado por anotação automática o número de sequências para cada miRNA, posteriormente ordenados e calculado a expressão acumulada para cada amostra. Os miRNAs com expressão inferior ao valor mínimo para 1% do total acumulado foi descartado para análises posteriores. O total miRNAs representa aqueles miRNAs que foram expressos em cada biblioteca .....	71
Tabela 7 – MiRNAs diferencialmente expressos pelo critério de <i>foldChange</i> para seleção. Os miRNAs foram normalizados por RPM, filtrados pela curva acumulada de expressão e calculado o <i>foldchange</i> (amostra infectada em relação ao controle). Com os valores de <i>foldchange</i> calculamos a curva gaussiana para cada tempo de infecção e calculado significância estatística para cada miRNAs. Aqueles miRNAs com valores de probabilidade (valor de <i>p</i> ) inferiores a 5% foram classificados como diferencialmente expressos.....	72
Tabela 8 – MiRNAs diferencialmente expressos selecionados pelo critério de DESeq2. A expressão de todas as anotações incluindo miRNAs foram utilizados para calcular a dispersão em cada tempo de infecção. A significância estatística foi calculada baseada na dispersão de cada biblioteca e os miRNAs foram classificados como diferencialmente expressos com significância estatística (valor de $p \leq 5\%$ ) .....	74
Tabela 9 – Resumo das bibliotecas de transcriptoma para os tempos de infecção 4 e 8 horas. Sequências mapeadas no genoma do <i>M. musculus</i> e <i>T. cruzi</i> com a ferramenta TopHat com parâmetros padrões.....	80
Tabela 10 – Busca por alvos para os miRNAs diferencialmente expressos. A predição de alvos foi feita com a ferramenta TargetScan onde leva em consideração a sequência da <i>seed</i> para avaliar a interação entre miRNAs e possível alvo. A validação dos alvos foi realizada com a busca na base de dados de sequenciamentos de PAR-CLIP, onde o complexo RISC foi imunoprecipitado e os RNAs associados no complexo sequenciado. O total de alvos preditos ou validados inclui os genes que foram identificados em um ou mais miRNAs e em parênteses corresponde ao total os alvos removendo a duplicidade.....	85

Tabela 11 – Grupos de genes alvos para análise funcional. Genes alvos para os miRNAs diferencialmente expressos foram separados em dois grupos para os miRNAs com regulação positiva, negativa ou somente para o miR-34c-5p. E a expressão dos alvos no transcriptoma 4 ou 8 horas. ....	88
Tabela 12 – Vias enriquecidas para os genes alvos dos miRNAs regulados positivamente. Cada via enriquecida possui a frequência dos genes alvos em relação ao total da via e valor do teste de significância para o enriquecimento. As vias foram filtradas pelo significância estatística com valor de $p \leq 1\%$ e contendo pelo menos 2 genes por via. No total foram 45 vias enriquecidas e as 20 vias mais significativas estão representadas na tabela .....	90
Tabela 13 – Vias enriquecidas para os genes alvos do miR-34c-5p. Cada via enriquecida possui a frequência dos genes alvos em relação ao total da via e valor do teste de significância para o enriquecimento. As vias foram filtradas pelo significância estatística com valor de $p \leq 5\%$ e contendo pelo menos 2 genes por via. No total foram 7 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela .....	91
Tabela 14 – Top 20 das vias enriquecidas para os genes regulados positivamente no transcriptoma 4 horas com a ferramenta GSEA. Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 40 vias enriquecidas e as 20 primeiras vias mais significativas estão representadas na tabela.....	95
Tabela 15 – Vias enriquecidas para os genes regulados negativamente no transcriptoma 4 horas com a ferramenta GSEA. Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 12 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela.....	96
Tabela 16 – Vias enriquecidas para os genes regulados positivamente no transcriptoma 8 horas com a ferramenta GSEA. Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 69 vias enriquecidas e as 20 primeiras vias mais significativas estão representadas na tabela.....	97
Tabela 17 – Vias enriquecidas para os genes regulados negativamente no transcriptoma 8 horas com a ferramenta GSEA. Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 12 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela.....	98
Tabela 18 – Teste Exato Fisher para os alvos dos miRNAs regulados positivamente, negativamente e somente para miR-34c-5p nos grupos de genes regulados positivamente, negativamente ou sem alteração no transcriptoma 4 e 8 horas. Para avaliar se os genes alvos dos miRNAs expressos diferencialmente foram significativamente representados nos mRNAs expressos diferencialmente realizamos o teste exato Fisher. Na coluna Expressão mRNAs contém os grupos	

de mRNAs regulados positivamente, negativamente e sem alteração, o valor entre parênteses representa o número de mRNAs em cada grupo. Nas colunas de Alvos miRs positivos, negativos e miR-34c-5p corresponde ao teste de enriquecimento, onde o valor indica a frequência dos genes alvos em cada grupo do transcriptoma e o valor em parênteses corresponde ao valor de *p* ..... 102

Tabela 19 – Vias compartilhadas entre o alvos dos miRNAs regulados positivamente e grupos de genes regulados negativamente e positivamente no transcriptoma. .... 104

Tabela 20 – Vias compartilhadas entre o alvos do miR-34c-5p e grupos de genes com expressão aumentada no transcriptoma de macrófagos infectados..... 104

## Equações

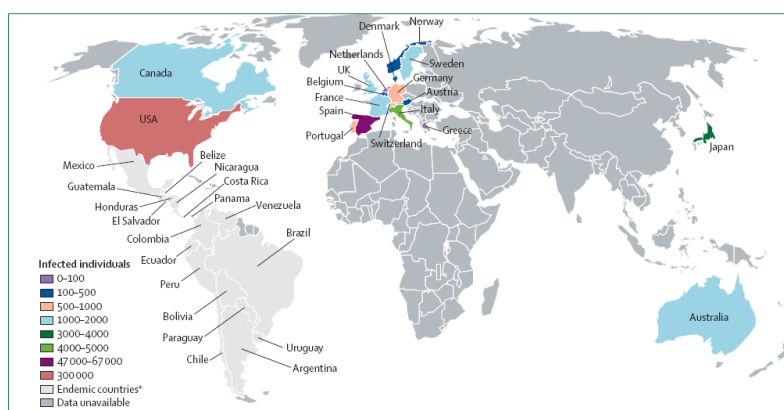
- Equação 1 – Número relativo de parasitos intracelulares (NPR). Cálculo realizado para réplica ( $R_i$ ) na amostra ( $A_j$ ) cujo resultado é a razão do total de parasitos intracelulares (PI) pelo total de células (TC) multiplicado por células infectadas (CI). .....36
- Equação 2 – Normalização gene constitutivo sinal RT-qPCR. Ct de cada amostra dos genes constitutivos subtraídos de 40 (ciclos total do equipamento) e elevado por duas unidades para conversão em expressão relativa (ER). .....39
- Equação 3 – Normalização genes alvo sinal RT-qPCR. Ct de cada amostra dos genes alvos subtraídos pelo Ct dos genes constitutivos de cada amostra e elevado por duas unidades para conversão em expressão relativa (ER). .....39
- Equação 4 – Normalização da expressão do miRNAs. Expressão normalizada pelo total de *reads* mapeadas em cada amostra. A expressão de cada miRNA<sub>i</sub> na amostra<sub>j</sub> foi dividido pelo total mapeado na amostra<sub>j</sub> e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM. ....42
- Equação 5 – Normalização da expressão do miRNAs. Expressão normalizada pelo total de *reads* mapeadas nos miRNAs em cada amostra. A expressão de cada miRNA<sub>i</sub> na amostra<sub>j</sub> foi dividido pelo total dos miRNA na amostra<sub>j</sub> e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM. ....42

# 1 Introdução

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*

### 1.1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pela transmissão do parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) através da transmissão pelos insetos vetores da família *Reduviidae* pertencentes ao gênero *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, mais conhecidos no Brasil como barbeiro. A distribuição da doença é diretamente relacionada à presença do inseto vetor, no entanto, a doença não é mais exclusiva de países endêmicos (Figura 1). Há relatos de pessoas infectadas com *T. cruzi* em países não endêmicos e na ausência do inseto vetor, como nos Estados Unidos da América, Canadá, alguns países no continente Europeu, Austrália e Japão (COURA; VIÑAS, 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A evidência da doença nessas regiões pode ser explicada pelo aumento das viagens, imigrações, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos, e em muitos casos sem o conhecimento do indivíduo (BONNEY, 2014; SCHMUNIS; YADON, 2010). Contudo, o principal meio de transmissão ainda é dado pelos insetos vetores. Os insetos fêmeas do barbeiro após o acasalamento se alimenta do sangue de hospedeiros vertebrados para a maturação dos ovos, os quais são denominados de insetos hematófagos. Durante o repasto sanguíneo o inseto contaminado, ocorre a transmissão das formas infectivas do *T. cruzi* nas fezes e as mesmas alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro pela lesão provocada pelo inseto, por lesões existentes ou pelas mucosas (boca ou olhos) (SALOMON, 2012).



**Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas no mundo.** Distribuição de indivíduos infectados em países endêmicos e não endêmicos, mostrando que a doença de Chagas não é mais exclusiva dos países latinos onde há registros do inseto vetor (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O indivíduo infectado pode desenvolver duas fases da doença: a fase aguda ou a fase crônica. A fase aguda é determinada pela alta carga de parasitos no sangue, em torno de 1 a 2 meses após a infecção. Na maioria dos casos a doença é assintomática ou, em proporções menores, associada com febre, hepatoesplenomegalia e edema (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Quando a doença é diagnosticada na fase aguda, o indivíduo pode alcançar a cura pelo tratamento com medicamentos. Por outro lado, a fase crônica é caracterizada pela baixa carga de parasitos no sangue ou nos tecidos, sendo possível a detecção por técnicas de imunohistoquímica ou de amplificação de DNA do parasito. Esta fase apresenta as seguintes fases clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista, sendo a indeterminada mais frequente (JONES et al., 1993; LAGES-SILVA et al., 2001; VAGO et al., 1996). Na fase crônica surgem as lesões irreversíveis no coração, esôfago, e/ou cólon, levando o paciente a óbito (RASSI; RASSI; RASSI, 2007). Existem dois medicamentos para o tratamento dos pacientes infectados, benzonidazol e nifurtimox, que são utilizados para a fase aguda ou crônica da doença de Chagas (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005). No Brasil é utilizado apenas o benzonidazol e a eficácia total do tratamento não é garantida e varia bastante (Ministério da Saúde). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015) estima que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* principalmente nos países da América Latina e em torno de 20 a 30% podem desenvolver sintomas.

### **1.1.2 O agente etiológico**

O agente responsável pela doença de Chagas é o *T. cruzi*, um protozoário flagelado unicelular, que contém no citoplasma uma estrutura característica denominada cinetoplasto. O cinetoplasto contém um DNA especial, o kDNA, de onde parte um flagelo curto ou longo de acordo com a morfologia do parasito.

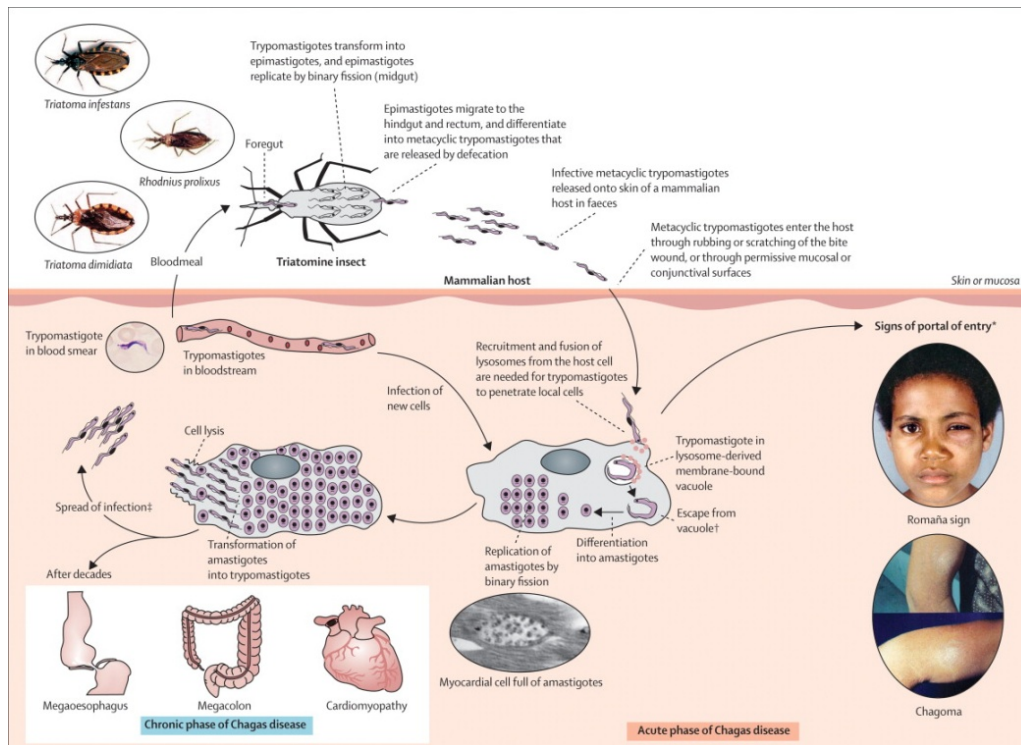
Animais vertebrados, tais como os mamíferos, são caracterizados como reservatórios para o *T. cruzi* e conseqüentemente causam patologia a esses animais. Já nos animais invertebrados, tais como os insetos, são caracterizados como vetores e são responsáveis pela transmissão dos parasitos para outros hospedeiros vertebrados. O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve formas proliferativas e formas altamente diferenciadas com capacidade infectante tanto no hospedeiro vertebrado quanto no inseto vetor (CHAGAS, 1909).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, dividido entre o hospedeiro vertebrado e o inseto vetor. O parasito pode assumir duas formas no hospedeiro vertebrado e duas formas no inseto vetor, caracterizando o ciclo de vida do tipo heteróxico, apresentando três formas morfológicas distintas: tripomastigota, amastigota e epimastigota (LOPES et al., 2010).

O inseto vetor pode adquirir parasitos ao se alimentar de sangue contaminado com formas tripomastigotas sanguíneas (formas infectivas), no qual são digeridos e submetidos ao estresse nutricional ao longo do trato digestivo do inseto. No intestino médio, um ambiente rico em nutrientes, o *T. cruzi* sofre mudança da forma tripomastigota (infectante e não replicante) para epimastigota (não infectante e replicante). A forma epimastigota é capaz de realizar a multiplicação por fissão binária. Posteriormente, os parasitos na forma epimastigotas passam do intestino médio para o intestino posterior e sofrem novamente um estresse nutricional, passando então para a forma tripomastigota metacíclica (forma infectante e não replicante). Os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo realizado pelo o inseto.

No hospedeiro vertebrado, a contaminação ocorre quando os parasitos penetram no local da picada durante o repasto do inseto ou pelas mucosas, e interagem com células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da pele ou mucosa. Na corrente sanguínea os tripomastigotas metacíclicos são capazes de infectar diversos tipos celulares, principalmente pela via de fagocitose. A interação entre o parasito e a célula hospedeira para a internalização é mediada por padrões moleculares e receptores de membrana. Durante a internalização do parasito, lisossomos são recrutados para a região do fagossomo os quais envolvem os parasitos intracelulares, atuando como uma primeira barreira de defesa contra a infecção (BURLEIGH, 2005). Os parasitos intracelulares induzem a formação de um vacúolo parasitóforo, no qual exercem função protetora contra lisossomos durante os primeiros instantes da infecção. Uma vez dentro da célula e envolto pela vacúolo parasitóforo, o parasito muda da forma tripomastigota para a forma amastigota intracelular escapando do vacúolo parasitóforo e, posteriormente, multiplicando-se por fissão binária no citoplasma da célula hospedeira. A multiplicação das formas amastigotas ocorre de forma descontrolada até a superpopulação no interior das células. Nesse ponto, o parasito sofre com o estresse nutricional e populacional passando para a forma tripomastigota, levando ao rompimento da membrana plasmática da célula, liberando os parasitos na

corrente sanguínea (conferindo o nome de tripomastigotas sanguíneas) e infectando novas células para recomençar o ciclo (Figura 2).



**Figura 2 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** O inseto vetor durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado, pode adquirir formas tripomastigotas sanguíneas. Ao longo do trato digestivo do inseto vetor o *T. cruzi* passa pelas formas epimastigota e tripomastigota metacíclicos, no intestino médio e posterior, respectivamente. Os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes ou urina durante ou logo após o repasto sanguíneo e contaminam o hospedeiro pelo local da picada ou mucosa. Após alcançar a corrente sanguínea o *T. cruzi* tem capacidade de infectar diversos tipos celulares mudando para a forma amastigota. A replicação das amastigotas multiplicam por fissão binária até não houver mais espaço intracelular, mudando para a forma tripomastigota e rompendo a célula para retomar o ciclo de vida (Adaptado de ASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

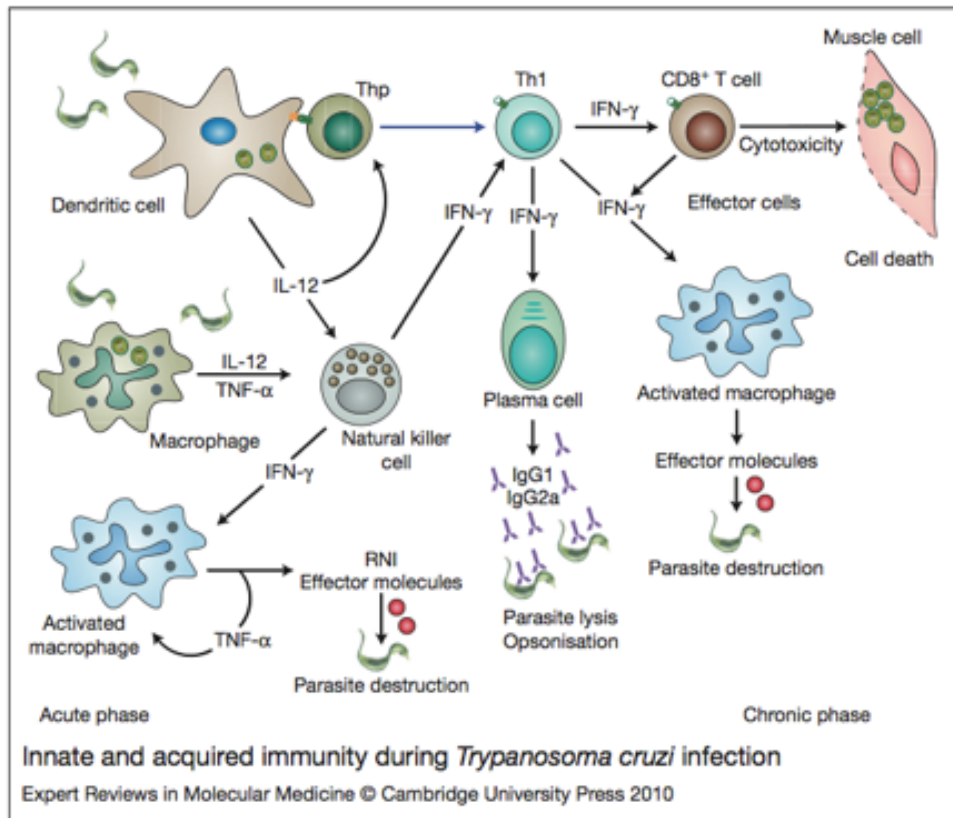
Durante a infecção, o *T. cruzi* possui a capacidade de infectar e replicar em diversos tipos celulares, tais como macrófagos, neurônios, células epiteliais e musculares. As células do sistema imune inato são as primeiras a serem recrutadas para o sítio de infecção, tais como os macrófagos responsáveis pela fagocitose e destruição de micro-organismos e apresentação de antígenos. Entretanto o *T. cruzi* subverte os mecanismos de defesa do hospedeiro persistindo a infecção.

## 1.2 Interação parasito hospedeiro

Durante o estágio agudo da infecção, há a invasão e replicação intracelular bastante ativa em uma variedade grande de tecidos no hospedeiro. A resposta imune

montada pelo hospedeiro é eficaz no controle dos parasitos, mas não elimina totalmente a infecção e os parasitos podem persistir por décadas apresentando baixa parasitemia (caracterizando uma infecção assintomática e crônica) (NAGAJYOTHI et al., 2012). Com o recrutamento das células do sistema imune, os parasitos entram em contato com essas células por meio da adesão de glicoproteínas presente na superfície da membrana dos parasitos e inicia-se o processo de internalização nas células hospedeiras. As glicoproteínas de superfície com propriedade de adesão celular são expressas nas formas tripomastigotas metacíclicas como gp90, gp82, gp30 e gp35/50. Essas moléculas são diferencialmente expressos nas várias cepas de *T. cruzi* e podem ou não aumentar a eficiência de internalização do parasito a depender da variedade e combinação de glicoproteínas presentes na membrana (YOSHIDA, 2006).

A imunidade inata é a primeira barreira de controle da infecção pelo *T. cruzi*. Células do sistema imune inato como os macrófagos, células dendríticas e células NK (*Natural Killer*) são responsáveis pelo reconhecimento dos parasitos e secreção de citocinas como, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Fator Alpha), IL-12 (Interleukina 12) e IFN- $\gamma$  (Interferon Gama) e produção de moléculas efetoras como intermediários reativos de nitrogênio (RNIs do inglês 'reactive nitrogen intermediates') para o controle da replicação dos parasitos intracelulares. As células dendríticas efetuam a ponte entre imunidade inata e adquirida com a produção de, IL-12 necessárias para diferenciação T helper (Th1) CD4+, células T CD8+ e células B. A produção de INF- $\gamma$  por células T helper e células NK levam a ativação de mecanismos efetores em macrófagos para o combate de parasitos intracelulares. A produção de anticorpos por células B levam a lise dos parasitos ou facilitando a fagocitose dos parasitos opsonizados com IgG (GARCÍA-ZEPEDA et al., 2007; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; LUNA-GOMES et al., 2014) (Figura 3). Estudos em camundongos nocautes para receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR9), mostraram aumento da susceptibilidade da infecção pelo *T. cruzi* e um papel importante dos receptores para a resistência as infecções (BAFICA et al., 2006).



**Figura 3 – Resposta imunidade inata e adquirida na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.** A resposta imunidade inata é crucial como a primeira barreira de resistência contra infecções. Células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas e células NK) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) além de moléculas efetoras (RNIs) para o controle da replicação parasitária. Por outro lado, células dendríticas do sistema imune inato realiza a conexão entre imunidade inata e adquirida, com a produção de IL-12 e na diferenciação e expansão de células T *helper* 1 (Th1) CD4+ bem como células T CD8+ e células plasma B. IFN- $\gamma$  produzidos por essas células levam a ativação de mecanismos efetores em macrófagos para destruição dos parasitos intracelulares. Anticorpos produzidos pelas células B levam a lise dos parasitos extracelulares ou facilitando a fagocitose dos parasitos oponizados com IgG. Adaptado do paper: (JUNQUEIRA et al., 2010)

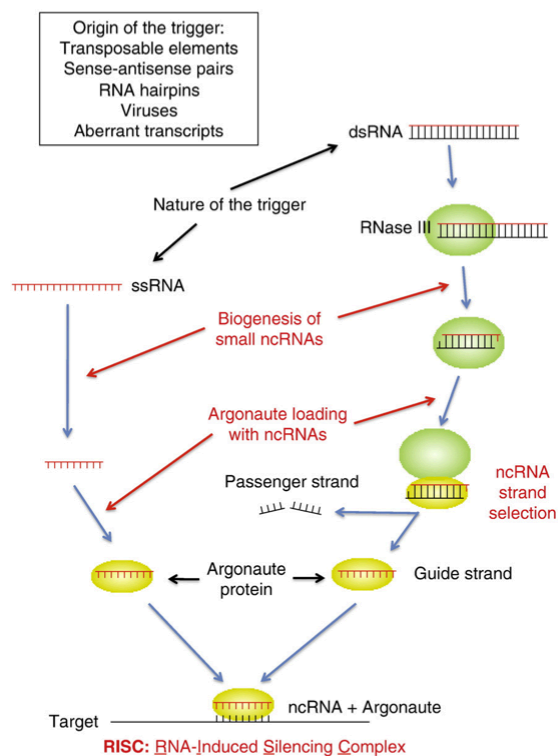
Padrões moleculares derivados do *T. cruzi*, como glycosylphosphatidylinositol (GPI) associados com mucin-like (proteínas de membrana) são reconhecidos por receptores Toll-like (TLR), tais quais, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9.

Após o reconhecimento dos parasitos pela célula hospedeira, ocorre a ativação de fatores de transcrição que aumenta a expressão de genes das vias de combate à infecção como resposta imune e microRNAs. Os microRNAs vem sendo descritos na literatura e exercem papel importante na regulação de componentes das vias de resposta anti-parasitárias, em diversos tecidos e espécies de patógenos (MO et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2015).

### 1.3 A via de RNA de Interferência

A descoberta da via de interferência de RNA (RNAi) revolucionou a nossa compreensão sobre a regulação gênica, revelando um arsenal rico de expressão gênica em diversas condições. A regulação mediada pela via RNAi é composta, principalmente, da presença de pequenos RNAs não codificadores de proteínas, de tamanho em torno de ~20 a 30 nucleotídeos (nt), proteínas acessórias para processamento dos pequenos RNAs e a proteína da família Argonauta (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). A via de RNAi é importante em diversos processos que são comuns tanto em plantas quanto em animais (SHABALINA; KOONIN, 2008). Os pequenos RNAs são associados à proteínas da família Argonauta formando o complexo RISC (do inglês '*RNA-induced silencing complex*' ou Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), no qual bloqueia/silencia pós-transcricionalmente genes com a especificidade conferida pelo emparelhamento de bases nucleotídicas entre o pequeno RNA e o RNA mensageiro (mRNA) alvo (WILSON; DOUDNA, 2013).

A via clássica de RNAi envolve o reconhecimento de RNA de fita dupla por um membro da família RNase do tipo III (CHU; RANA, 2007), tal como a Dicer ou a Drosha, as quais levam a clivagem dos produtos de RNA de fita dupla longa em pequenos RNAs não codificantes de proteínas (ncRNAs do inglês '*non-coding RNA*') em tamanho de 20-30 nucleotídeos (HANNON; ROSSI, 2004). Estes pequenos ncRNAs são incorporados ao complexo RISC, que possui como proteína central, a Argonauta (Ago), que pode levar a degradação ou bloqueio da tradução de mRNAs complementares aos pequenos ncRNAs integrante do RISC (AZIMZADEH; A., 2011). O mRNA alvo é clivado quando há a complementariedade perfeita, atuando como siRNA (do inglês '*small interfering RNA*'), resultando em uma rápida degradação do mRNA alvo e na diminuição da expressão da proteína em questão. Por outro lado o ncRNA pode ficar associado, por complementariedade imperfeita, com o mRNA impedindo o progresso da tradução, atuando como microRNA e na regulação fina da expressão proteica (ULLU et al., 2002) (Figura 4).



**Figura 4 – Modelo simplificado da via de RNAi.** Os pequenos RNAs podem ser originados de diversas fontes para a ativação das vias de RNAi. O processamento dos pequenos RNAs não codificadores (ncRNA) podem ter natureza fita simples longa de RNA (ssRNA) ou dupla fita longa de RNA (dsRNA). No caso dos precursores dsRNA, enzimas de RNase III, tais como Dicers e Droshas estão envolvidas na biogênese dos pequenos ncRNAs. No caso dos precursores ssRNA, não há evidências de quais enzimas estão envolvidas no processamento dos pequenos ncRNAs. Após o processamento os pequenos ncRNA são carregados nas proteínas Ago para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Uma das fitas é escolhida no processo da associação entre o ncRNA e a Ago, denominando como fita “guia” e a fita não carregada denominada fita “passageira”. A formação do complexo RISC mediará o reconhecimento da sequência específica em alvos potenciais e implicará na função biológica baseado no conjunto de alvos regulados (BATISTA; MARQUES, 2011).

A proteína Argonauta foi descoberta e estudada amplamente nos últimos anos, revelando diversos membros da família com função de silenciamento gênico guiado por pequenos RNAs, atuando como proteína central do complexo RISC. A família Argonauta foi primeiramente identificada em plantas e os membros são definidos pela presença dos domínios PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) ou PIWI (BOHMERT et al., 1998). A proteína Argonauta é altamente conservada entre espécies, e muitos organismos codificam múltiplos membros da família (Tabela 1). Os seres humanos possuem oito proteínas Argonautas que formam os clados, Piwi1-4 e Ago1-4. Dentre as proteínas, somente Ago2 possui atividade com sítio de clivagem de RNA (JANOWSKI et al., 2006). Dependendo da Argonauta e do perfil dos pequenos RNAs, a função e os alvos do complexo RISC varia entre os organismos. Há evidências da importância das proteínas da família Argonauta no processo de

regulação gênica em diversos organismos, mesmo sem a presença de proteínas responsáveis pela geração dos pequenos RNAs, como a Dicer ou a Drosha (HALIC; MOAZED, 2010).

**Tabela 1** – Número de genes da família Argonaute em diferentes espécies

<b>Espécie</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Referência</b>
<i>Homo sapiens</i>	8	(SASAKI et al., 2003)
<i>Rattus norvegicus</i>	8	(CARMELL et al., 2002)
<i>Mus musculus</i>	8	(CARMELL et al., 2002)
<i>Drosophila melanogaster</i>	5	(WILLIAMS; RUBIN, 2002)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	27	(YIGIT et al., 2006)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	(HUNTER; SUN; POETHIG, 2003)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	(CARMELL et al., 2002)
<i>Neurospora crassa</i>	2	(CARMELL et al., 2002)
<i>Trypanosoma brucei</i>	2	(LYE et al., 2010)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1	(GARCIA SILVA et al., 2010)

O *T. cruzi* não possui a via clássica de RNAi. No entanto, possui uma cópia da proteína Ago da família PIWI e não possui proteínas responsáveis pelo processamento dos pequenos RNAs (BATISTA; MARQUES, 2011). Porém, é capaz de produzir pequenos RNAs derivados de sequências de tRNAs com tamanho médio de 33 nucleotídeos por algum mecanismo ainda desconhecido (FRANZÉN et al., 2011; GARCIA-SILVA et al., 2010). Estudo realizado por DaRocha e colaboradores tentou utilizar a via RNAi para o silenciamento do gene Amastina e não observou fenótipo nos parasitos transfectados com a construção contendo do dsRNA (DAROCHA et al., 2004).

#### **1.4 Vias de RNAi em animais**

Existem três classes de pequenos RNAs não codificadores de proteínas: siRNA, piRNA (do inglês ‘*Piwi-interacting RNA*’) e miRNAs. A via de siRNA é caracterizada por apresentar complementariedade perfeita, média em torno de 20 nucleotídeos de tamanho dos pequenos RNAs, resulta na degradação dos seus alvos e ter um papel fundamental no controle de infecções virais, como a resposta anti-viral (CAMPBELL et al., 2008). A via de piRNA tem sido descrita como a responsável pelo controle dos elementos transponíveis nos genomas de diversos organismos (HUANG; FEJES TÓTH; ARAVIN, 2017). A via de miRNAs foi descrita,

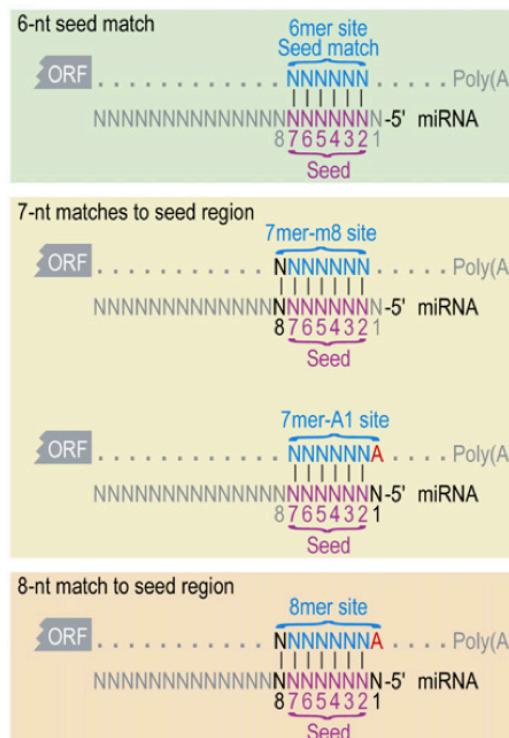
inicialmente, envolvida no controle do desenvolvimento larval de vermes *Caenorhabditis elegans*, revelando dois pequenos RNAs reguladores conhecidos como *lin-4* e *let7* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; REINHART et al., 2000).

A biogênese do miRNA ocorre pela transcrição de genes contendo sequências precursoras de miRNA pela RNA polimerase do tipo II. O RNA transcrito possui a tendência a formar grampos (*hairpins*) pela sua composição nucleotídica. Os *hairpins* são reconhecidos pela Drosha (enzima RNase do tipo III) e clivados em miRNA primário (pri-miRNA) com tamanho médio de 70 nucleotídeos e posteriormente exportado para o citoplasma pela exportina-5. O pri-miRNA, uma vez no citoplasma, é então reconhecido pela Dicer (enzima RNase do tipo III), a qual cliva o precursor formando uma fita dupla de RNA (dsRNA) com média de tamanho de 22 nucleotídeos e 2 nucleotídeos não pareados (*overhang*). Uma das fitas do dsRNA é selecionada e carregada na Argonauta para formar o completo miRISC (do inglês '*miRNA-induced Silencing Complex*') (BARTEL, 2004; SUZUKI et al., 2015). O microRNA associado com a Argonauta pode ser proveniente da região 5' ou 3' do transcrito precursor, denominando o miRNA guia ou passageiro como 5p ou 3p, respectivamente. O controle pós-transcricional é mediado pela associação do complexo miRISC com os mRNAs alvos atuando com a desestabilização do complexo de tradução (BARTEL, 2009). O microRNA associado com a proteína Ago atuam na diminuição da produção de proteínas com a desestabilização do complexo de tradução (GUO et al., 2010).

A função dos microRNAs é determinada pela função do conjunto de mRNAs alvos os quais regulam. Para a predição dos possíveis alvos, as ferramentas de predição utilizam diversas características como, a conservação de pareamento Watson-Crick na região 5' do microRNA, estrutura secundária do RNA e/ou energia de interação. A interação entre o mRNA alvo e o microRNA é determinada primeiramente por uma sequência de 2 a 7 nucleotídeos na região 5', denominada *seed*. A região *seed* é determinante para a classificação dos miRNAs em famílias e na confiabilidade das predições, diminuindo a taxa de falsos positivos (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005)

As interações, entre a *seed* do miRNA e o sítio de ligação no mRNA, são classificadas baseadas na extensão de pareamento (Figura 5). O pareamento perfeito da *seed* com o mRNA alvo é denominado sítio de ligação 6mer. O pareamento da *seed* mais o oitavo nucleotídeo é denominado sítio 7mer-m8 e o pareamento da *seed*

com a adenina na posição 1 é denominado sítio 7mer-A1. Pode ocorrer o pareamento completo da *seed* com 8 nucleotídeos e com a adenina na posição 1, denominado sítio 8mer (GRIMSON et al., 2007; LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005). Além do pareamento da *seed*, a eficiência da ligação é dependente do pareamento do restante do miRNA (região 3'). Portanto, além do sítio de ligação, o pareamento da região 3' do miRNA e a composição de bases no mRNA alvo podem determinar a eficiência de ligação e níveis de regulação dos alvos (GRIMSON et al., 2007).



**Figura 5 – Sítios complementares canônicos dos miRNAs.** Sítio 6mer corresponde a complementariedade perfeita da *seed* do miRNA (nucleotídeo 2 a 7) com sequência 3' UTR do mRNA alvo. Sítio 7mer-m8 corresponde a complementariedade perfeita na *seed* do miRNA na posição de 2 a 8 do miRNA. Sítio 7mer-A1 corresponde a complementariedade nas posições de 1 a 7 do miRNA e na presença de uma Adenina na posição complementar do mRNA na posição 1. Sítio 8mer combina os sítios 7mer-A1 e 7mer-m8 com complementariedade de 8 nucleotídeos.

A regulação da expressão dos miRNAs é, na maioria dos casos, pela causa e efeito de vias celulares. Estas vias são ativadas por receptores responsáveis pelo recrutamento de fatores de transcrições relacionados aos genes de miRNAs e na ativação dos mesmos. Estudos de expressão de miRNA em resposta a várias infecções bacterianas têm revelado um papel importante dessas moléculas para o ajuste fino da expressão de componentes da resposta imune inata do hospedeiro (EULALIO; SCHULTE; VOGEL, 2012). Há relatos de estudos sobre o papel fundamental de

miRNAs mediante a infecções parasitárias, tais como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Schistosoma japonicum* e *Trypanosoma cruzi* (CAI et al., 2014; GHOSH et al., 2013; HAN et al., 2013; LEMAIRE et al., 2013; NAVARRO et al., 2015). Os miRNAs diferencialmente expressos ao longo de infecções parasitárias estavam intimamente relacionados com processos celulares envolvidos na internalização, invasão, replicação e liberação dos parasitos ao longo do seu ciclo de vida.

Estudo da infecção por *Schistosoma japonicum* mostrou, 65 miRNAs identificados como diferencialmente expressos no fígado, baço e pulmões de camundongos. Estes miRNAs foram principalmente relacionados à atividades biológicas como resposta imune, proliferação/diferenciação celular, metabolismo e transdução de sinal. Os autores do trabalho observaram que os miRNAs, miR-494 e miR-30e possuem função pro-apoptótica, anti-apoptótica e reguladores da apoptose, sugerindo que há a indução da apoptose mediante a infecção por *Schistosoma japonicum* (HAN et al., 2013).

Em estudo realizado com *Leishmania major* foi observado miRNAs diferencialmente expressos com 3 e 6 horas após a infecção. Dentre eles, o miR-146a foi induzido pela cascata de sinalização dependente de TLR4 e mostrou regular negativamente transcritos de TRAF6 (do inglês '*TNF receptor-associated family*') e IRAK1 (do inglês '*IL-1 receptor-associated kinase*'), sugerindo que miR-146a controla a expressão exacerbada da resposta inflamatória induzida pela infecção do *L. major*, atuando como um regulador negativo da resposta inflamatória (LEMAIRE et al., 2013).

Macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii* levam à inibição da apoptose pela via STAT3-miR17-92-Bim. Bim atua como molécula pro-apoptótica gerando micro-poros na mitocôndria acarretando na liberação do citocromo C e no processo da apoptose. No entanto, durante a infecção por *T. gondii* a via de TLR4 é ativada fazendo com que STAT3 forme dímeros que são direcionados para o núcleo e atua como fator de transcrição para o cluster de miR-17-92. Os miRNAs pertencentes ao cluster atuam como reguladores negativos de Bim e consequentemente com função anti-apoptótica (CAI et al., 2014).

Estudo realizado por Navarro e colaboradores, avaliou amostras de coração de camundongos C57BL/6 durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* cepa Colombiana e identificaram a expressão de múltiplos miRNAs alterados. Dentre eles, 6 miRNAs

foram correlacionados com parâmetros clínicos, como parasitemia e intervalo da taxa cardíaca máxima (QTc) alteradas. A análise dos alvos para os 6 miRNAs mostraram envolvimento em vias de sinalização relacionados com o aumento da despolarização e repolarização ventricular, fatores importantes para a prolongação dos intervalos de QTc (NAVARRO et al., 2015).

Os miRNAs mostraram papel importante para o ajuste fino de vias biológicas essenciais, como função anti-apoptótica e envolvidos com doenças em estágios iniciais e avançados. A função destes miRNAs são independente de patógenos, mostrando que as células hospedeiras possuem um repertório elevado de possibilidades para a regulação em diferentes tipos de infecções.

## 2 Justificativa

Os genes diferencialmente expressos durante a interação parasito-hospedeiro possuem, em geral, um papel importante no processo da infecção. Parte do controle da expressão gênica ocorre com a ativação da via de RNAi, compostas basicamente pela presença de pequenos RNAs e proteínas da família Argonauta. A via de RNAi atua na regulação pós-transcricional da expressão gênica tanto no hospedeiro como no parasito, por exemplo, durante a infecção de hospedeiros vertebrados pelo parasito *T. cruzi*. Pelo lado do parasito, os pequenos RNAs poderiam ser marcadores de fatores de virulência e influenciar nos mecanismos de resposta do hospedeiro contra a infecção. Pelo lado do hospedeiro, os pequenos RNAs, representados pelos miRNAs, regulam a resposta das células infectadas para determinar a susceptibilidade ou a resistência à infecção. Estudos recentes mostraram que os miRNAs estão envolvidos com processos celulares importantes para a modulação de infecções por diferentes parasitos como *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma japonicum* e *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, não há na literatura a descrição sobre o perfil e o impacto de miRNAs na interação *T. cruzi*-macrófagos.

Visto a dificuldade no tratamento da doença de Chagas e as importantes descobertas feitas em relação às interações de miRNAs e as respostas biológicas contra diversas infecções, propomos analisar a expressão de pequenos RNAs durante tempos precoces na infecção de *T. cruzi* em macrófagos derivados da medula óssea de murinos. Este estudo permite um melhor entendimento do papel dos microRNAs na regulação de vias essenciais para os mecanismos de internalização, processo de metaciclogênese do *T. cruzi*, das vias de combate parasitárias e na resposta imune inata montada pelos macrófagos murinos.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Análise das alterações do transcriptoma de pequenos RNAs e RNA mensageiros durante a infecção de macrófagos murinos pelo parasito *Trypanosoma cruzi*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Padronização do modelo de infecção das formas tripomastigotas de *T. cruzi* em macrófagos murinos;
- Construção e sequenciamento de bibliotecas de pequenos RNAs e RNAs mensageiros preparadas a partir de amostras de macrófagos em diferentes tempos após a infecção com o *T. cruzi*;
- Análises de bioinformática com os dados do sequenciamento para identificar miRNAs e RNAs mensageiros diferencialmente expressos;
- Validação da expressão de miRNAs e RNAs mensageiros diferencialmente expressos;
- Predição e análise de alvos candidatos dos miRNAs diferencialmente expressos;
- Análises de correlação e enriquecimento de vias reguladas por miRNAs e dos RNAs mensageiros diferencialmente expressos.

## 4 Metodologia

### 4.1 Cultivo de células LLC-MK2 e *T. cruzi* cepa CLBrenner

As formas tripomastigotas foram cultivadas em LLC-MK<sub>2</sub> (*Rhesus Monkey Kidney Cells*), obtidas no laboratório da professora Daniella Bartholomeu (Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG), mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 g/L de bicarbonato de sódio, 2,6 g/L de HEPES FREE ACID 25 mM, 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% de L-Glutamina 200mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, em garrafas de cultura (25, 75, 150 cm<sup>2</sup>) e acondicionadas em estufas com ambiente a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para a manutenção das células, o meio de cultura foi desprezado, as células lavadas com PBS 1X e tratadas com solução tripsina contendo 0,2% de EDTA. As células destacadas foram homogeneizadas em meio RPMI 1640 suplementado e distribuídas em garrafas de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> juntamente com meio de cultura. Formas tripomastigotas liberadas de outra cultura celular foi utilizada para inocular as células LLC-MK<sub>2</sub> com relação de 10 parasitos para cada célula. O meio de cultura das células em contato com os parasito foi trocado 24 horas e no quarto dia após a infecção. As formas tripomastigotas liberadas a partir do quinto dia após a infecção foram coletadas do sobrenadante, centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.). O sobrenadante da solução centrifugada foi descartado, o *pellet* ressuscitado em 1 mL, a concentração determinada na câmara de Neubauer e adicionadas na proporção de 10 formas tripomastigotas para cada célula nas garrafas com LLC-MK<sub>2</sub> ou para os ensaios de infecção dos macrófagos.

### 4.2 Cultivo de células L-929

Células L-929 derivadas de camundongos linhagem C3H/An foram cultivadas em meio DMEM completo suplementado com 1% de L-glutamina 200mM (Sigma), 1% de Penicilina e Streptomycina (Sigma), 2.5% de HEPES 1M (ThermoFisher) e 10% SFB. As células foram mantidas em garrafas de cultura em ambiente a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado após 10 dias da segunda passagem, filtrado com membrana de 0,22 µm e armazenado em tubos cônicos de 50 mL no freezer -70°C. O sobrenadante das células L-929 possui o fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), que induz a derivação de células hematopoiética pluripotentes em macrófagos. A solução é denominada de *L929-cell Conditioned Medium* (LCCM).

### 4.3 Macrófagos derivados da medula óssea

Camundongos C57BL/6 de 4 a 6 semanas de vida foram obtidos do Centro de Bioterismo (CeBIO) da UFMG (sob a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA protocolo n° 278/2015) e diagnosticados livres de patógenos pelo CeBIO. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e submersos em álcool 70% para eliminação de qualquer contaminante. Os fêmures e tíbias foram removidos, o tecido muscular retirado e os ossos armazenados em placas de petri mantidos no gelo. As extremidades de cada fêmur ou tíbia foram removidas com auxílio de uma tesoura, o interior dos ossos foram lavados com 5 mL de HBSS (solução salina) 1X ou PBS 1X gelado, a medula óssea foi coletada em tubos cônicos de 50 mL e mantida no gelo. A solução contendo a medula óssea foi centrifugada a 800g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado com 1mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1M (GIBCO) e 1% de penicilina/streptomicina (Sigma). Foram adicionados 12 mL de DMEM suplementado em cada tubo cônico de 50 mL para ressuscitar o *pellet*. A solução foi filtrada para reter quaisquer resíduos de tecidos musculares ou ossos e transferidas para placas de petri, para incubação em estufas com ambiente 37°C e 5% CO<sub>2</sub> *overnight*.

As células não aderidas na placa de petri foram coletadas e centrifugadas a 800g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante da solução centrifugada foi descartado, o *pellet* ressuscitado em 1 mL de DMEM suplementado e determinada a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para o plaqueamento cerca de  $5 \times 10^5$  células por poço para as placas de 24 poços. No quarto dia, foram adicionados 100 µL de LCCM. No sétimo dia, o meio de cultura foi trocado e o novo meio contendo o fator LCCM. Por fim no décimo dia, os macrófagos estavam prontos os ensaios de infecção com *T. cruzi*.

Para determinar a taxa de infecção durante a cinética, foram adicionado lamínulas circulares de 13 mm durante o plaqueamento dos macrófagos no fundo das placas de 24 poços. Após a coleta dos tempos de infecção, as lamínulas foram tratadas com kit corante rápido de células (contendo triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1%, e tiazinhas a 0,1%) e determinada a quantidade de células infectadas, células não infectadas e parasitos intracelulares, através do microscópio óptico de contraste de fase. Para avaliar a infecção ao longo da cinética, calculou-se o número relativo de

parasitos intracelulares pela Equação 1, onde foi determinada pela razão entre parasitos intracelulares e total de células, multiplicado pelo total de células infectadas.

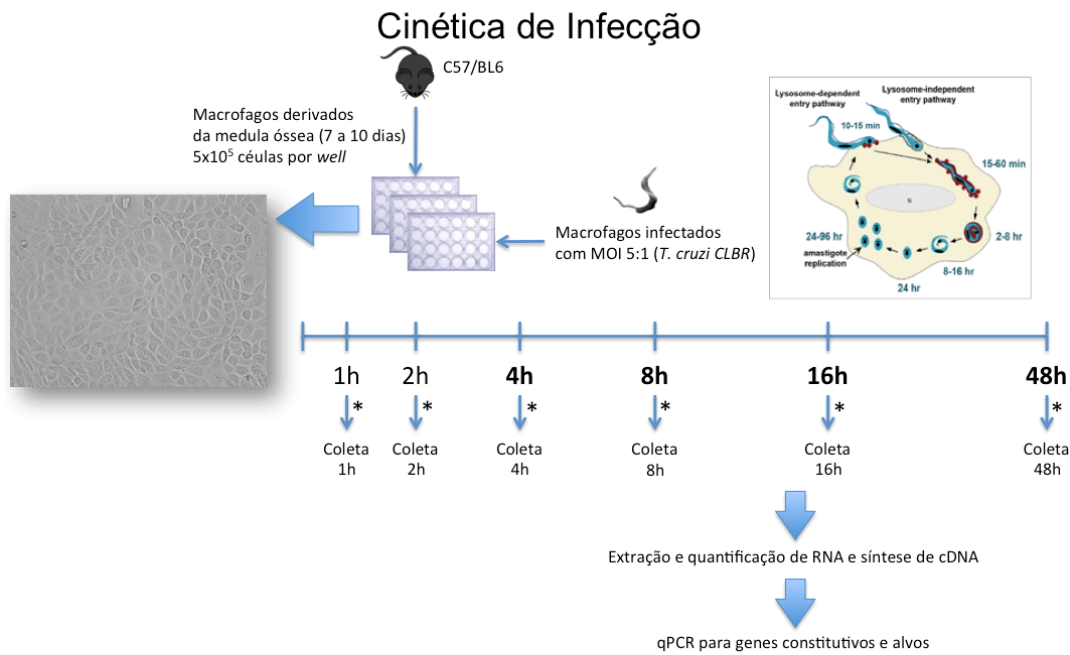
$$NRP(R_i, A_j) = \frac{PI}{TC} \times CI$$

**Equação 1 – Número relativo de parasitos intracelulares (NPR).** Cálculo realizado para réplica ( $R_i$ ) na amostra ( $A_j$ ) cujo resultado é a razão do total de parasitos intracelulares (PI) pelo total de células (TC) multiplicado por células infectadas (CI).

#### **4.4 Infecção dos macrófagos derivados da medula óssea com formas**

##### **tripomastigotas da cepa CLBrenner: cinética de infecção**

As formas tripomastigotas presentes no sobrenadante de cultura de LLC-MK<sub>2</sub> foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL e centrifugadas a 2.500 g por 5 minutos em T.A. e determinada a concentração em câmara de Neubauer. O meio de cultura dos macrófagos derivados após 10 dias foi totalmente removido e adicionado 200 µL de meio de cultura DMEM suplementado com SFB. A concentração de parasitos foi ajustada para obter 5 formas tripomastigotas para cada macrófago (MOI 5:1) em 50 µL de solução por poço. A solução contendo formas tripomastigotas foram adicionadas em cada poço correspondente à infecção nas placas de 24 poços. Macrófagos não submetidos à infecção por *T. cruzi* foram utilizados como controle. O tempo mínimo para a infecção foi de 2 horas. Para determinar a eficiência de infecção, as lamínulas circulares foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas com kit corante rápido de células. A contagem de células infectadas, controle e parasito intracelulares foi realizada através do microscópio óptico. Para a extração do RNA total, cada *timepoint* - 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após a infecção - seguiu com, a coleta de 200 µL do sobrenadante, lavagem dos poços por duas vezes com PBS 1X gelado, coleta dos macrófagos com o reagente Trizol e o armazenamento das amostras no freezer -70°C (Figura 6).



\* Wells lavados com 1mL PBS 1X gelado e 1mL Trizol

**Figura 6 – Desenho experimental da cinética de infecção.** Macrófagos derivados da medula óssea e infectados com *T. cruzi* MOI 5:1. Amostras coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção foram submetidas a extração/quantificação do RNA, síntese do cDNA e avaliação dos genes do hospedeiro e patógeno por RT-qPCR.

#### 4.5 Extração de RNA

Após descongelamento dos macrófagos em reagente Trizol® e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 200  $\mu$ L de clorofórmio (Sigma). A mistura foi homogeneizada por vigorosa vortexação, incubada a T.A. por 3 minutos e centrifugada a 12.000 g por 15 minutos com refrigeração de 4°C. A fase aquosa (contendo o RNA) foi transferida para um novo microtubo contendo 10 ng de glicogênio para ajudar na precipitação do RNA e adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e incubada por 10 minutos a T.A. O microtubo foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o *pellet* de RNA. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado por 5 minutos a 7.500 g, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do *pellet*. Após a secagem do *pellet*, o RNA foi homogeneizado em 10  $\mu$ L de água livre de RNAses e estocado em freezer a -70°C até a sua utilização.

#### 4.6 Quantificação de RNA por NanoDrop e BioAnalyzer

As amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 1000. A solução contendo RNA foi homogeneizada e utilizado 1,5 µL para estimar a concentração. As mesmas amostras foram testadas no BioAnalyzer seguindo o protocolo correspondente ao *Agilent RNA 6000 Nano kit* disponível no site do fabricante (<http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>).

#### 4.7 Transcrição reversa

Para produção de DNAs complementares (cDNAs) foi utilizado iniciadores randômicos (Invitrogen, EUA). Uma pré-mistura contendo RNA (em torno de 150ng), iniciadores randômicos (300 ng/µL) e água foi realizada. A solução foi incubada a 70°C por 10 minutos. Uma segunda mistura contendo o tampão 5x (250 mM Tris pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), dinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (25 mM), ditioneitol (DTT) (0.1 M) e transcriptase reversa (RT) (fração 1 diluída em tampão contendo 50% de glicerol) foi acrescentada e as amostras foram incubadas a 42°C por 1 hora, 70°C por 15 minutos e armazenados a -20°C. Cada amostra utilizada para o cDNA teve um controle negativo (RT-) que não recebeu enzima RT durante a síntese do cDNA.

#### 4.8 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a amplificação dos genes constitutivos e específicos dos macrófagos e *T. cruzi*, foram desenhados iniciadores para cada gene com o software Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com>). Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Iniciadores para detecção dos genes constitutivos e específicos desenhados pelo software Primer3Plus para RT-qPCR

Iniciadores para RT-qPCR			
Organismo	Gene		Sequências (5' -> 3')
<i>M. musculus</i>	RpL32	<i>Left</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG
		<i>Right</i>	TGACTGGTGCCTGATGAACT
	TNF-α	<i>Left</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
		<i>Right</i>	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>T. cruzi</i>	RpL9	<i>Left</i>	TGACAACTCGACCATCAACA
		<i>Right</i>	GGCGAAGCGAATCTTAAAAC

As reações foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, EUA, seguindo programa padrão da máquina. Uma mistura foi preparada contendo tampão 1X (100 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, dNTP 0.2 mM, DNA polimerase Taq 1U, Sybr 1X e iniciadores a 0.75 μM. Os genes constitutivos foram normalizados segundo Equação 2 e os genes alvo foram normalizados em relação aos genes constitutivos segundo Equação 3.

$$ER = 2^{-[\Delta(Ct_{gene}-40)]}$$

**Equação 2 – Normalização gene constitutivo sinal RT-qPCR.** Ct de cada amostra dos genes constitutivos subtraídos de 40 (ciclos total do equipamento) e elevado por duas unidades para conversão em expressão relativa (ER).

$$ER = 2^{-[\Delta(Ct_{alvo}-Ct_{constitutivo})]}$$

**Equação 3 – Normalização genes alvo sinal RT-qPCR.** Ct de cada amostra dos genes alvo subtraídos pelo Ct dos genes constitutivos de cada amostra e elevado por duas unidades para conversão em expressão relativa (ER).

#### 4.9 Preparo do RNA para sequenciamento de nova geração por Illumina

O RNA Total foi extraído de macrófagos infectados com tripomastigotas em placas de 6 poços, precipitado com acetato de sódio 3M e etanol absoluto por *overnight*. Posteriormente a solução foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos com refrigeração 4°C, o sobrenadante descartado e *pellet* ressuspensionado com etanol 70% e vedado com parafilme para envio das amostras.

As amostras foram submetidas ao protocolo *TruSeq SmallRNA Library Preparation Kit* da *Illumina*, preparadas e sequenciadas por Sylviane Moss e Zamira Guerra com colaboração do Dr. Eric Miska, pesquisador do *Gurdon Institute* na *University of Cambridge UK*.

Para o sequenciamento de RNA poliadenilados, majoritariamente RNA mensageiros, as amostras foram submetidas ao protocolo *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit* da *Illumina*. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de RNA de Interferência com a colaboração de Rennan Moreira e sequenciado no Laboratório Multiusuários de Genômica (ICB/UFMG).

#### 4.10 Análises de bioinformática

As sequências brutas obtidas do sequenciamento foram submetidas à filtragem dos adaptadores e tamanhos pela ferramenta *cutadapt* (MARTIN, 2011), com o seguinte comando: “*cutadapt -f fastq -a TGAATTCTCGGGTGCCAAGG -e 0.12 -x TRIM: -m 15 --untrimmed-output sequências\_ao\_filtradas.fastq sequências\_brutas.fastq > sequências\_filtradas.fastq*”. As sequências filtradas foram submetidas à ferramenta *FastQC* para avaliar a qualidade do sequenciamento base a base, com o seguinte comando: “*fastqc sequências\_filtradas.fastq*”.

Para otimizar o mapeamento, as sequências com composição de bases iguais foram colapsadas e a frequência absoluta (ou número de ocorrências) foi salva no novo identificador da sequência (e.g. *>ID=1\_freq=15*) afim de diminuir a quantidade de sequências analisadas. Dessa forma, o resultado do mapeamento não requer muito espaço em disco rígido para armazenamento e as análises de mapeamento, anotação e expressão dos miRNAs ficam mais rápidas, sem perder a informação da expressão real.

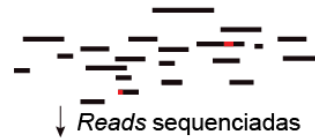
As sequências filtradas e colapsadas foram submetidas ao mapeamento contra o genoma de referência do *Mus musculus* (GRCm38) e *T. cruzi* cepa CLBrenner (versão 7.0) utilizando o mapeador *Bowtie* (LANGMEAD et al., 2009). O comando e

parâmetros foram: “bowtie mus\_musculus\_t\_cruzi -q sequências\_filtradas\_colapsadas.fasta -v 0 --all --sam -threads 4 --al sequências\_mapeadas.fasta--un sequências\_ao\_mapeadas.fasta > mapeamento.sam”. O mapeamento foi realizado para as bibliotecas infectadas e controle. O arquivo de mapeamento foi convertido para o formato BED, com os seguintes comandos: “samtools view -bS mapeamento.sam > mapeamento.bam” e “bamToBed -i mapeamento.bam > mapeamento.bed”. Com a ferramenta BedTools (QUINLAN; HALL, 2010), foi realizada a anotação automática das sequências mapeadas com a base de dados de miRNAs (miRBase versão 20), base de dados de genes de mRNA, snRNA, snoRNA e rRNA (versão GRCm38.73) e base de dados de sequências de tRNAs (<http://gtrnadb.ucsc.edu> versão mm9). O comando para anotação: “intersectedBed -a mapeamento.bed -b miRNAs\_database\_v20.bed -wao > sequências\_mapeadas\_e\_annotadas.intb”.

As anotações seguiram a seguinte estratégia: primeiro foram anotadas as sequências mapeadas com a base de dados de miRNAs (miRBase versão 20). Com as sequências não anotadas com miRNAs, foi realizada a anotação com mRNA, snRNA, snoRNA, rRNA e tRNA. As sequências anotadas foram contabilizadas para cada miRNA (maduro e pre-miRNA) com script miRExpression.pl desenvolvido no Laboratório de RNA de Interferência (LabRNAi). Somente os miRNAs que apresentaram sequências contabilizadas nas duas bibliotecas (controle e infectadas) foram utilizados para a análise de expressão diferencial. Para cada miRNA foi realizada a normalização via ferramenta DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e normalização via RPM (*Reads Por Milhão*) segundo as equações 4 e 5. A figura 7 abaixo resume a análise de bioinformática desenvolvida para a avaliação do RNA-seq.

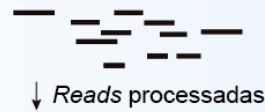
### Sequenciamento

Preparação bibliotecas  
Corrida amostra



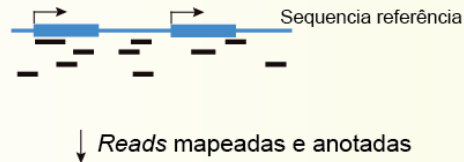
### Pre-processamento

Filtro de qualidade  
Remoção de adaptadores



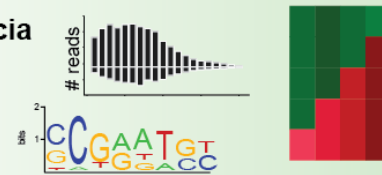
### Mapeamento e anotação

Genome de referência



### Caracterização baseada em sequencia

Distribuição de tamanho das reads  
Normalização por RPM ou DESeq2  
WebLOGO para composição de bases



### Validação

RT-qPCR, RNA-Seq,  
Ensaio de luciferase  
Western blot, Northern blot



**Figura 7 – Pipeline de análise do transcriptoma de pequenos RNAs.** Reads brutas foram tratadas retirando seqüências adaptadoras do sequenciamento e selecionadas por tamanho. As reads filtradas foram mapeadas contra o genoma do *Mus musculus* e *T. cruzi* concatenados. As reads mapeadas foram anotadas para os genes dos dois genomas. Os miRNAs foram normalizados pela equação 4 e 5 e determinado os miRNAs diferencialmente expressos entre amostras infectadas e controle.

$$RPM(\text{microRNA}_i, \text{Amostra}_j) = \frac{\text{microRNA}_i, \text{Amostra}_j}{\sum_{k=1}^N (\text{Mapeadas}_k, \text{Amostra}_j)} \times 1,000,000$$

**Equação 4 – Normalização da expressão do miRNAs.** Expressão normalizada pelo total de reads mapeadas em cada amostra. A expressão de cada miRNA<sub>i</sub> na amostra<sub>j</sub> foi dividido pelo total mapeado na amostra<sub>j</sub> e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM.

$$RPM(\text{microRNA}_i, \text{Amostra}_j) = \frac{\text{microRNA}_i, \text{Amostra}_j}{\sum_{k=1}^N (\text{microRNA}_k, \text{Amostra}_j)} \times 1,000,000$$

**Equação 5 – Normalização da expressão do miRNAs.** Expressão normalizada pelo total de reads mapeadas nos miRNAs em cada amostra. A expressão de cada miRNA<sub>i</sub> na amostra<sub>j</sub> foi dividido pelo total dos miRNA na amostra<sub>j</sub> e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM.

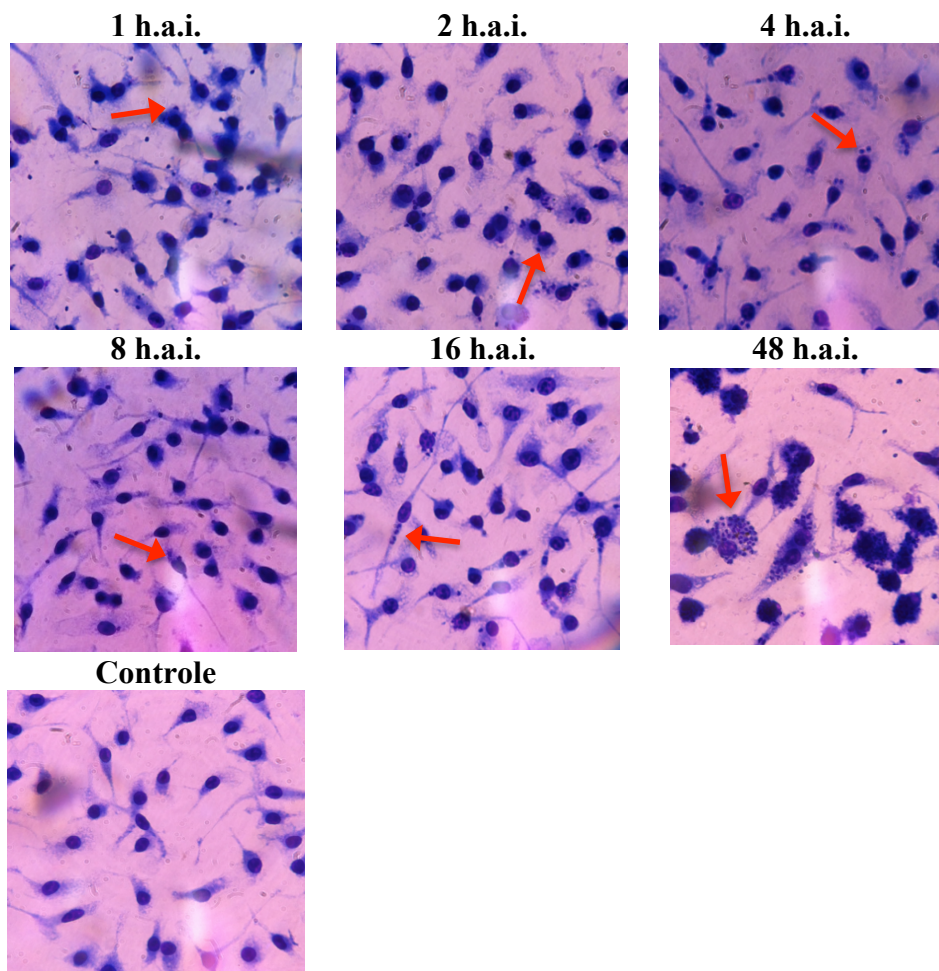
#### **4.11 Análises estatísticas**

Os resultados de RT-qPCR foram analisadas estatisticamente no GraphPad Prism por meio de teste *t-Student* para amostras não pareadas e considerando o nível de significância inferior a 5%. Para definição dos miRNAs diferencialmente expressos foram realizados a normalização e teste de significância pela ferramenta DEseq2.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Padronização da cinética de infecção

O *T. cruzi* passa por quatro fases morfológicas ao longo do ciclo de vida. A infecção de hospedeiros vertebrados ocorre com as formas tripomastigotas metacíclicas liberadas no repasto do inseto vetor e internalizadas nas células. Os macrófagos derivados da medula óssea foram infectados segundo o item 4.4 do Material e Métodos nos tempos 1, 2, 4, 8 e 16 horas após a infecção. Observa-se na Figura 8 a presença de parasitos intracelulares ao longo dos tempos da cinética de infecção e o aumento significativo no tempo de 48 horas após a infecção.

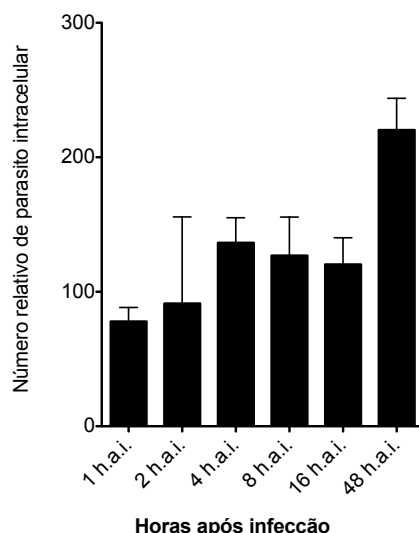


**Figura 8 – Multiplicação do *T. cruzi* intracelular na cinética de infecção em macrófagos murinos determinado por microscopia óptica.** Macrófagos plaqueados em lamínulas circulares e fixados com kit panótico. Nos tempos 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção (h.a.i.) contém esferas escuras no citoplasma celular no qual corresponde aos parasitos intracelulares. Foi determinada a quantidade de células infectadas, controle e parasitos intracelulares por microscopia invertida. A amostra controle foi coletada no tempo de 1 hora após a infecção. As setas vermelhas indicam os parasitos intracelulares.

Para cada tempo de infecção foi realizada a contagem de células infectadas, células controle e parasitos intracelulares. No total, foram contadas em média, 300 células para cada tempo e para cada réplica biológica. A Tabela 3 possui a contagem total de cada amostra e a comparação do total de parasitos intracelulares entre as amostras. O número relativo de parasitos intracelulares foi calculado segundo a equação 1 e observa-se a presença de parasitos intracelulares ao longo de toda a cinética da infecção e no aumento expressivo no tempo de 48 horas após a infecção. Esse aumento expressivo está de acordo com o esperado, uma vez que o parasito já completou seu ciclo de vida e iniciou o processo de multiplicação intracelular (Figura 9). Obtivemos em média 43.8% de células infectadas com *T. cruzi* entre as amostras coletadas. Com essa taxa de infecção a probabilidade de observarmos o sinal de resposta contra a infecção dos macrófagos infectados é maior.

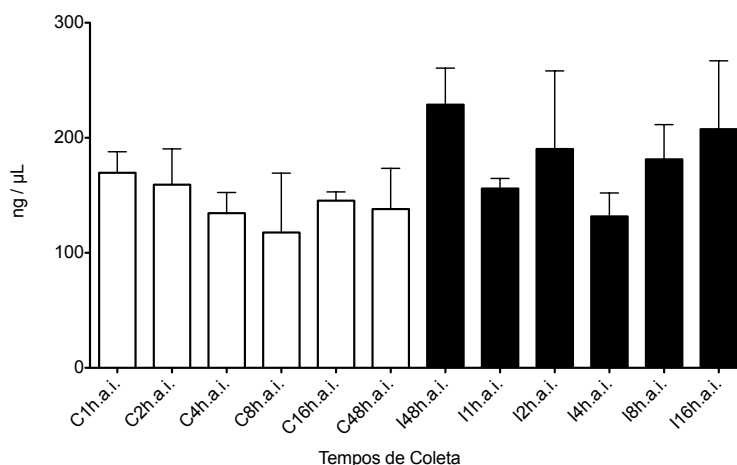
**Tabela 3 – Número relativo de parasitos intracelulares na cinética de infecção em macrófagos.** Em média foram contadas 300 células e classificadas como células infectadas e controle. Percentual de células infectadas foi em relação ao total de células contadas

<b>Tempos (h)</b>	<b>Células infectadas</b>	<b>Células não infectadas</b>	<b><i>T. cruzi</i> intracelulares</b>	<b>Total relativo</b>	<b>Percentual células infectadas</b>
1	144	188	204	88,48	43,4%
	130	161	173	77,29	44,7%
	123	204	180	67,71	37,6%
2	178	180	328	163,08	49,7%
	130	208	186	71,54	38,5%
	100	213	122	38,98	31,9%
4	153	169	260	123,54	47,5%
	110	192	433	157,72	36,4%
	115	184	332	127,69	38,5%
8	150	172	202	94,10	46,6%
	154	156	297	147,54	49,7%
	160	186	300	138,73	46,2%
16	130	163	241	106,93	44,4%
	138	161	310	143,08	46,2%
	140	176	250	110,76	44,3%
48	170	185	504	241,35	47,9%
	187	198	401	194,77	48,6%
	175	204	486	224,41	46,2%



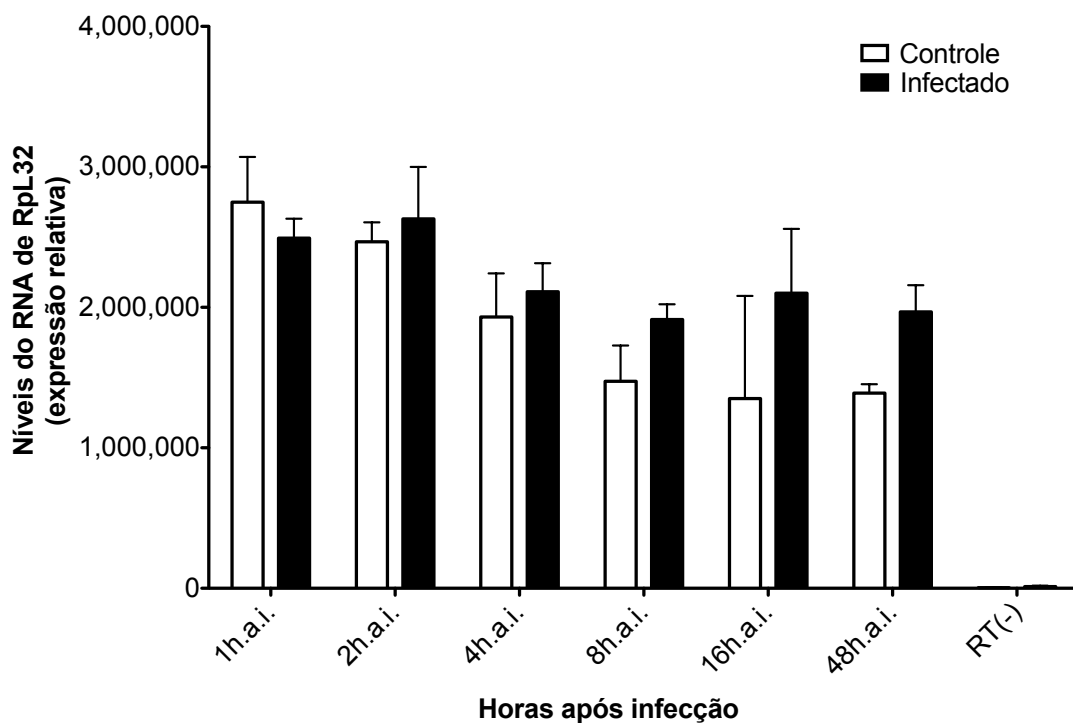
**Figura 9 – Representação gráfica do número relativo de parasitos intracelulares na cinética de infecção em macrófagos.** Relação do total de parasitos intracelulares e total de células contadas multiplicado pelas células infectadas.

Para avaliar a expressão de alguns genes por RT-qPCR realizamos a extração do RNA total e as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (NanoDrop) para quantificação. A Figura 10 mostra que a extração foi homogênea para todos os tempos de infecção com a concentração média de 150 ng/μL. Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 μL de RNA, cerca de 150 ng em média de RNA, com iniciadores randômicos para a síntese e os cDNAs controle negativos foram sintetizadas sem a presença da enzima.



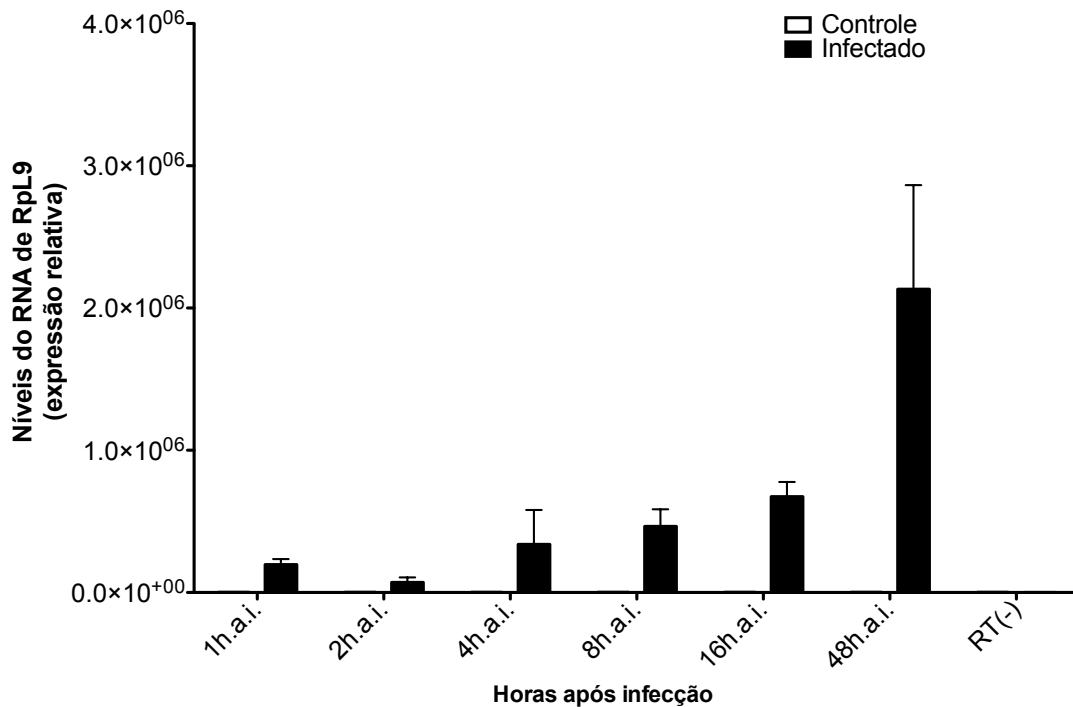
**Figura 10 – Análise da qualidade da extração pela quantificação do RNA total no NanoDrop.** Amostras quantificadas no equipamento NanoDrop com 1,5 μL de RNA. As amostras com a letra C no início correspondem a amostras controle (barras brancas) e amostras com a letra I no início correspondem a amostras infectadas (barras pretas).

Para avaliar a qualidade da extração do RNA, primeiramente foi medido o gene da proteína ribossomal L32 (RpL32) por RT-qPCR com iniciadores específicos da espécie *Mus musculus* (Tabela 2). O sinal de detecção do mRNA de RpL32 apresentou Ct (do inglês ‘*Cycle Threshold*’) médio de  $19,09 \pm 0,44$  em todas as amostras, mostrando homogeneidade entre amostras infectadas e controle, bem como entre os tempos de coleta. Este resultado de Ct ainda ficou bem menor em relação ao controle negativo, o qual não possui a transcriptase reversa durante a síntese do cDNA, com Ct médio de  $27,33 \pm 1,1$  indicando o limite de detecção do ruído de amplificação (Figura 11).



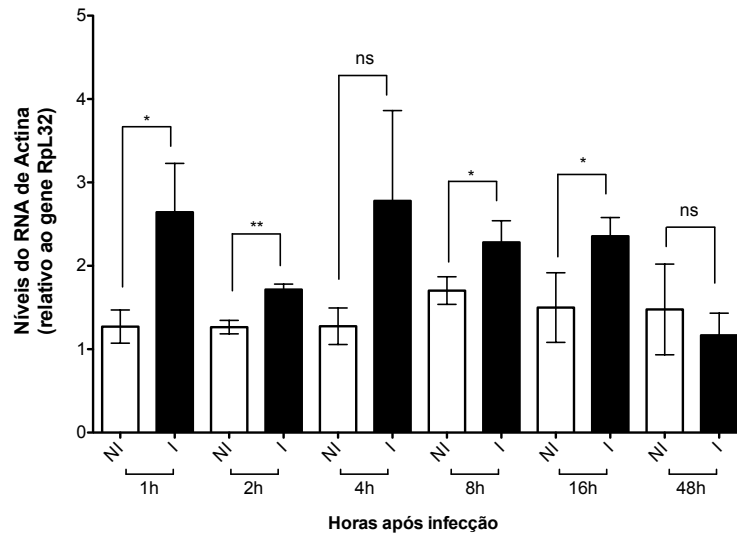
**Figura 11 – Amplificação do gene constitutivo RpL32 de *M. musculus* mostrando homogeneidade da extração do RNA total.** Sinal de RT-qPCR para o gene RpL32 específico da espécie *Mus musculus* normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e nas amostras RT(-).

Para avaliar a presença de parasitos intracelulares foi medido o sinal de RT-qPCR do gene da proteína ribossomal L9 (RpL9), constitutivo e específico com iniciadores específicos da espécie *T. cruzi* (Tabela 2). Somente as amostras infectadas com formas tripomastigotas obtiveram sinal específico para o gene RpL9 com média de  $Ct 21,53 \pm 1,60$  e as amostras controle obtiveram amplificação inespecífica com média de  $Ct 35,78 \pm 1,67$ , sinal foi correspondente as amostras negativas (Figura 12).



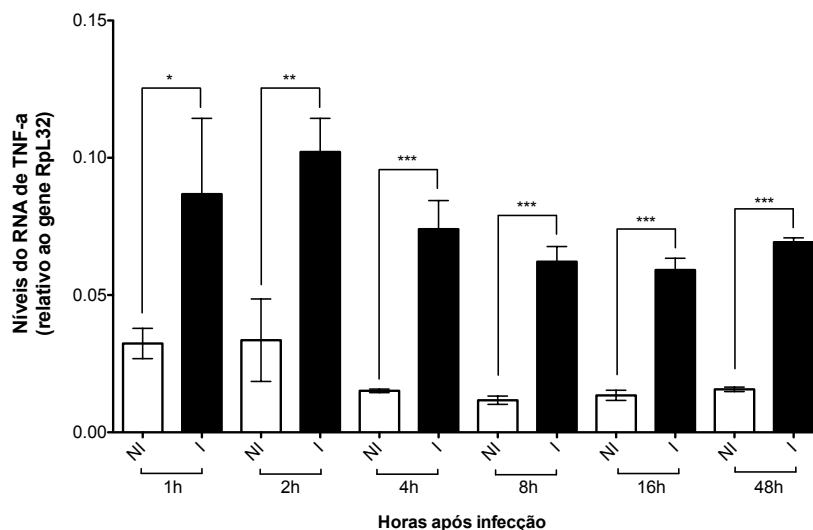
**Figura 12 – Amplificação do gene constitutivo Rpl9 do *T. cruzi* mostrando o crescimento do parasito ao longo da infecção.** Sinal de RT-qPCR para o gene Rpl9 normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e amostras RT(-).

As células hospedeiras mediante infecção por patógenos levam a expressão positiva de componentes da matriz extracelular, promovendo a proteção de ataques sucessivos dados por patógenos da mesma ou espécies diferentes (MORAL et al., 2016). Há trabalhos relatando esse fenômeno tanto em parasitos como *T. gondii* (GAJI; HUYNH; CARRUTHERS, 2013), bactérias como *M. tuberculosis* (SHREE et al., 2016) e em vírus como JUNV (CHOU et al., 2016). De forma similar, observamos um aumento significativo da expressão relativa de Actina (Figura 13), um dos genes responsáveis por codificar proteínas da matriz celular em infecções com *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2006; PEREIRA; SINGER; MEIRELLES, 2000). Em outros modelos de estudo com camundongos, a Actina é comumente utilizada como controle para normalizar a expressão de genes de interesse. Entretanto, durante a infecção por *T. cruzi*, há o aumento da expressão do mRNA de Actina e componentes da matriz extracelular (MANQUE et al., 2011). Por esta razão, normalizamos os genes do camundongos com o gene Rpl32 e normalizamos os genes do *T. cruzi* com o gene Rpl9.



**Figura 13 – Amplificação do gene Actina do *M. musculus* o qual foi alterado nas amostras infectadas em relação ao controle.** O Ct de Actina das amostras infectadas e controle foram normalizadas por RpL32 e realizado teste de significância para amostras não pareadas com *t-Student* p-valor < 5%. Amostras Controle (NI) e amostras Infectadas (I).

Como já descrito, uma das principais citocinas secretadas por macrófagos em resposta à infecção pelo *T. cruzi* é o TNF- $\alpha$  (DE DIEGO et al., 1997). Ao medir o sinal de TNF- $\alpha$  por RT-qPCR, observamos uma diferença estatisticamente significativa em todos os tempos de infecção, o que indica que os macrófagos estão respondendo a infecção com a produção de citocinas pro-inflamatórias. Observamos que o pico de expressão foi no tempo de 2h após a infecção e se manteve elevada até 48 horas após infecção em relação aos macrófagos controle (Figura 14).



**Figura 14 – Amplificação do gene da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  e aumento da expressão nas amostras infectadas indicando ativação da resposta imune.** O Ct de TNF- $\alpha$  das amostras infectadas e controle foram normalizadas pelo sinal de RpL32 ao longo da infecção e realizado teste de significância para amostras não pareadas com *t-Student* p-valor < 5%. Amostras Controle (NI) e amostras Infectadas (I).

A expressão diferencial de TNF- $\alpha$  cerca de 1 hora após a infecção e, posteriormente, em todos os tempos da infecção, sugere que esta citocina é determinante na resposta do macrófago contra a infecção do *T. cruzi*. No entanto, observamos um pico de produção no tempo de 2 horas sugerindo uma resposta precoce do macrófago mediante a infecção do *T. cruzi*, e possivelmente na produção de pequenos RNAs para contribuir com a resposta anti- ou pro-parasitária. Além da resposta do macrófago, o parasito muda da forma infectiva tripomastigota para a forma replicativa amastigota sofrendo diversas mudanças morfológicas e estruturais para se adaptar a resposta do hospedeiro. Não há dados na literatura que mostrem em qual tempo após infecção ocorre a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas para cepas de *T. cruzi* CLBrener. Um estudo publicado pelo grupo da Barbara Burleigh (LI et al., 2016) mostra que a diferenciação em amastigota da cepa Y inicia em torno de 4 horas e finaliza em 12 horas após infecção. Portanto, baseando na diferenciação em amastigotas de outras cepas, consideramos os tempos de 4 e 8 horas após infecção como possível estágio da diferenciação do parasito em amastigotas. No tempo de 48 horas, de acordo com a literatura, observamos apenas as formas amastigotas pois o parasito já completou seu ciclo de diferenciação.

Os tempos da cinética da infecção foram selecionados com base na resposta do macrófago e nas mudanças morfológicas do parasito para realização do sequenciamento de RNA. Os tempos de 2, 4, 8 e 48 horas após a infecção foram selecionados para sequenciamento de pequenos RNAs. O sequenciamento foi realizado pela plataforma Illumina no *Gurdon Institute* em *Cambridge/UK*.

A preparação das bibliotecas foi realizada seguindo o protocolo *TruSeq Small RNA Library Preparation Kit* o qual constrói a biblioteca primeiramente e posteriormente por meio da separação por peso molecular com gel 1% de agarose. As construções em torno de 145-160 nucleotídeos considerando os adaptadores e média da classe de pequenos RNAs de interesse foram extraídas do gel de agarose. Ao final obtemos tamanho de 15-50 nucleotídeos de RNAs nas construções selecionadas pelo gel de agarose. As bibliotecas de pequenos RNAs sequenciadas estão resumidas na Tabela 4.

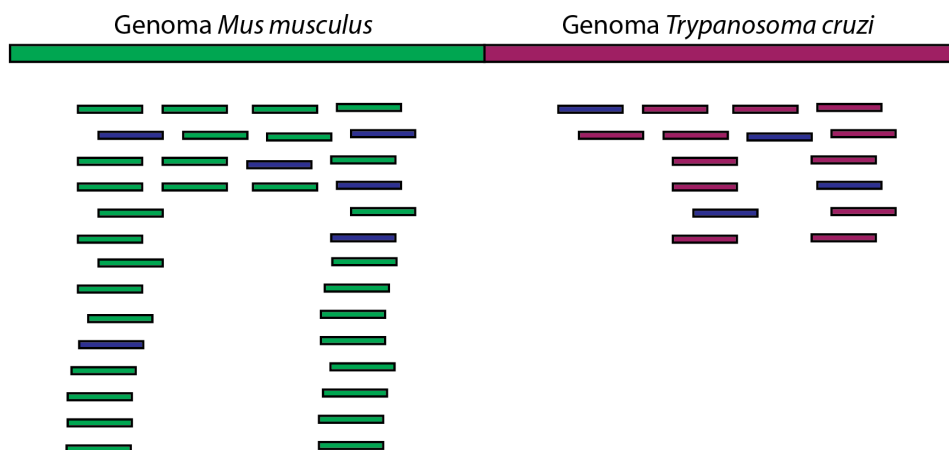
**Tabela 4 – Descrição geral das bibliotecas de pequenos RNAs sequenciadas utilizadas para análises.** Amostras para os tempos 2, 8 e 48 horas foram sequenciadas replicas técnicas (mesma construção de biblioteca sequenciada três vezes). Para a biblioteca de 4 horas foram sequenciadas duplicatas técnica (mesma amostra tratada e não tratada com polifosfatase). As réplicas técnicas foram somadas e agrupadas em uma biblioteca por não apresentarem grande diferenças entre si. Amostras sequenciadas no *Gurdon Institute*.

Tempos (h)	Amostra de macrófagos murinos	Biblioteca	Seqs Totais
2	Controle	Pequenos RNAs	6.065.984
		Pequenos RNAs	6.141.133
		Pequenos RNAs	2.847.694
	Infectada	Pequenos RNAs	5.327.028
		Pequenos RNAs	5.395.318
		Pequenos RNAs	2.579.696
4	Controle	Pequenos RNAs	1.940.179
		Pequenos RNAs	1.765.059
	Infectada	Pequenos RNAs	1.570.596
		Pequenos RNAs	1.821.533
8	Controle	Pequenos RNAs	7.201.236
		Pequenos RNAs	7.297.999
		Pequenos RNAs	3.553.972
	Infectada	Pequenos RNAs	8.160.833
		Pequenos RNAs	8.238.041
		Pequenos RNAs	3.423.501
48	Controle	Pequenos RNAs	10.815.241
		Pequenos RNAs	10.902.733
		Pequenos RNAs	4.500.148
	Infectada	Pequenos RNAs	4.723.593
		Pequenos RNAs	4.773.316
		Pequenos RNAs	1.803.315

## 5.2 Análise Bioinformática dos pequenos RNAs

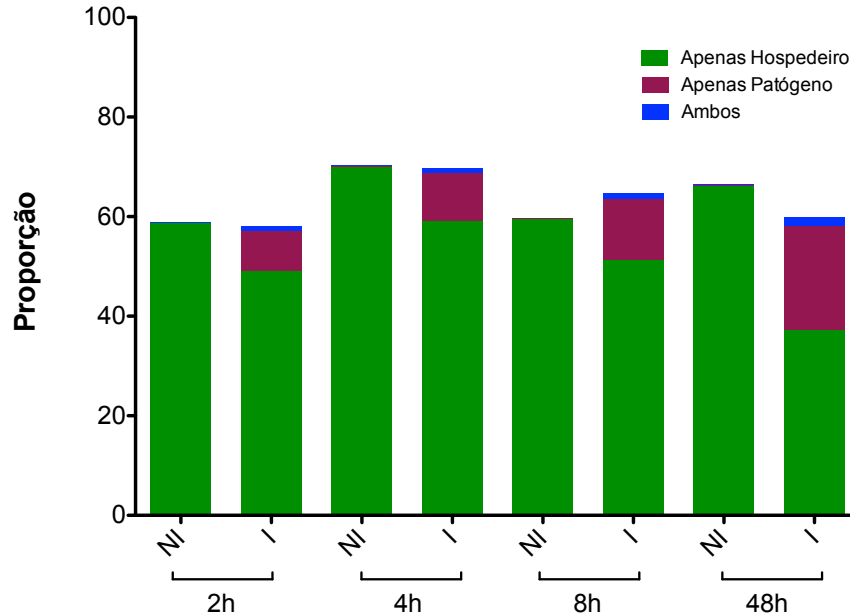
Ao final do sequenciamento obteve-se arquivos no formato fastQ (arquivo combinando sequência e qualidade para cada base) contendo as sequências para os RNAs de tamanho entre 18 e 45 nucleotídeos (previamente filtradas pelo software cutadapt) e foram submetidas ao *pipeline* de análise desenvolvido no LabRNAi.

As sequências correspondentes aos RNAs das amostras infectadas e controle foram mapeadas contra um genoma “sintético” composto pelos genomas de *M. musculus* (versão GRCm38) e *T. cruzi* (versão 7.0) concatenados. O mapeador utilizado foi o *Bowtie* versão 1 (LANGMEAD et al., 2009), não permitindo *mismatch* (erro de alinhamento) das sequências em relação aos genomas e permitindo o mapeamento múltiplo (Figura 15).



**Figura 15 – Estratégia de mapeamento das sequências nos genomas concatenados do *M. musculus* e *T. cruzi*.** As sequências foram mapeadas considerando zero *mismatches* e permitindo alinhamento múltiplo. Genoma do *M. musculus* ilustrado na cor verde e as sequências mapeadas exclusivas da mesma, genoma do *T. cruzi* em roxo e as sequências mapeadas exclusivas da mesma cor e em azul ilustrando as sequências mapeadas em ambos genomas.

A figura 16 mostra o resultado do mapeamento com o percentual de sequências *de* RNAs mapeadas no genoma hospedeiro, no genoma do patógeno ou ambos os genomas. Obtivemos uma taxa de mapeamento em torno de 60% de sequências mapeadas totais, sendo que este número tende a aumentar quando o número de *mismatches* é aumentado no alinhamento. Realizamos o mapeamento das bibliotecas permitindo um (1), dois (2) e três (3) *mismatches* e obtivemos cerca de 75%, 92% e 94%, respectivamente. Contudo, utilizamos zero (0) *mismatches* para o mapeamento para aumentar a confiança dos resultados obtidos. Principalmente pela natureza das bibliotecas de pequenos RNAs, o aumento de *mismatches* pode aumentar o viés de mapeamento.



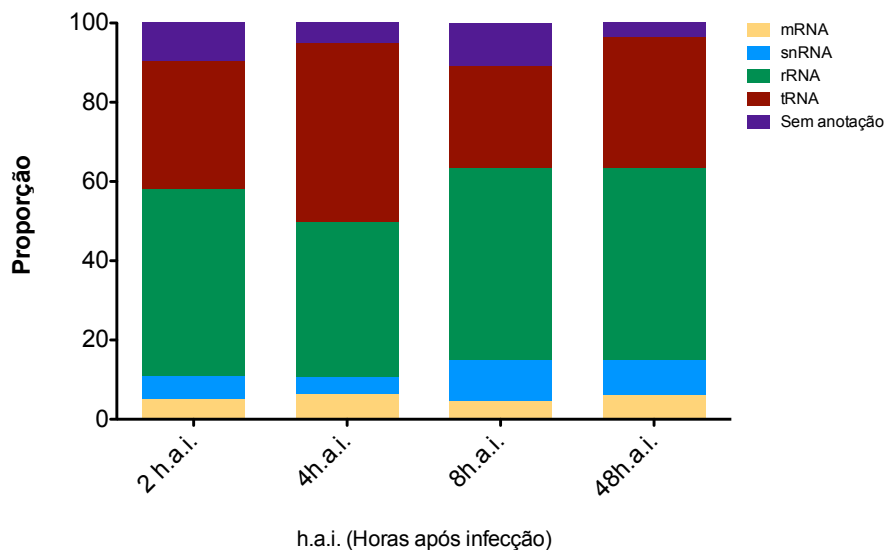
**Figura 16 – Proporção de mapeamento das bibliotecas de pequenos RNAs presentes no genoma do hospedeiro, patógeno e em ambos.** Sequências mapeadas no genoma do *Mus musculus* (verde) foram detectadas em todas as amostras e *T. cruzi* (roxo) detectadas apenas nas amostras infectadas ou em ambos os genomas (azul).

Os resultados mostram que a detecção de um número expressivo de RNAs mapeados no genoma do patógeno só ocorreu nas bibliotecas preparadas a partir de macrófagos infectados, corroborando a pureza das amostras controle e sem a presença dos parasitos. O número relativo de sequências do parasito em relação ao hospedeiro aumentou com o tempo de infecção de acordo com o crescimento e o ciclo de vida do *T. cruzi*. As sequências derivadas do *T. cruzi* foram aumentando proporcionalmente nos tempos de 2, 4, 8 e 48 horas após infecção comparados com a expressão do gene RpL9 (Figura 17).

### 5.2.1 Análise das sequências mapeadas no genoma do *T. cruzi*

Os RNAs mapeados no genoma do patógeno, refletem os parasitos intracelulares ao longo do seu ciclo de vida dentro da célula hospedeira. Estes RNAs foram classificados dentro de regiões específicas do genoma, anotadas com alguma função biológica validadas *in silico* e/ou *in vitro* ou sem anotação. As anotações são caracterizadas no genoma do parasito como mRNA (RNA mensageiro), snRNA (RNA small nuclear), rRNA (RNA ribossomal) e tRNA (RNA transportador).

As anotações correspondentes a rRNA e tRNA representaram mais de 80% de todos os pequenos RNA derivados do parasito (Figura 17). Essa representação elevada de rRNAs e tRNAs sugerem que esses pequenos RNAs possuem alguma função celular no *T. cruzi* e possivelmente durante a infecção em células hospedeiras.



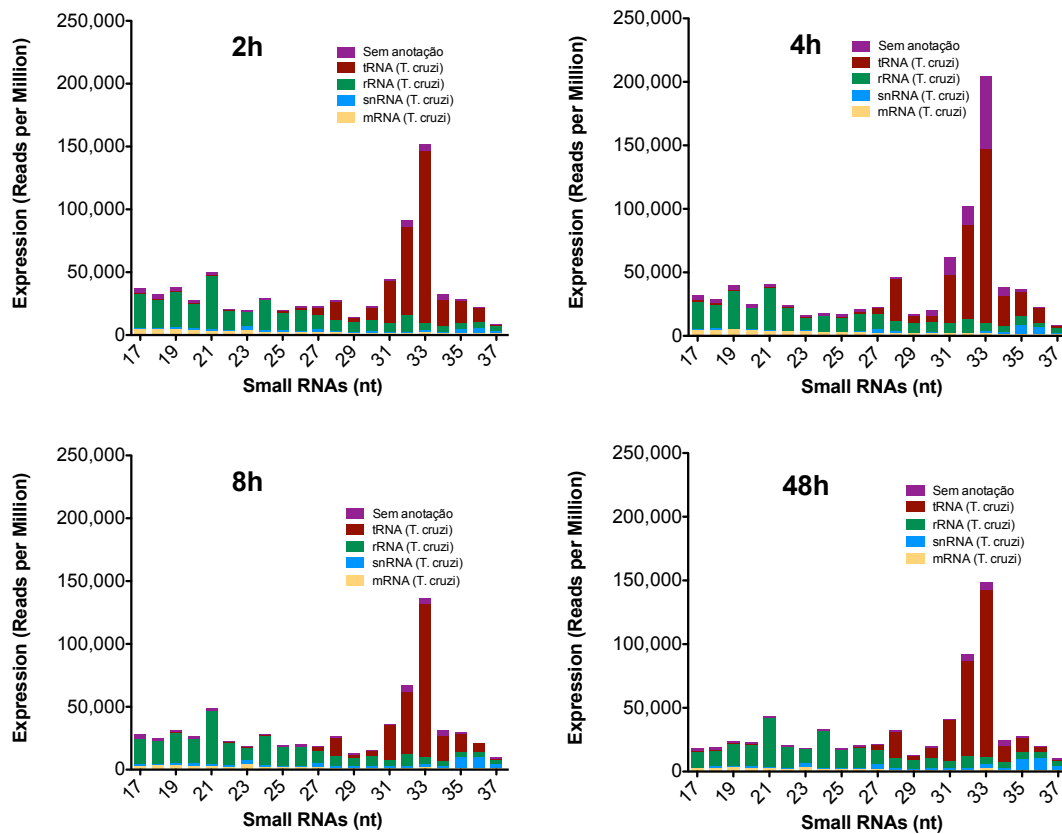
**Figura 17 – Os pequenos RNAs de *T. cruzi* são predominantemente das anotações de rRNA e tRNAs.** As sequências mapeadas no genoma do *T. cruzi* foram distribuídas para as anotações mRNA, snRNA, rRNA, tRNA e sem anotação ao longo da infecção.

A análise da distribuição de tamanho dos pequenos RNA mapeados normalizados por RPM (do inglês ‘*Reads Per Million*’ ou leituras por milhão), mostrou uma distribuição normal com pico discreto em 36 nucleotídeos para pequenos RNAs derivados de snRNAs e pico evidente em 33 nucleotídeos para pequenos RNAs derivados de tRNAs os tRFs (do inglês ‘tRNA-derived RNA fragments’ ou fragmentos de RNA derivados de tRNAs) (Figura 18) e um perfil sem tamanho predominante para mRNAs, rRNAs e pequenos RNAs sem anotação.

Não foi observado uma mudança qualitativa da representação dos genes de tRNAs ao longo da infecção. Entretanto, esses tRFs já foram descritos em outros estudos expressos em parasitos sob condições normais ou de estresse (FRANZÉN et al., 2011; GARCIA-SILVA et al., 2010). Contudo, não se sabe qual seria a função desses tRFs no ciclo de vida do parasito. Garcia-Silva e colaboradores observaram um aumento de tRFs durante o estresse nutricional e a associação com a proteína Argonauta formando complexo RISC. Os autores sugerem que o complexo RISC estaria localizado na região onde microvesículas são secretadas e atuaria no

silenciamento de genes alvos em células hospedeiras. Foi avaliado no estudo as classes presentes nas microvesículas comparadas ao RNA total do parasito. Contudo, não foi observado enriquecimento para classe de RNAs nas microvesículas, muito menos para tRFs, sugerindo que os pequenos RNAs não teriam relação com a secreção e silenciamento da expressão gênica em células hospedeiras.

As sequências derivadas de genes de rRNA, mRNAs e pequenos RNAs sem anotação mostraram um padrão sem tamanho predominante o que é condizente com degradação. Assim, dentre as anotações representadas nos pequenos RNAs do parasito, as famílias derivadas de snRNAs e tRNAs mostraram possuir relevância biológica.

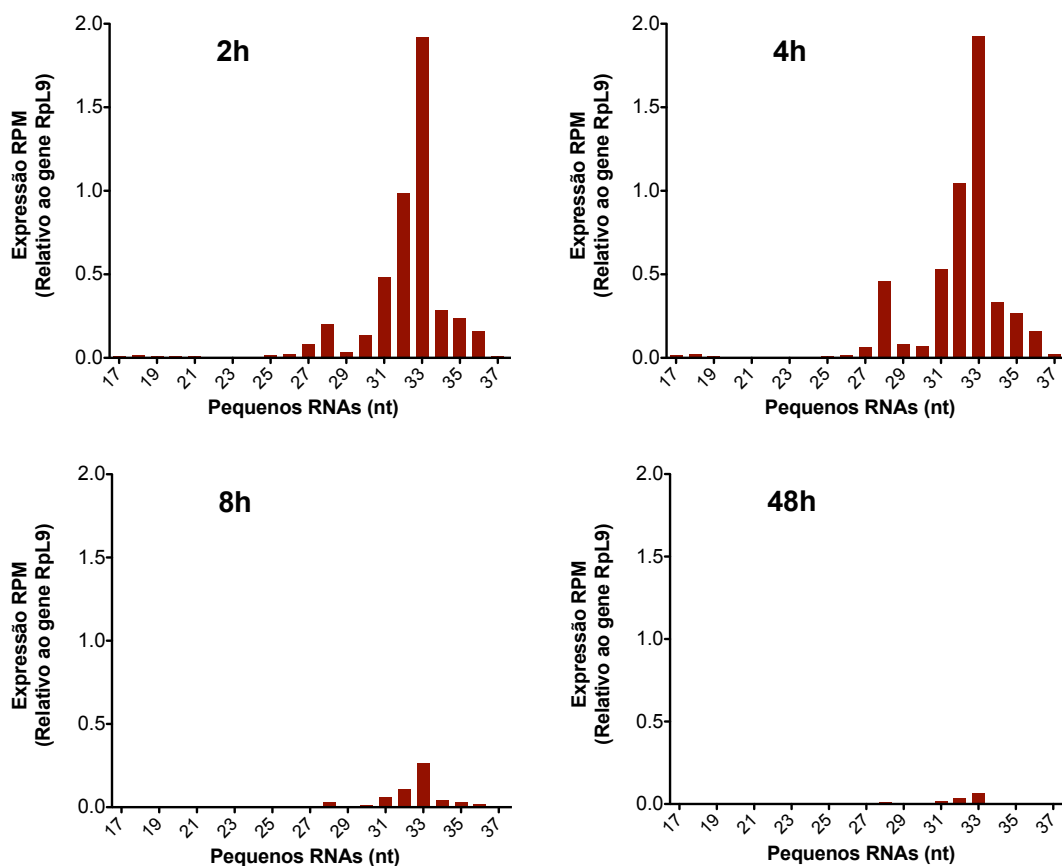


**Figura 18 – Distribuição de tamanho das sequências do *T. cruzi* presentes ao longo da cinética de infecção.** O tamanho das *sequências* mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do *T. cruzi*.

O padrão observado de tRFs com 33 nucleotídeos não apresentou alterações da expressão de RPM ao longo da infecção apesar de um possível aumento de parasitos intracelulares segundo a expressão de RpL9 por RT-qPCR. Entretanto, a quantidade

de sequências obtidas no sequenciamento de RNA é limitada e a normalização não representaria corretamente o comportamento dos tRFs. Para a comparação entre as amostras, seria necessário realizar o sequenciamento utilizando um RNA marcador com quantidade conhecida no processo de preparação das bibliotecas e após o sequenciamento normalizar a quantidade relativa das sequências do parasito pela representação do marcador. Assim, não podemos afirmar que a quantidade de pequenos RNAs manteve-se constante ao longo da infecção.

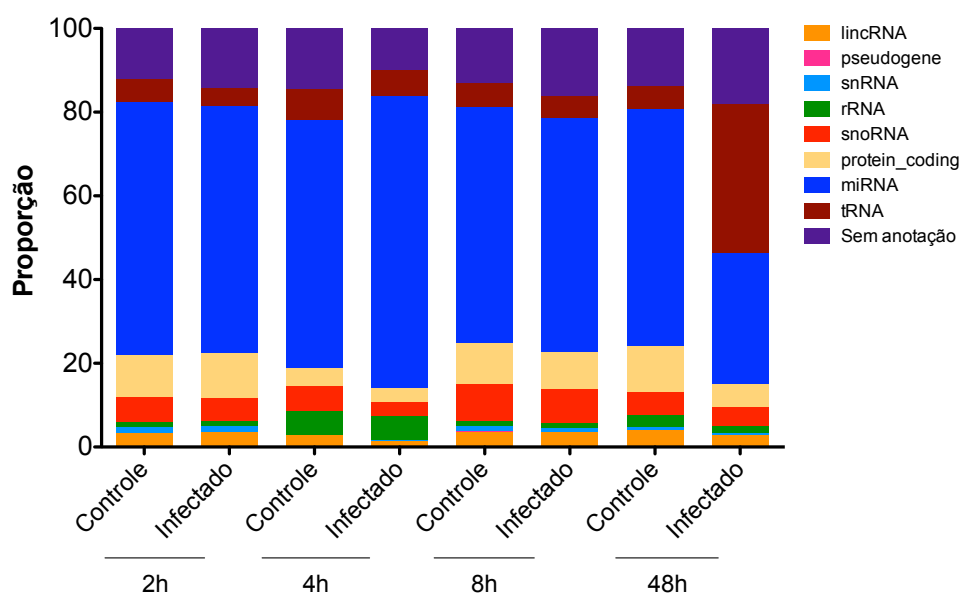
Para avaliar a variação da quantidade de pequenos RNAs derivados do *T. cruzi*, realizamos uma normalização alternativa utilizando a expressão dos tRFs em relação a expressão de Rpl9. Observamos uma diminuição relativa da quantidade de tRFs (Figura 19) em relação a quantidade de parasitos ao longo da infecção detectados por RT-qPCR (Figura 12). Este resultado sugere que quantitativamente, há um aumento da expressão dos tRFs no início da infecção em 2 horas e uma diminuição ao longo do tempo em 4, 8 e 48 horas após a infecção.



**Figura 19 – Distribuição de tamanho das sequências de *T. cruzi* presentes na cinética de infecção normalizado pelo sinal do gene constitutivo do parasito Rpl9. O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4.**

### 5.2.2 Análise dos pequenos RNAs mapeados no genoma do *Mus musculus*

De forma similar as análises realizadas no genoma do *T. cruzi*, os RNAs mapeados somente no *M. musculus* foram classificados por anotações – lincRNA (do inglês ‘long intergenic non-coding RNA’), pseudogene, snRNA (do inglês ‘Small nuclear RNA’), rRNA (do inglês ‘ribossomal RNA’), snoRNA (do inglês ‘small nucleolar RNA’), mRNA (do inglês ‘messenger RNA’), miRNA e tRNA (do inglês ‘transporter RNA’) - ou sem anotação (Figura 20).

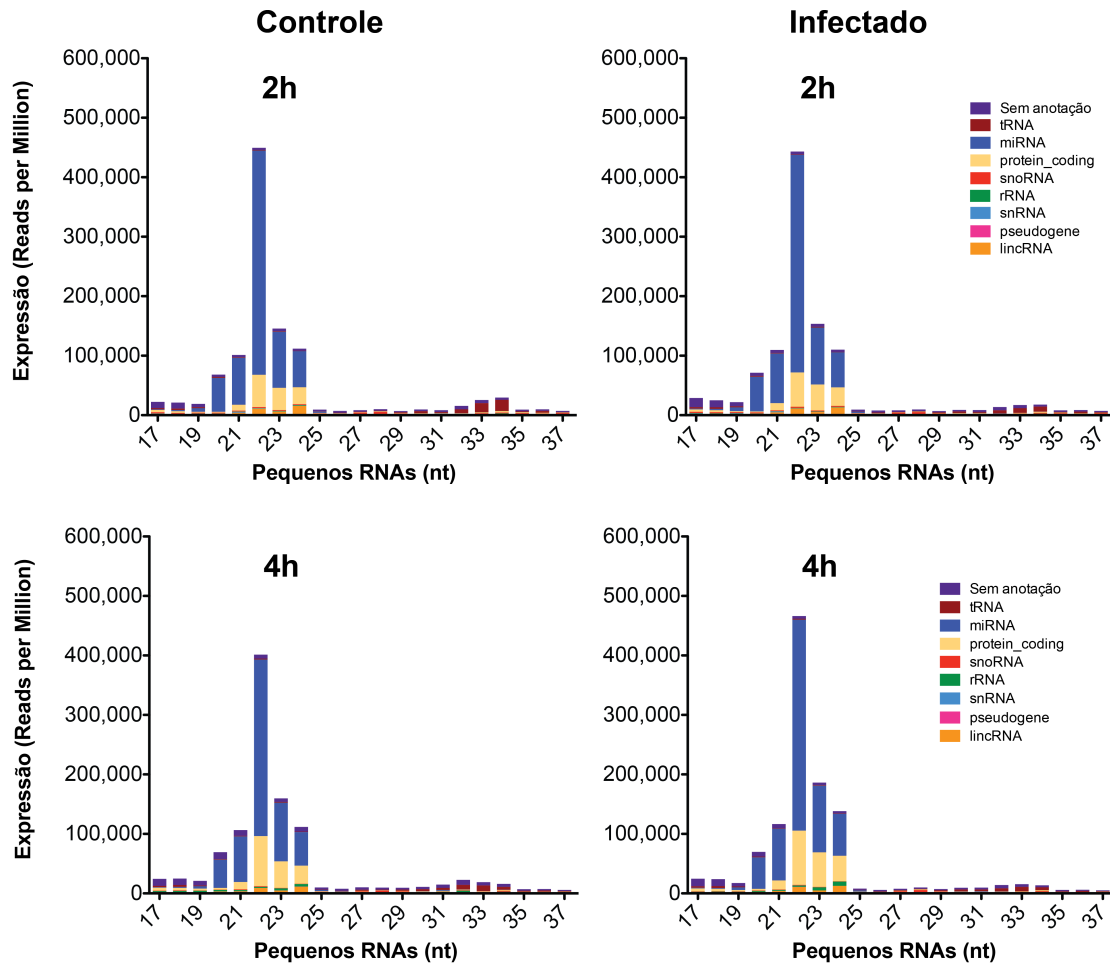


**Figura 20 – Os pequenos RNAs derivados do genoma do *M. musculus* foram predominantemente das anotações dos miRNAs.** O total de seqüências mapeados foram distribuídas em cada biblioteca e cada anotação distribuída segundo sua proporção. De forma geral não há diferenças nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção, somente no tempo de 48 horas há uma diferença grande que pode ser explicada pelo viés de sequenciamento ou o macrófago com grandes alterações gênicas.

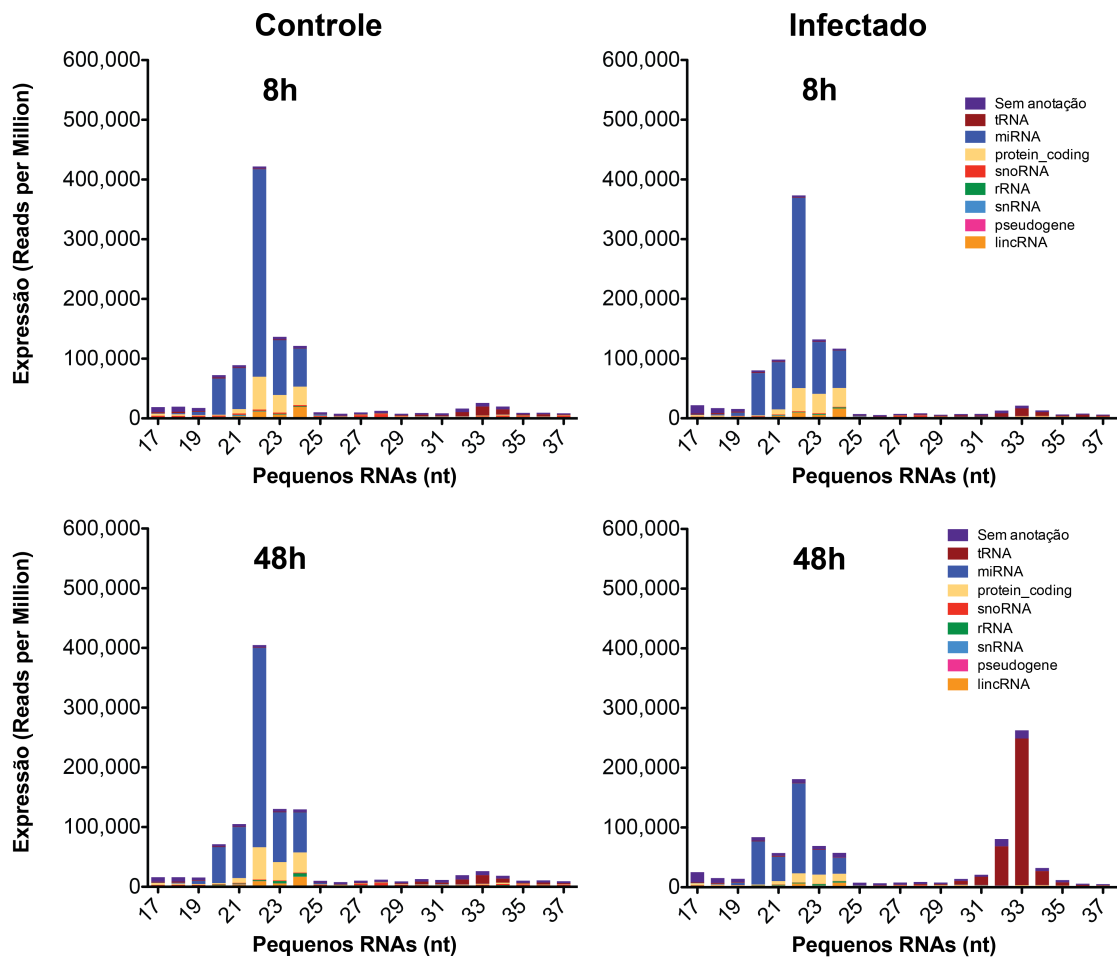
O perfil de anotações nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção não apresentou grandes diferenças. Vale destacar que a maioria absoluta dos pequenos RNAs derivados do macrófago são originados de miRNAs em todas as condições avaliadas, com exceção na amostra de células infectadas 48 horas após a infecção. Nesta amostra, há uma diminuição expressiva das seqüências anotadas em miRNAs e um aumento para as seqüências anotadas em tRNAs.

Em seguida, analisamos a distribuição geral de tamanho dos pequenos RNAs derivados de todas as anotações normalizando conforme a equação 4 (Figura 21). Esta análise também evidencia que os miRNAs representam a família mais significativa de

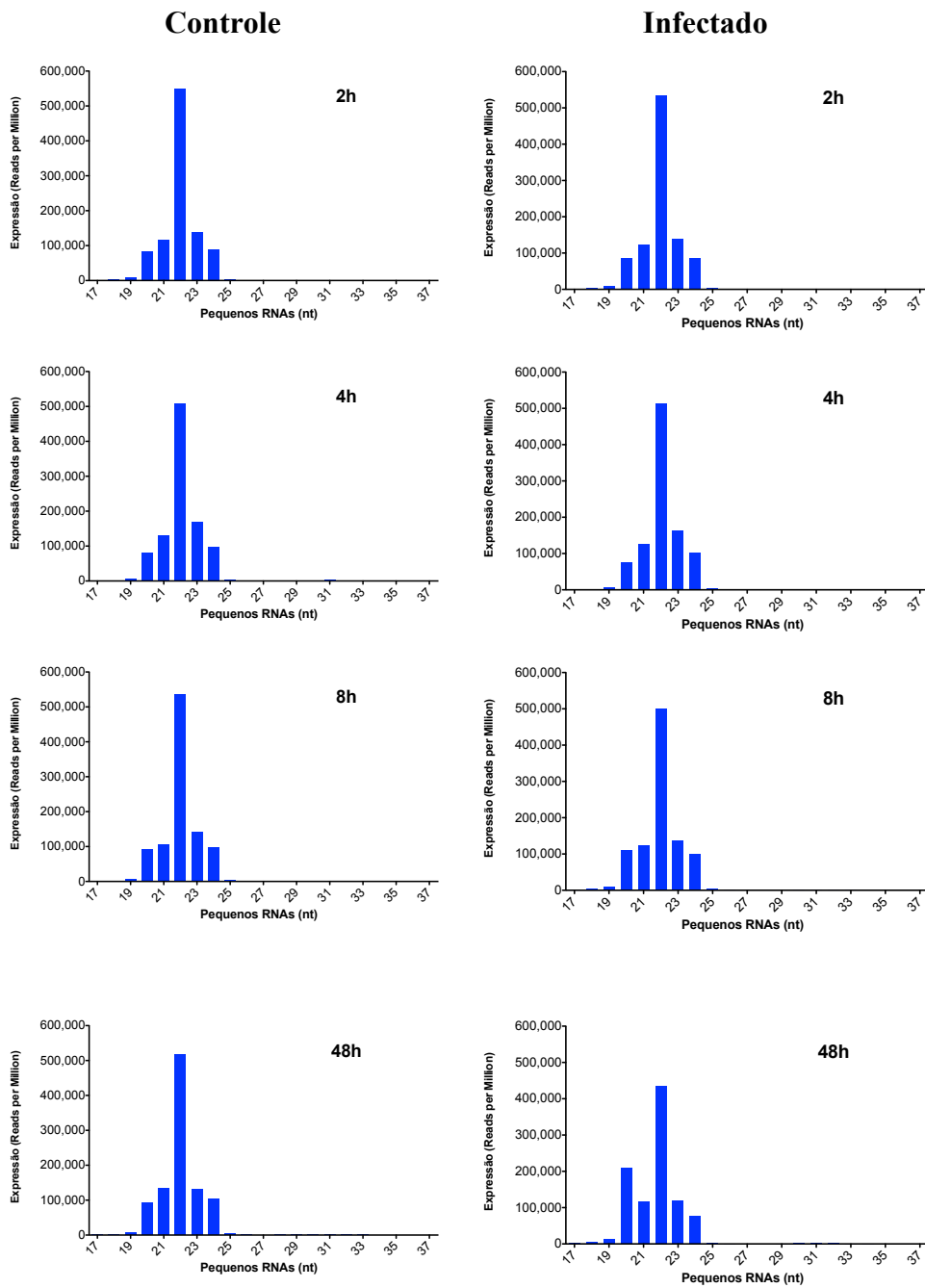
pequenos RNAs com exceção do tempo de 48h após a infecção onde os tRNAs tem uma contribuição importante. Assim, nós avaliamos a distribuição dos pequenos RNAs derivados de miRNAs e tRNAs ao longo da infecção separadamente (Figuras 22 e 23).



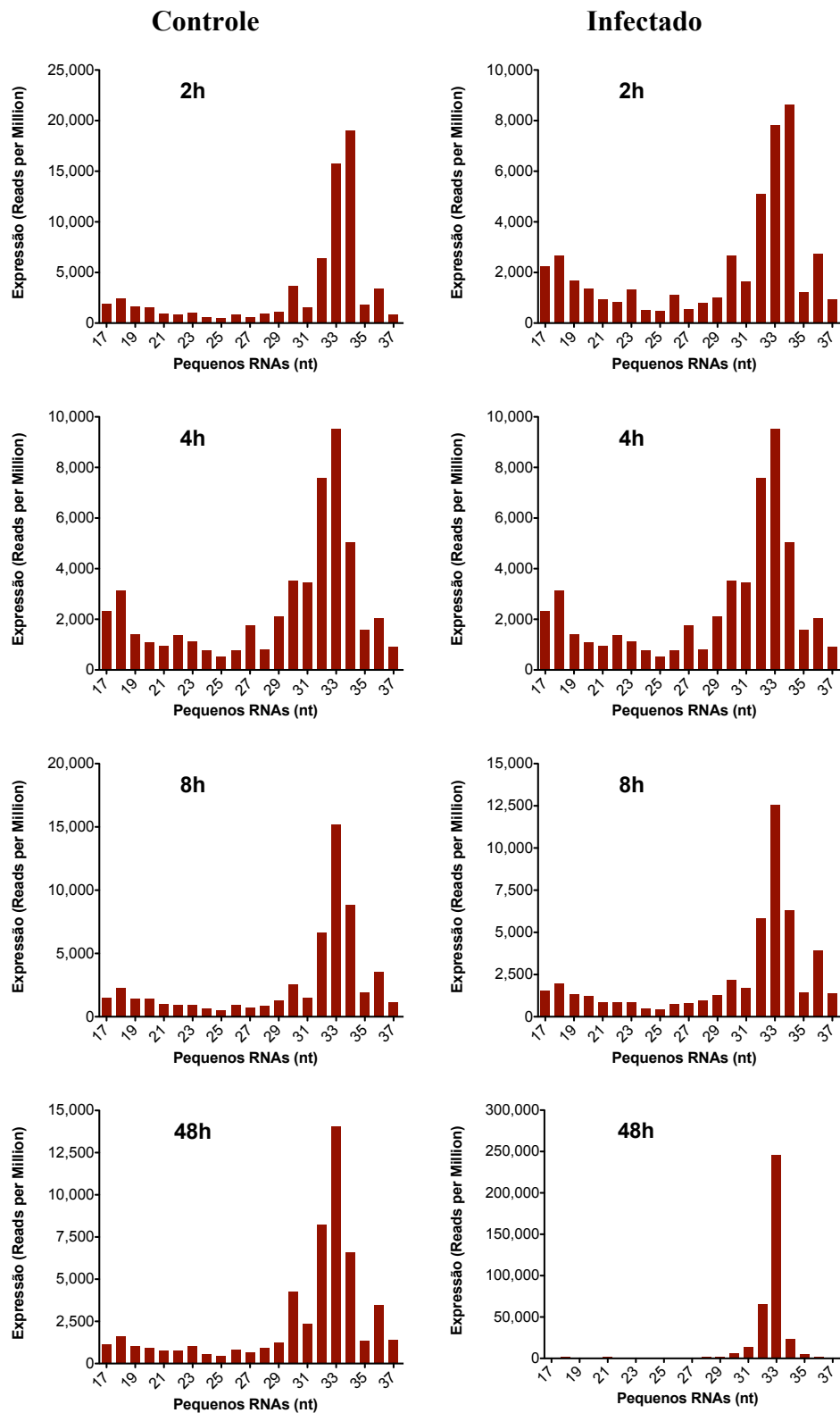
**Figura 21 – Distribuição de tamanho dos pequenos RNA identificados por sua origem no genoma de *Mus musculus*.** O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do *M. musculus*. Não observamos diferença significativa na expressão dos miRNAs ao longo da infecção, apenas no tempo de 48 horas amostra infectada onde apresenta aparente diminuição da expressão dos miRNAs. Mas essa diminuição é explicada por motivos técnicos do sequenciamento. Com o aumento de pequenos RNAs derivados de tRNAs do *Mus musculus*, a probabilidade de sequenciamento do miRNAs diminui. Quando normalizamos os miRNAs pela expressão total dos miRNAs essa diferença desaparece.



**Figura 21 – Continuação. Distribuição de tamanho dos pequenos RNA identificados por sua origem no genoma de *Mus musculus*.** O tamanho das sequências mapeadas representado no eixo x, a normalização das sequências por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do *M. musculus*. Não observamos diferença significativa na expressão dos miRNAs ao longo da infecção, apenas no tempo de 48 horas amostra infectada onde apresenta aparente diminuição da expressão dos miRNAs. Mas essa diminuição é explicada por motivos técnicos do sequenciamento. Com o aumento de pequenos RNAs derivados de tRNAs do *Mus musculus*, a probabilidade de sequenciamento do miRNAs diminui. Quando normalizamos os miRNAs pela expressão total dos miRNAs essa diferença desaparece.



**Figura 22 – Distribuição de tamanho dos miRNAs derivados do *Mus musculus* ao longo da cinética de infecção.** O tamanho das seqüências mapeadas representado no eixo x, a normalização das seqüências por milhões (RPM) total mapeado nos miRNAs segundo a equação 5. Não houve diferenças visíveis nos tempos precoces, no entanto uma leve diminuição da expressão no tempo de 48h.



**Figura 23 – Distribuição de tamanho das seqüências derivadas do tRNA do *Mus musculus*.** O tamanho das seqüências mapeadas representado no eixo x, a normalização das seqüências por milhões (RPM) total mapeado no genoma segundo a equação 4. Não houve diferenças visíveis nos tempos precoces para amostras infectadas e controle, apenas no tempo de 48h houve aumento de 20 vezes da expressão dos pequenos RNAs derivados de tRNA do *Mus musculus*.

Conforme observado na figura 21 não há diferença da representação geral dos miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas entre amostras infectadas e controle. Entretanto, no tempo 48 horas, há uma diminuição da representação dos miRNAs provavelmente causada pelo aumento da representação dos tRNAs uma vez que a quantidade de sequências obtidas em cada amostra é limitada. Assim, o aumento de uma classe de pequenos RNAs, como os tRNAs, em geral leva a uma diminuição da representação relativa das outras anotações. Para contornar essa limitação, a expressão dos miRNAs foi normalizada pelo total sequências mapeadas nos miRNAs e assim evitar o viés observado (Figura 22).

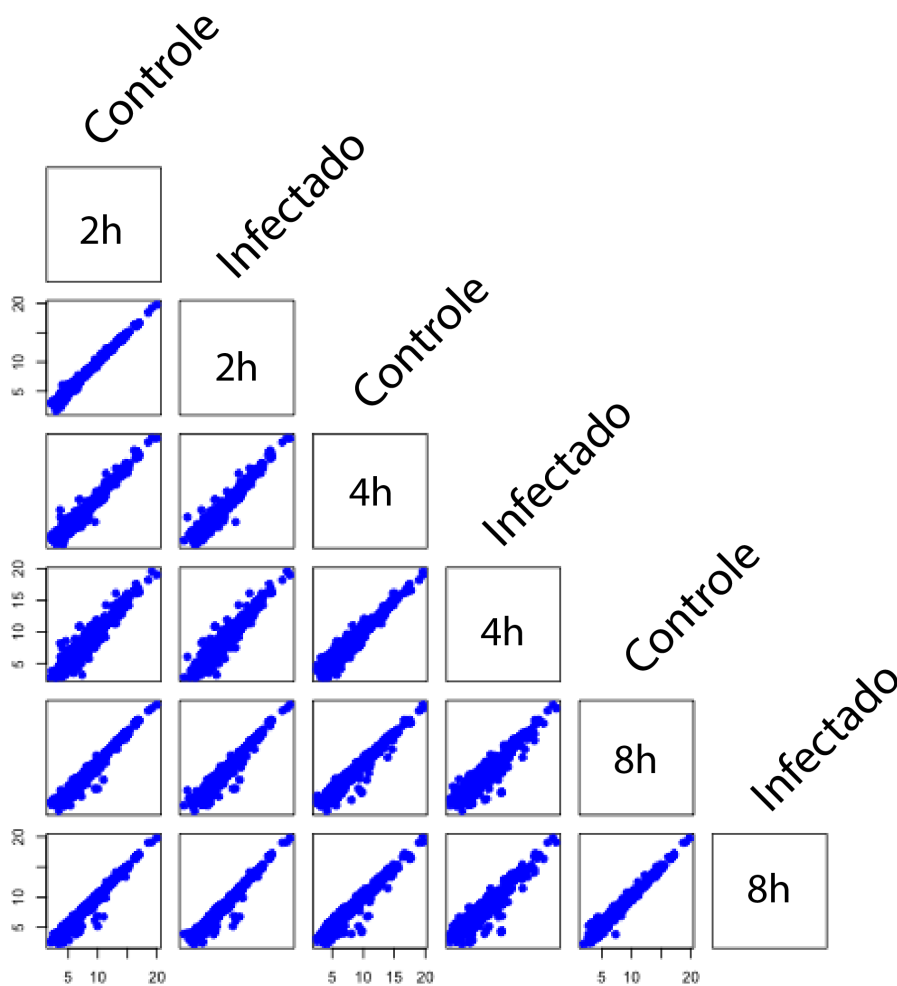
Observamos grandes diferenças de expressão de miRNAs e tRNAs no tempo de 48 horas após a infecção. Neste momento, há uma infecção massiva dos macrófagos com grandes alterações celulares. É importante destacar que estes RNAs são derivados do hospedeiro e não do parasito, pois seriam necessários 10 *mismatches* para que uma sequência derivada do tRNA de camundongo fosse ambígua ao tRNA do *T. cruzi*. Entretanto, existe uma proteína transmembrana em *Apicomplexa* responsável pela importação de tRNAs exógenos (tRIP do inglês '*tRNA import protein*' ou proteína importadora de RNA) nos parasitos causadores da Malária (BOUR et al., 2016). Portanto, investigamos se o *T. cruzi* poderia codificar a proteína tRIP e importar os tRNAs do hospedeiro durante a fase intracelular.

Através da análise de similaridade pela ferramenta BLAST do NCBI avaliamos a presença do gene tRIP no genoma do *T. cruzi* obtido no banco de dados Trytrip.org (versão 7.0). O resultado do BLAST na busca de sequências similares, não apresentou resultado de evidência da presença de uma proteína responsável pela importação de tRNA no *T. cruzi*. Adicionalmente, analisamos uma biblioteca de pequenos RNAs preparada a partir de formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante de células infectadas LLCMK2 originadas de *Macaca mulata*. A hipótese da presença de pequenos RNAs derivados de tRNAs do hospedeiro no *T. cruzi*, seria possível detectá-la nas amostras sequenciadas de formas dos parasitos recém liberadas de células hospedeiras. O primeiro passo foi retirar todas as sequências que mapearam no genoma do *T. cruzi*. O segundo passo foi o mapeamento das sequências remanescentes no genoma da *M. mulata* e se corresponderia aos genes de tRNAs. Por fim, não observamos sequências não mapeadas no genoma do *T. cruzi* provenientes do genoma do *M. mulata* e muito menos de genes de tRNAs, na biblioteca de pequenos RNAs das formas tripomastigotas do *T. cruzi*. O resultado sugere que os

tRNAs derivados de *M. macaca* não são importados para o *T. cruzi* e, assim, seriam processados pela própria célula. Em outros modelos, a detecção de pequenos RNAs derivados de tRNA parece ser estimulada por estresse e morte celular que podem ser induzido por diversos estímulos como o de uma infecção.

O aumento de pequenos RNAs derivados de tRNAs sugerem dois comportamentos distintos, a possível relação com sinalização da morte celular ou envolvido com regulação de expressão gênica por RNAi. Contudo, são necessários ensaios funcionais para avaliar a função dos pequenos RNAs derivados de tRNAs de *M. musculus*. A presença de pequenos RNAs derivados de tRNA foi descrita em diversos modelos de estresse celular (CZECH et al., 2013; IVANOV et al., 2011; SOBALA; HUTVAGNER, 2011; THOMPSON; PARKER, 2009). Outros estudos relatam que pequenos RNA derivados de tRNA podem atuar como reguladores de expressão global por silenciamento de RNA (HAUSSECKER et al., 2010). Portanto, os pequenos RNAs podem possuir função importante durante a infecção, mas a função de tRIPs estaria relacionada a tempos de infecções mais tardios como 48 horas.

A diferença da expressão de miRNAs no tempo de 48 horas foi reduzida com a normalização das sequências de miRNAs pelo total mapeado dos miRNAs. Contudo, a resposta da expressão dos miRNAs contra a infecção podem ser secundários, uma vez que há uma grande quantidade de parasitos intracelulares e a presença de pequenos RNAs derivados de tRNAs. Portanto, para avaliar a resposta dos miRNAs expressos pela infecção do *T. cruzi*, utilizamos os tempos precoces de 2, 4 e 8 horas. Estes miRNAs foram comparados par a par para avaliar a correlação da expressão entre amostras (Figura 24).



**Figura 24 – Scatter plot da expressão dos miRNA.** Correlação da expressão dos miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Cada círculo em azul representa um miRNA com expressão nas amostras controle e infectadas.

A expressão dos miRNAs não apresentou grandes alterações ao longo das primeiras horas da infecção. Este resultado é esperado, uma vez que os miRNAs possuem expressão constitutiva e, em geral, sofrem somente pequenas alterações para realizar o ajuste fino da expressão dos seus alvos (Figura 24).

Para o estudos dos miRNAs diferencialmente expressos, utilizamos diferentes métodos de classificação, pois o sequenciamento dos pequenos RNAs foi realizado para amostras individuais controles e infectadas para os tempos selecionados. Realizamos o *pool* das réplicas biológicas realizadas na cinética de infecção para a preparação e sequenciamento das bibliotecas. Este procedimento foi adotado por dois motivos, primeiro, pela quantidade necessária requerida pelo protocolo de preparação de bibliotecas de pequenos RNAs, onde o mínimo requerido é de 1µg de RNA total, e segundo, pela consistência entre as réplicas biológicas em outros sequenciamentos de

RNA. Contudo, os métodos para a seleção de genes diferencialmente expressos são baseados em réplicas biológicas para o cálculo da expressão média e desvio padrão dos miRNAs, sendo variáveis necessárias para calcular se há diferença estatística entre dois tratamentos. Mas não seria possível aplicar nas bibliotecas sequenciadas. Portanto, realizamos diferentes normalizações na expressão dos miRNAs nas bibliotecas, bem como diferentes métodos para seleção dos miRNAs diferencialmente expressos.

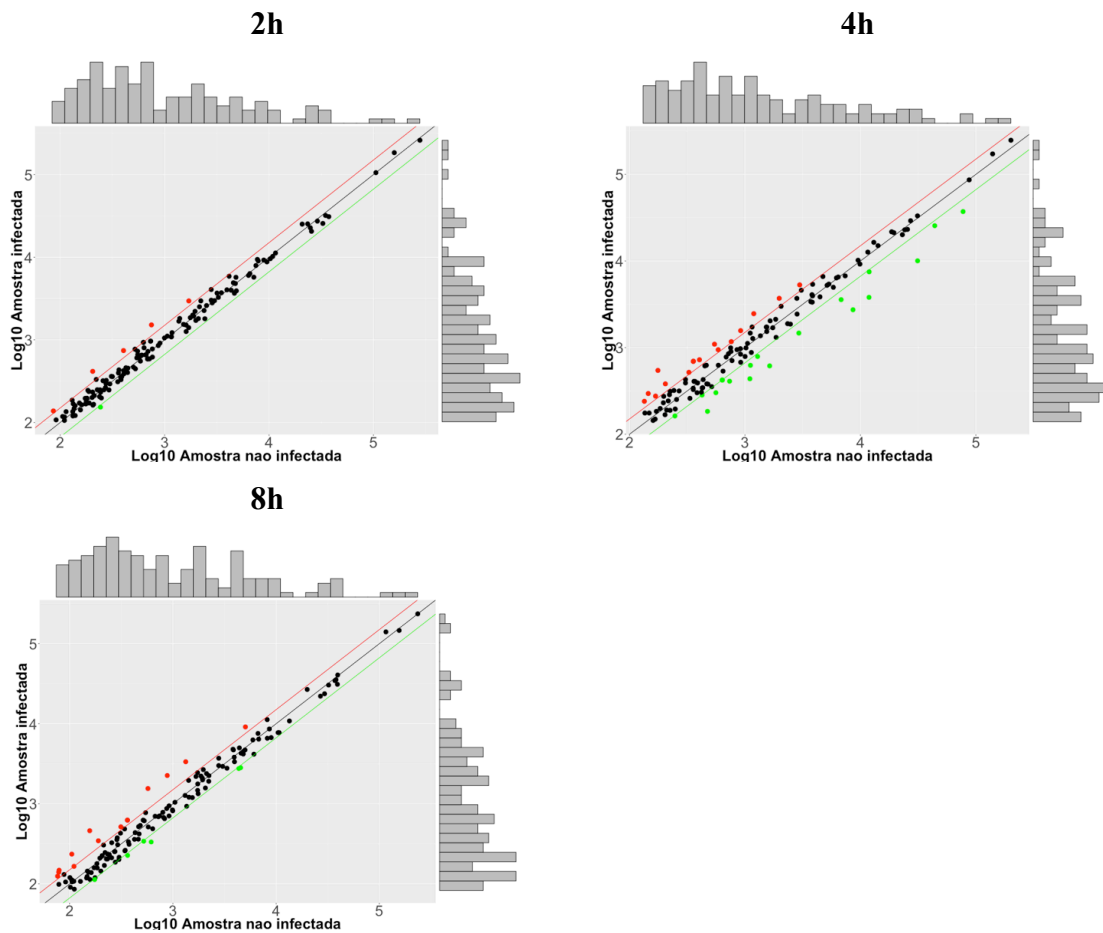
Utilizamos os métodos de normalização por RPM e normalização da expressão pela ferramenta DESeq2. Para a seleção dos miRNAs diferencialmente expressos utilizamos, a seleção dos miRNAs com *foldchange* superior a 1,5 vezes, seleção dos miRNAs pela distribuição gaussiana dos valores de *foldchange*, considerando aqueles com diferença estatística inferior a 5% e por fim, utilizamos a ferramenta DESeq2 para avaliar a dispersão de todas as anotações detectadas no sequenciamento e determinar quais miRNAs foram diferencialmente expressos com significância estatística inferior a 5%. Nas próximas seções, descrevemos os métodos avaliados e a justificativa da utilização da ferramenta DESeq2 como principal ferramenta para a seleção dos miRNAs diferencialmente expressos.

#### **5.2.2.1 Seleção dos miRNAs diferencialmente expressos pelo valor do**

##### ***Foldchange***

A expressão dos miRNAs foi normalizada pelo método RPM, o qual indica a proporção de representação dos miRNAs a cada milhão de sequências sequenciadas. Para evitar valores de *foldchanges* exorbitantes, filtramos removendo os miRNAs com expressão inferior a 100 sequências tanto na amostras infectadas quanto na amostras controles. Em seguida obtivemos o valor de *foldchange* para cada miRNA, dividindo a expressão normalizada na amostra infectada em relação a amostra controle. Por fim, realizamos a seleção dos miRNAs pelo critério de *foldchange* superior a 1,5 vezes.

A figura 25 mostra os miRNAs diferencialmente expressos nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção e pode ser observado o aumento de miRNAs expressos diferencialmente no tempo de 4 horas (Tabela 5).



**Figura 25 - Volcano plot para expressão dos miRNAs nos tempos de 2 e 8 horas após a infecção.** Comparação da expressão dos miRNA nas amostras infectadas e controle baseado apenas da diferença em *foldchange*, a biblioteca de 4 horas após a infecção não foi feita em réplicas técnicas como as bibliotecas de 2 e 8 horas após a infecção. O histograma as margens do gráfico mostra a distribuição dos miRNAs ao longo da expressão normalizada.

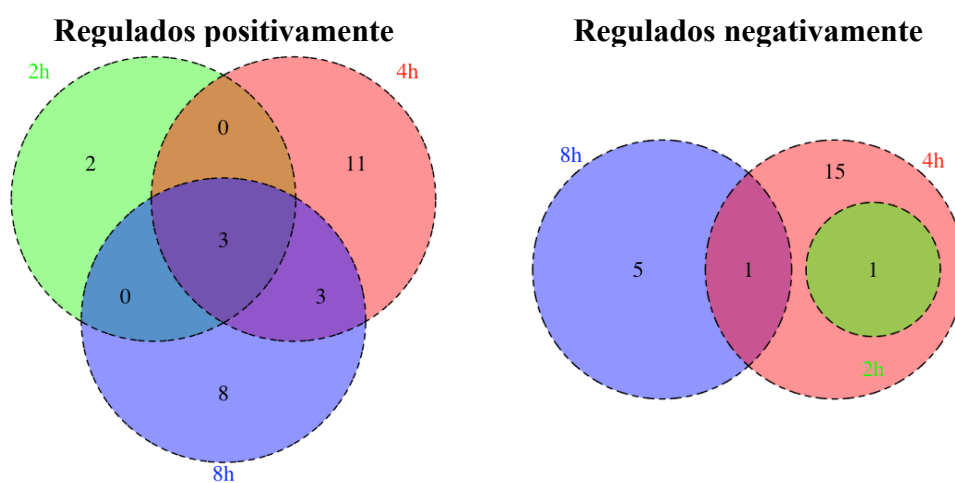
No total foram 49 miRNAs diferencialmente expressos em todos os tempos de infecção (Tabela 5). Estes miRNAs podem está relacionados por regular processos biológicos importantes ao longo da infecção por *T. cruzi*. Para os miRNAs regulados positivamente observamos 2, 11 e 8 miRNAs foram exclusivos para os tempos de 2, 4 e 8 horas após infecção, respectivamente. Observamos que 3 miRNAs foram diferencialmente expressos entre 4 e 8 horas após infecção. Apenas 3 miRNAs foram expressos comumente nos três tempos após infecção. Para os miRNAs regulados negativamente, observamos 15 e 5 miRNAs foram exclusivos para os tempos de 4 e 8 horas após infecção, respectivamente. Apenas 1 miRNA foi expresso em comum entre 4 e 8 horas ou entre 2 e 4 horas após infecção. E nenhum miRNA foi expresso negativamente entre os três tempos de infecção. (Figura 26).

**Tabela 5 – MiRNAs diferencialmente expressos selecionados pelo critério de *foldChange*.** Os miRNAs foram normalizados por RPM e o *foldchange* (amostra infectadas em relação ao controle) calculado para cada miRNA. Apenas aqueles miRNAs que apresentaram *foldchange* superior a 1,5 vezes foram classificados como diferencialmente expressos

<b>miRNAs</b>	<b>Tempos (h)</b>	<b>Regulação</b>	<b><i>FoldChange</i></b>
miR-451a	2	Positiva	2,02
miR-125b-1-3p		Positiva	1,60
miR-34c-5p		Positiva	1,83
miR-21a-3p		Positiva	2,03
miR-142-3p		Positiva	1,73
miR-501-3p		Negativa	0,63
miR-34c-5p	4	Positiva	3,10
miR-142-3p		Positiva	2,07
miR-22-5p		Positiva	2,03
miR-107-3p		Positiva	2,01
miR-199a-3p		Positiva	1,95
miR-199b-3p		Positiva	1,94
miR-340-5p		Positiva	1,87
miR-29b-3p		Positiva	1,87
miR-101b-3p		Positiva	1,80
miR-324-5p		Positiva	1,79
miR-101a-3p		Positiva	1,78
miR-301a-3p		Positiva	1,71
miR-362-3p		Positiva	1,64
miR-15a-5p		Positiva	1,61
miR-181c-5p		Positiva	1,59
miR-21a-3p		Positiva	1,54
miR-19b-3p		Positiva	1,50
miR-486-5p		Negativa	0,66
miR-331-3p		Negativa	0,66
miR-342-3p		Negativa	0,63
miR-351-5p		Negativa	0,61
miR-191-5p		Negativa	0,58
miR-221-5p		Negativa	0,56
miR-10b-5p		Negativa	0,56
miR-1198-5p		Negativa	0,54
miR-24-3p		Negativa	0,53
miR-99a-5p		Negativa	0,50
miR-10a-5p		Negativa	0,48
miR-148b-3p		Negativa	0,40
miR-100-5p		Negativa	0,39
miR-501-3p		Negativa	0,38
miR-146a-5p		Negativa	0,32
miR-99b-5p	Negativa	0,32	
miR-146b-5p	Negativa	0,32	

**Tabela 5** – Continuação.

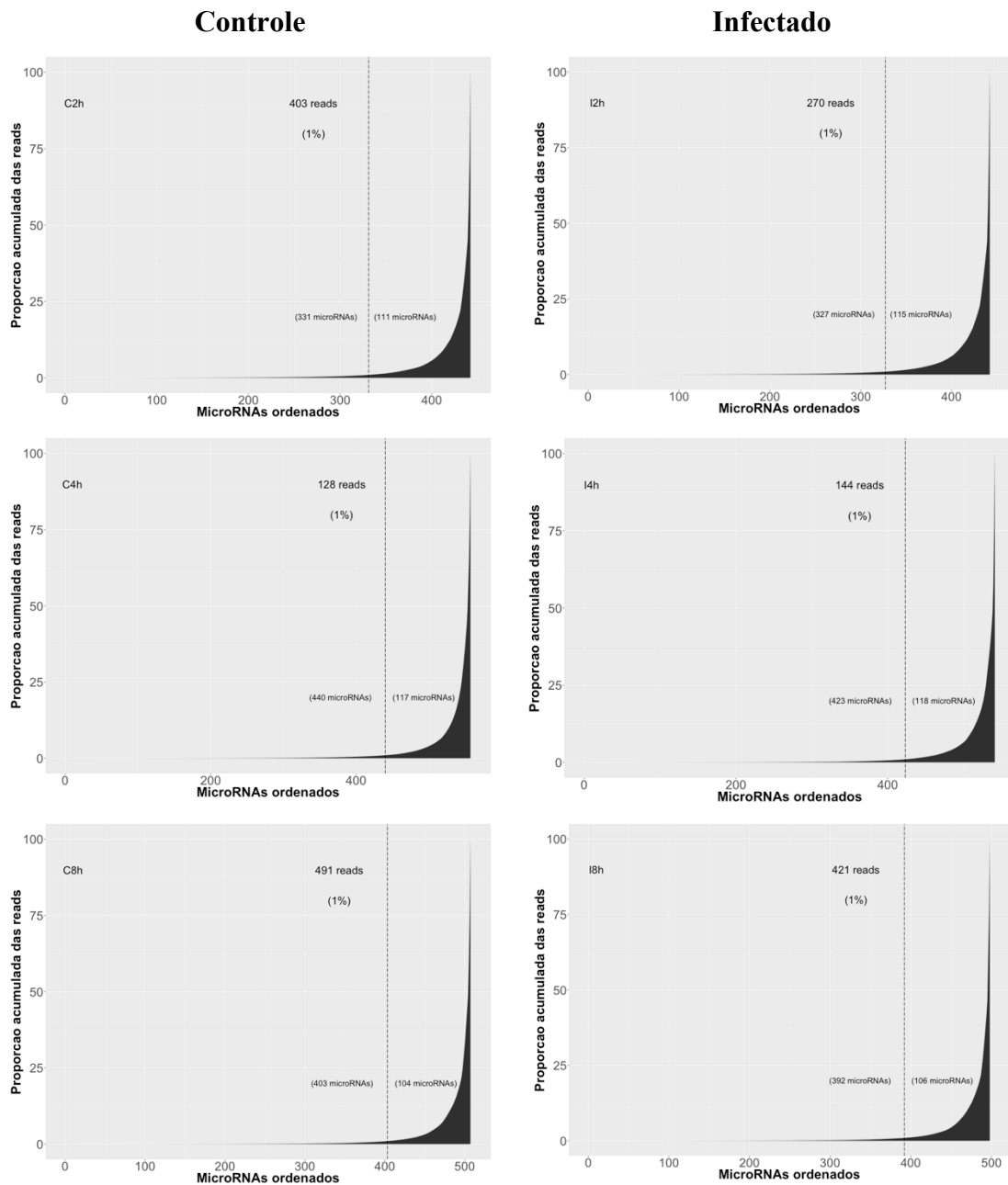
miRNAs	Tempos (h)	Regulação	FoldChange
miR-34c-5p	8	Positiva	2,89
miR-21a-3p		Positiva	2,66
miR-142-3p		Positiva	2,51
miR-143-3p		Positiva	2,52
miR-29b-3p		Positiva	2,24
miR-185-5p		Positiva	1,87
miR-1249-3p		Positiva	1,82
miR-30e-5p		Positiva	1,81
miR-99a-3p		Positiva	1,78
miR-199a-3p		Positiva	1,72
miR-199b-3p		Positiva	1,72
miR-34a-5p		Positiva	1,65
miR-31-5p		Positiva	1,63
miR-140-5p		Positiva	1,50
miR-181a-1-3p		Negativa	0,65
miR-181a-2-3p		Negativa	0,65
miR-342-3p		Negativa	0,63
let-7d-5p		Negativa	0,62
miR-339-3p		Negativa	0,62
miR-223-5p		Negativa	0,54



**Figura 26** – Diagrama de *Venn* para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção.

### **5.2.2.2 Seleção dos miRNAs diferencialmente expressos pela distribuição gaussiana dos valores de *Foldchange***

A seleção dos miRNAs diferencialmente expressos apenas pelo critério de *foldchange* possui algumas limitações como, os valores de *foldchange* não leva em consideração a expressão dos miRNAs, no âmbito quantitativo, nas amostras infectadas ou controles. Dessa maneira, miRNAs com média de expressão baixa entre as amostras podem gerar valores de *foldchange* elevados e não refletem a realidade. Usualmente, os genes diferencialmente expressos são selecionados baseados em dois critérios, *foldchange* e valor de p. Dado ao viés de miRNAs com baixa expressão, eliminamos os miRNAs com expressão inferiores a 100 sequências e aumentamos a probabilidade da seleção dos miRNAs com relevância biológica. No entanto, a escolha de *foldchange* superior a 1,5 vezes é arbitrária e não temos um valor de significância estatística associada a escolha do número de sequências para corte e dos miRNAs diferencialmente expressos. Para diminuir a arbitrariedade da escolha do número de sequências para corte, avaliamos a expressão acumulada dos miRNAs e consideramos somente aqueles miRNAs com expressão acima de 1% do total acumulado (Figura 27). Observamos que 2/3 dos miRNAs expressos nas bibliotecas possui expressão menor que 1% do total representado. Este resultado indica que estes miRNAs estão em uma região de flutuação de expressão, não representaria a realidade da expressão do miRNA e/ou o limite de detecção da expressão destes miRNAs está fora do limite da técnica de sequenciamento.



**Figura 27 – Curva da expressão acumulada dos miRNAs expressos nas bibliotecas de pequenos RNAs.** A expressão de seqüências dos miRNAs foi ordenada, somada acumulada e representada graficamente. A linha vertical representa o valor de 1% das seqüências acumuladas e indicado o limite de número de seqüências. Na parte inferior contém o número de miRNAs abaixo e acima do 1% acumulado.

A quantidade de miRNAs remanescentes após o filtro pela curva acumulada da expressão foi em torno de 22.63% (Tabela 6). Observamos que pouco menos de 1/3 dos miRNAs expressos passaram pelo filtro de qualidade e a quantidade mínima de seqüências para o filtro variou entre 128 a 491 seqüências entre as amostras.

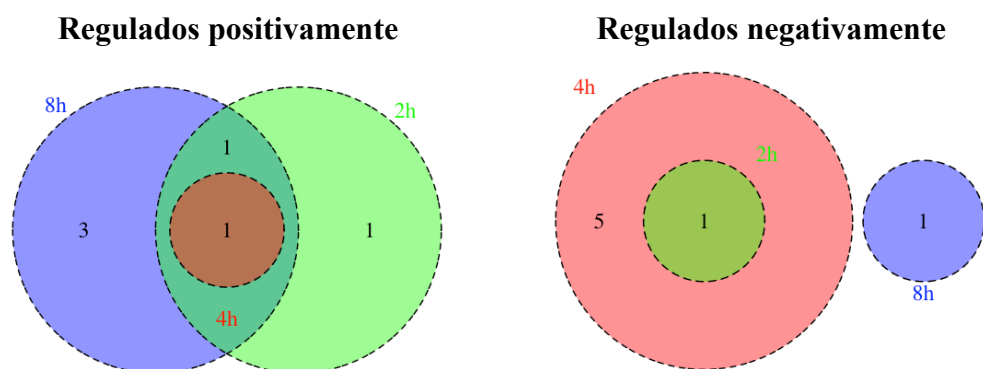
**Tabela 6 – Pré-seleção pela curva acumulada da expressão dos miRNAs.** Foi avaliado por anotação automática o número de sequências para cada miRNA, posteriormente ordenados e calculado a expressão acumulada para cada amostra. Os miRNAs com expressão inferior ao valor mínimo para 1% do total acumulado foi descartado para análises posteriores. O total miRNAs representa aqueles miRNAs que foram expressos em cada biblioteca

Tempos (h)	Amostra	Total miRNAs	Total miRNAs remanescentes	Valor mínimo de sequências em 1% acumulado
2	Controle	442	111 (25,11%)	403
4		557	117 (21,01%)	128
8		507	104 (20,51%)	491
2	Infectada	442	115 (26,02%)	270
4		541	118 (21,81%)	144
8		498	106 (21,29%)	421

Para identificar os miRNAs diferencialmente expressos, normalizamos a expressão dos miRNAs remanescentes em relação ao total dos miRNAs mapeados pelo método RPM e calculamos a razão da expressão da amostra infectada em relação a amostra controle (*foldchange*). Pela distribuição gaussiana dos valores de *foldchange*, definimos os miRNAs regulados positivamente e negativamente, considerando a significância de valor de  $p \leq 5\%$ . Identificamos no total 15 miRNAs expressos diferencialmente com significância estatística. No tempo de 2 horas após infecção obtivemos 3 miRNAs regulados positivamente e 1 miRNA regulado negativamente. No tempo 4 horas após infecção obtivemos 1 miRNAs regulados positivamente e 6 miRNAs regulados negativamente. No tempo de 8 horas após infecção obtivemos 5 miRNAs regulados positivamente e 1 miRNAs regulados negativamente (Tabela 7). A Figura 28 ilustra graficamente a expressão dos miRNAs regulados positivamente e negativamente pela análise de distribuição gaussiana dos valores de *foldchange*.

**Tabela 7 – MiRNAs diferencialmente expressos pelo critério de *foldChange* para seleção.** Os miRNAs foram normalizados por RPM, filtrados pela curva acumulada de expressão e calculado o *foldchange* (amostra infectada em relação ao controle). Com os valores de *foldchange* calculamos a curva gaussiana para cada tempo de infecção e calculado significância estatística para cada miRNAs. Aqueles miRNAs com valores de probabilidade (valor de *p*) inferiores a 5% foram classificados como diferencialmente expressos

MiRNAs	Tempos (h)	Regulação	Foldchange	Valor de <i>p</i>
miR-501-3p	2	Negativa	0,64	0,0084
miR-21a-3p		Positiva	2,02	0,00047
miR-34c-5p		Positiva	1,85	0,0025
miR-451a		Positiva	2,02	0,00047
miR-100-5p	4	Negativa	0,39	0,024
miR-146a-5p		Negativa	0,32	0,0071
miR-146b-5p		Negativa	0,32	0,0064
miR-148b-3p		Negativa	0,40	0,028
miR-3535		Negativa	0,21	0,00026
miR-501-3p		Negativa	0,38	0,020
miR-34c-5p	8	Positiva	3,10	0,0082
miR-223-5p		Negativa	0,54	0,044
miR-1249-3p		Positiva	1,93	0,040
miR-143-3p		Positiva	2,51	0,0036
miR-21a-3p		Positiva	2,71	0,0016
miR-29b-3p		Positiva	2,32	0,0079
miR-34c-5p	Positiva	2,97	0,00058	

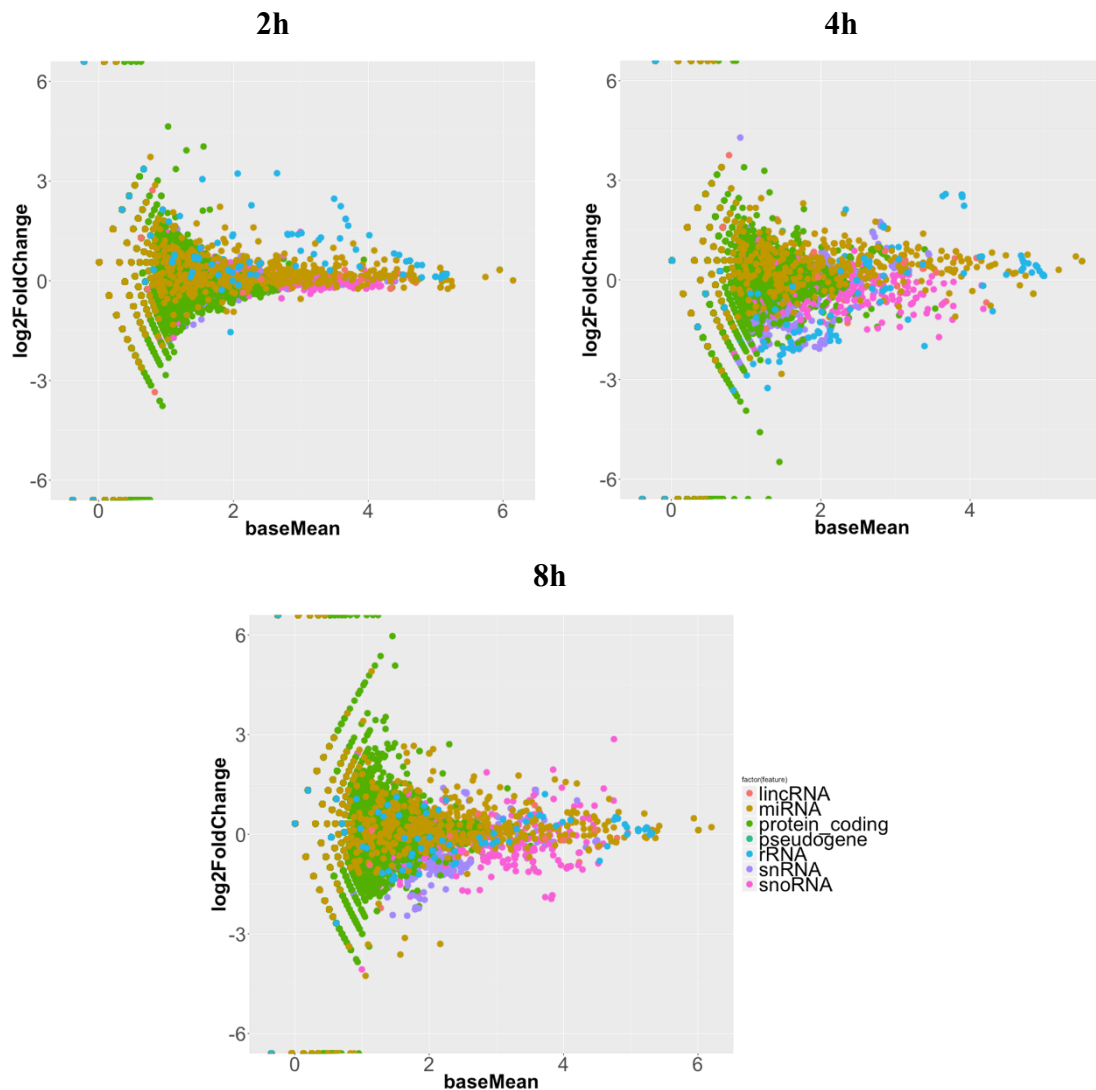


**Figura 28 – Diagrama de Venn para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h.** Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção.

### 5.2.2.3 Seleção dos miRNAs diferencialmente expressos pela distribuição da dispersão das anotações representadas pela ferramenta DESeq2

Outra ferramenta para normalização e cálculo de significância utilizada foi o pacote DESeq2, da linguagem R, baseado na distribuição binomial negativa. A ferramenta DESeq2 requer réplicas biológicas para a determinação da dispersão entre

as amostras infectadas e controles, além de determinar o valor de significância para a diferença encontrada. Contudo, DESeq2 possui função específica para o tratamento de amostras sem réplica biológica, o qual leva em consideração a dispersão na biblioteca inteira invés da dispersão de cada gene entre as réplicas. Uma característica interessante nos dados de sequenciamento em larga escala é a não diferença evidente dos genes analisados globalmente. DESeq2 faz uso dessa característica para calcular a dispersão dos genes e determinar a significância estatística quando a expressão de uma gene possui a tendência de ter expressão diferencial. Contudo, para determinar a diferença de expressão dos miRNAs, é necessário utilizar a dispersão da biblioteca inteira em conjunto das outras anotações para aumentar a confiabilidade e suporte do método de seleção (Figura 29).



**Figura 29 – Análise de dispersão para todas as anotações do *M. musculus*.** Todas as anotações foram utilizadas para determinar a dispersão geral das bibliotecas e contribuir para determinar quais miRNAs possuem tendência de expressão diferencial.

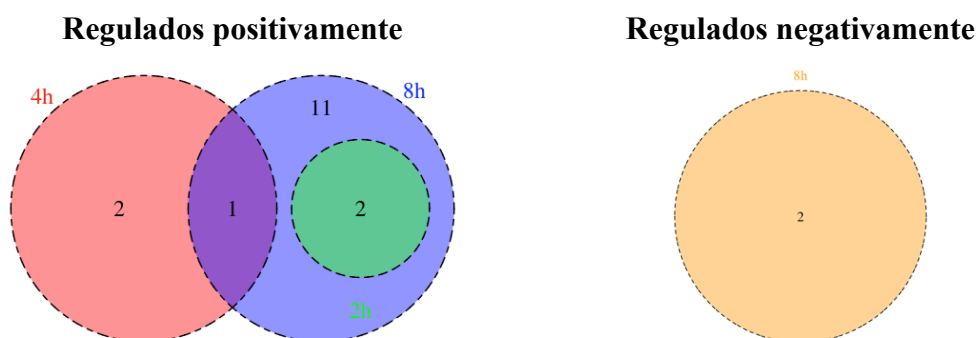
O método de seleção do pacote DESeq2 para amostras sem replica biológica, resultou em 18 miRNAs diferencialmente expressos no total ao longo da infecção. No tempo de 2 horas foram 2 miRNAs regulados positivamente, no tempo de 4 horas foram 3 miRNAs regulados positivamente e no tempo de 8 horas foram 14 miRNAs regulados positivamente e 2 miRNAs regulados negativamente (Figura 30). A Tabela 8 contém a descrição dos miRNAs diferencialmente expressos. Podemos observar qual a regulação, o valor de *foldchange* de expressão e o valor de *p* para os microRNA diferencialmente expressos (Tabela 8).

**Tabela 8 – MiRNAs diferencialmente expressos selecionados pelo critério de DESeq2.** A expressão de todas as anotações incluindo miRNAs foram utilizados para calcular a dispersão em cada tempo de infecção. A significância estatística foi calculada baseada na dispersão de cada biblioteca e os miRNAs foram classificados como diferencialmente expressos com significância estatística (valor de *p* ≤ 5%)

miRNAs	Tempos (h)	Regulação	<i>FoldChange</i>	Valor de <i>p</i>
miR-34b-5p*	2	Positiva	3,03	0,041
miR-29b-3p*		Positiva	1,57	0,048
miR-338-5p	4	Positiva	4,00	0,032
miR-451a		Positiva	4,92	0,047
miR-34c-5p**		Positiva	3,36	0,038
miR-34c-5p**	8	Positiva	3,43	0,013
miR-193a-3p		Positiva	5,90	0,01
miR-196b-5p		Positiva	5,39	0,014
miR-21a-3p		Positiva	3,14	0,016
miR-434-3p		Negativa	0,08	0,017
miR-214-3p		Positiva	3,34	0,019
miR-411-5p		Negativa	0,12	0,0197
miR-142a-3p		Positiva	2,97	0,0198
miR-130a-3p		Positiva	2,69	0,048
miR-143-3p		Positiva	2,89	0,021
miR-199a-5p		Positiva	3,07	0,025
miR-214-5p		Positiva	3,73	0,031
miR-218-5p		Positiva	6,23	0,032
miR-455-5p		Positiva	5,46	0,036
miR-34b-5p*	Positiva	6,32	0,02	
miR-29b-3p*	Positiva	2,66	0,033	

\* miRNAs que foram expressos diferencialmente nos tempos de 2h e 8h após infecção

\*\* miRNAs que foram expressos diferencialmente nos tempos de 4h e 8h após infecção



**Figura 30 – Diagrama de Venn para regulados positivamente e negativamente dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h.** Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente regulados positivamente e negativamente ao longo da infecção.

#### 5.2.2.4 Comparação entre os métodos de seleção para miRNAs diferencialmente expressos

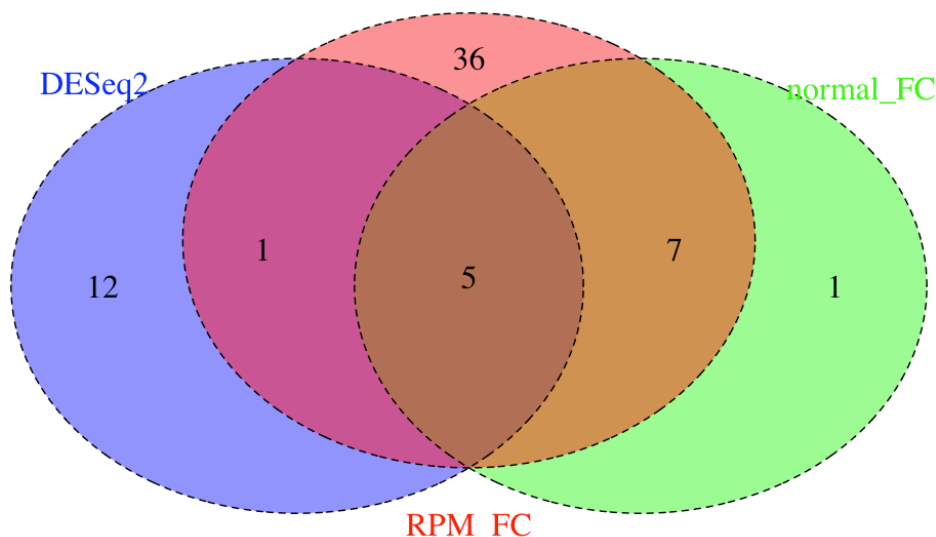
O método para classificação dos miRNAs diferencialmente expressos pelo critério de *foldchange*, mostrou que 49 miRNAs estavam 1,5 vezes alterados durante a infecção. Entretanto, encontramos miRNAs com valores extremamente altos de *foldchange* mas que possuem valores de expressão baixos em cada amostra. Por isso foi necessário remover aqueles miRNAs com expressão inferior a 100 sequências para o cálculo do *foldchange*. Contudo, os critérios para determinar o valor mínimo de detecção do sinal biológico para os miRNAs e limite para classificação da expressão diferencial foi arbitrária. Esse método é interessante para estudo onde a expressão dos genes entre as amostras tratada e não tratada é claramente discrepante. No caso dos miRNAs esse fato nem sempre ocorre e o critério de seleção escolhido deve identificar diferenças mais sutis.

Para determinar a quantidade mínima de sequências por miRNA, calculamos a expressão acumulada e consideramos apenas aqueles miRNAs com expressão superior a 1% da curva acumulada. Observamos que 2/3 dos miRNAs possuem expressão inferior a 1%. Para atribuir uma significância estatística da expressão diferencial dos miRNAs, calculamos a distribuição gaussiana para os valores de *foldchange* e classificamos aqueles miRNAs diferencialmente expressos com valor de *p* inferiores a 5%. Contudo, o critério para filtrar o conjunto de miRNAs para o cálculo da distribuição gaussiana é o fator limitante desta técnica. Pois quando alteramos o limite de 1% para 5% ou outros valores de corte da curva acumulada, não encontramos os mesmos miRNAs diferencialmente expressos na distribuição

gaussiana. Pois a cada conjunto novo de miRNAs, leva a alteração na curva e no valor de significância estatística.

DESeq2 avalia a expressão de todos os genes anotados e utiliza sua dispersão em cada biblioteca para distinguir entre sinal e ruído. Por fim, os genes são classificados de acordo com sua expressão diferencial associada a uma significância estatística. O método empregado pelo DESeq2 evita pontos de corte arbitrários, levando em conta a variabilidade da biblioteca como um todo. Para as bibliotecas de pequenos RNAs, determinamos os miRNAs diferencialmente expressos pela dispersão de todas as sequências anotadas no genoma do *M. musculus*. A seleção dos miRNAs candidatos tornou-se totalmente independente de critérios arbitrários e ainda foi possível atribuir um valor de significância estatística.

Identificamos 49 miRNAs diferencialmente expressos no método de *foldchange*, 13 miRNAs no método da distribuição gaussiana dos valores de *foldchange* e 18 miRNAs no método DESeq2. Apenas 1 miRNA exclusivo para o método da distribuição gaussiana, 36 miRNAs exclusivos para *foldchange* e 12 miRNAs exclusivos para DESeq2. Observamos que os métodos *foldchange* e distribuição gaussiana são mais similares com 7 miRNAs compartilhados. Possivelmente este fato é dado pela mesma normalização utilizada nos dois métodos, RPM. Por outro lado, o método DESeq2 possui apenas 1 miRNA compartilhado com o método *foldchange*. E por fim, observamos que 5 miRNAs foram compartilhados entre os três métodos de seleção (Figura 31). Independente de qual o melhor método, é importante destacar que estes 5 miRNAs, miR-143-3p, miR-21a-3p, miR-29b-3p, miR-451a e miR-34c-5p, foram sempre encontrados diferencialmente expressos, o que nos sugere que estes miRNAs seriam os melhores candidatos para validação.



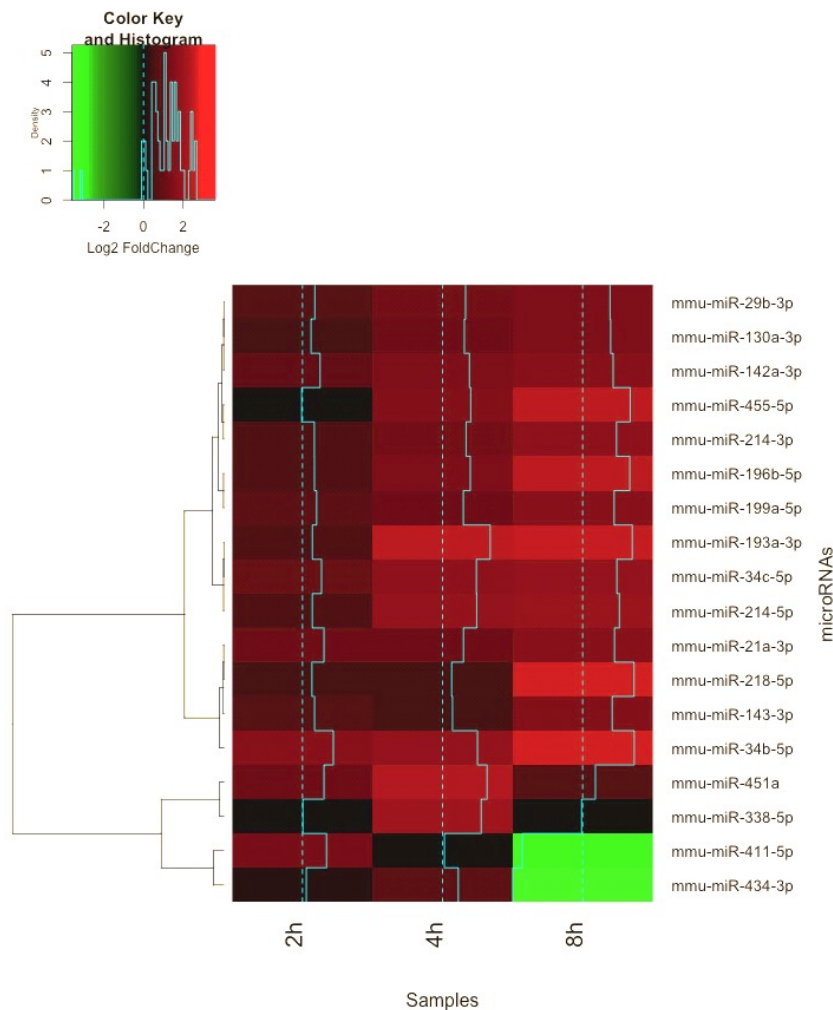
**Figura 31 – Diagrama de venn para a comparação entre os métodos de seleção de miRNAs diferencialmente expressos.** Os miRNAs expressos nas bibliotecas de pequenos RNAs foram submetidos a diferentes métodos como, seleção por *foldchange*, seleção pela distribuição gaussiana e seleção pela ferramenta DESeq2.

De forma geral, a ferramenta DESeq2 mostrou-se mais robusta para a seleção dos miRNAs diferencialmente expressos. Onde não há necessidade definir pontos de cortes para expressão mínima e expressão diferencial dos miRNAs. Pois DESeq2 avalia a expressão de cada gene em relação da dispersão da biblioteca para realiza as normalizações. Por fim, os miRNAs diferencialmente expressos são selecionados baseados principalmente pela dispersão da biblioteca. Portanto, podemos identificar aqueles miRNAs com uma tendência para expressão diferencial, no entanto baixa, significativa entre as amostras.

#### 5.2.2.5 Análise da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos ao longo da infecção

A partir dos resultados obtidos pelo DESeq2, nós avaliamos a expressão de miRNAs diferencialmente expressos ao longo da infecção. Entre os miRNA, 16 foram regulados positivamente e 1 expresso negativamente sendo 2, 3 e 14 miRNAs regulados nos tempos de 2, 4 e 8 horas, respectivamente. Observamos claramente um aumento dos miRNAs diferencialmente expressos ao longo da infecção. Além disso, observamos que 2 miRNAs foram compartilhados entre os tempos 2 e 8 horas e apenas 1 miRNA entre os tempos 4 e 8 horas. A Figura 32 mostra a expressão dos miRNAs regulados positiva e negativamente ao longo da infecção. É importante destacar que a maioria deles mostra uma tendência de aumento ao longo da cinética

da infecção com exceção dos miRNAs mir-411-5p e mir-434-3p que diminuem no tempo de 8 horas.



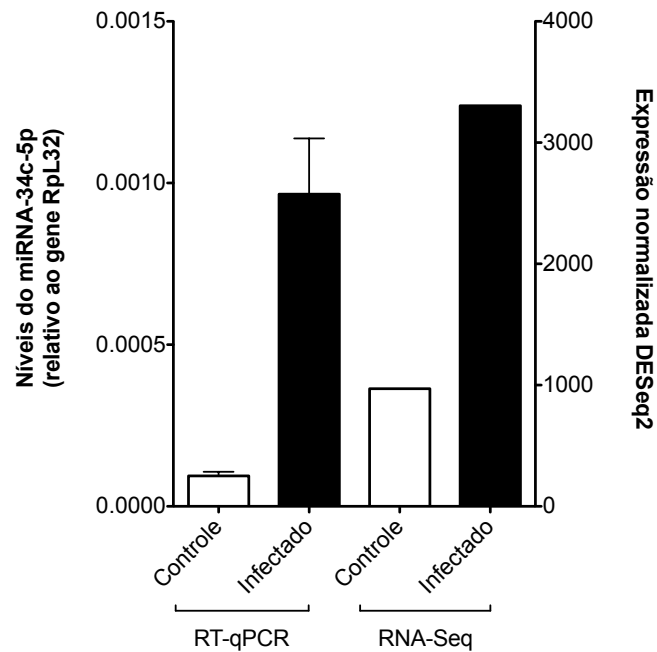
**Figura 32 – Heatmap para os miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção.** Calculado o z-score de cada miRNA na amostra infectadas em relação a amostra controle.

Para as etapas seguintes nós selecionamos o miR-34c-5p, pois ele mostrou uma diferença na sua expressão comparado aos controles nos tempos de 2, 4 e 8 horas, embora no tempo de 2 horas não tenha apresentado significância estatística. Além disto, este miRNA foi consistentemente identificado como regulado positivamente pelos diferentes métodos de seleção utilizados neste trabalho.

### 5.2.2.6 Validação da expressão do miRNA miR-34c-5p

Conforme descrito anteriormente o miR-34c-5p mostrou regulação positiva significativa tanto entre os métodos de seleção quanto nos diferentes tempos de

infecção. Portanto, avaliamos a expressão do miR-34c-5p por RT-qPCR. Observamos o aumento da expressão na amostra infectada no tempo 8 horas em relação ao controle (Figura 33).



**Figura 33 – Expressão no RNA-Seq e RT-qPCR para o miRNA miR-34c-5p tempo 8 horas.** Expressão do miR-34c-5p medida por RT-qPCR normalizada pelo gene Rpl32. Expressão da expressão do miRNA no RNA-Seq pela ferramenta DESeq2.

A família miR-34 contém os miRNAs miR-34a, 34b e 34c, que foram identificados primeiramente como reguladores transcricionais de p53 (CHANG et al., 2007; CORNEY et al., 2007; HE et al., 2007) e podem atuar como supressores tumorais por indução de apoptose e controlar o ciclo celular (HERMEKING, 2010). O miRNA miR-34c-5p, especificamente, é induzido por hipoxia que leva o aumento da transcrição do miRNA e regulação negativa de sGC (*Soluble guanylyl cyclase*) o principal receptor de NO (*nitric oxide*) e crucial para o controle de várias funções fisiológicas (XU et al., 2012). Assim, a regulação do miR-34c-5p pode estar relacionada a resposta a infecção pelo *T. cruzi* e este miRNA seria um bom candidato para futuros testes funcionais.

### 5.3 Transcriptoma de RNAs mensageiros durante a infecção

Os miRNAs atuam através da desestabilidade do complexo de tradução dos mRNAs. Portanto, para entender qual seria o perfil de expressão dos mRNAs, realizamos o sequenciamento de mRNAs de macrófagos infectados para determinar o impacto geral da infecção pelo *T. cruzi* no transcriptoma do hospedeiro e possivelmente nos alvos dos miRNA diferencialmente expressos. A expressão de mRNAs pode ser mensurada por diversas técnicas de biologia molecular, principalmente por RT-qPCR para medir a expressão do transcrito de RNA. Entretanto a técnica de RT-qPCR possui limitações de sensibilidade e a necessidade de se conhecer a sequência alvo para o uso de iniciadores específicos. Diante disso, o sequenciamento do transcriptoma possui alta sensibilidade e possibilita na detecção da grande maioria dos mRNAs expressos nas amostras. Tem sido utilizado tanto para entender o comportamento da expressão gênica como para validação de outras técnicas.

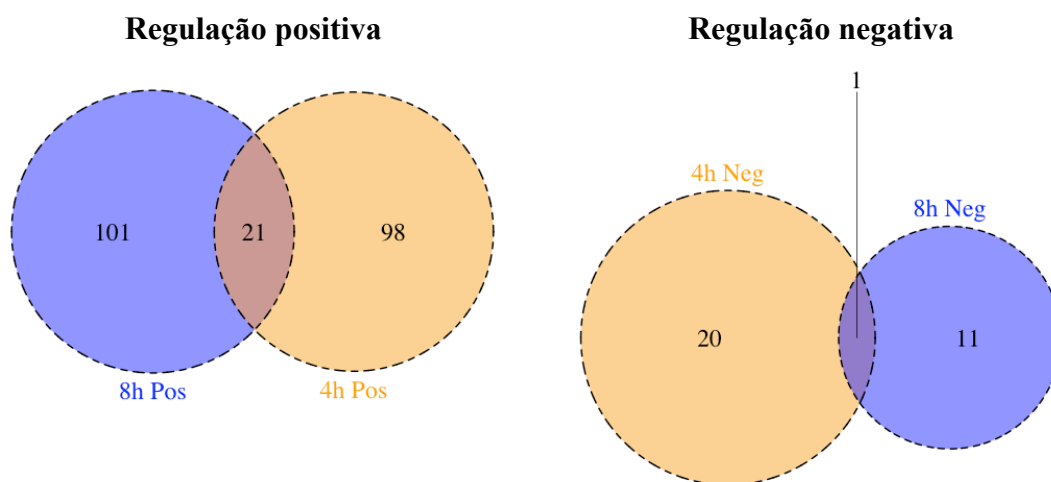
Ao longo da infecção identificamos 18 miRNAs diferencialmente expressos nos tempos de 2, 4 e 8 horas após infecção. Posteriormente identificamos os genes alvos preditos e validados com a ferramenta TargetScan e a base de dados StarBase, respectivamente. Para a validação dos alvos preditos e/ou validados podemos medir a expressão por RT-qPCR ou então realizar o sequenciamento dos mRNAs por RNA-Seq. A segunda opção nos permite entender qual o perfil de expressão dos mRNAs ao longo da infecção e identificar aqueles mRNAs alvos dos miRNAs foram expressos diferencialmente. Dessa forma, preparamos e sequenciamento os macrófagos infectados com *T. cruzi* no tempo de 4 e 8 horas após infecção. Estes tempos foram escolhidos para identificar aqueles alvos para os miRNAs diferencialmente expressos no tempo de 2 horas e que se mantiveram diferencialmente expressos em 4 e 8 horas nas bibliotecas de mRNAs.

**Tabela 9 – Resumo das bibliotecas de transcriptoma para os tempos de infecção 4 e 8 horas.** Sequências mapeadas no genoma do *M. musculus* e *T. cruzi* com a ferramenta TopHat com parâmetros padrões

Tempos (h)	Total sequências		mRNAs expressão	
	Sequenciado	Mapeado	Positiva	Negativa
4	14.730.870 (C)	13.734.572 (93%)	119	21
	15.800.628 (I)	13.904.069 (88%)		
8	8.978.431 (C)	8.274.811 (92%)	122	12
	7.753.602 (I)	6.843.268 (88%)		

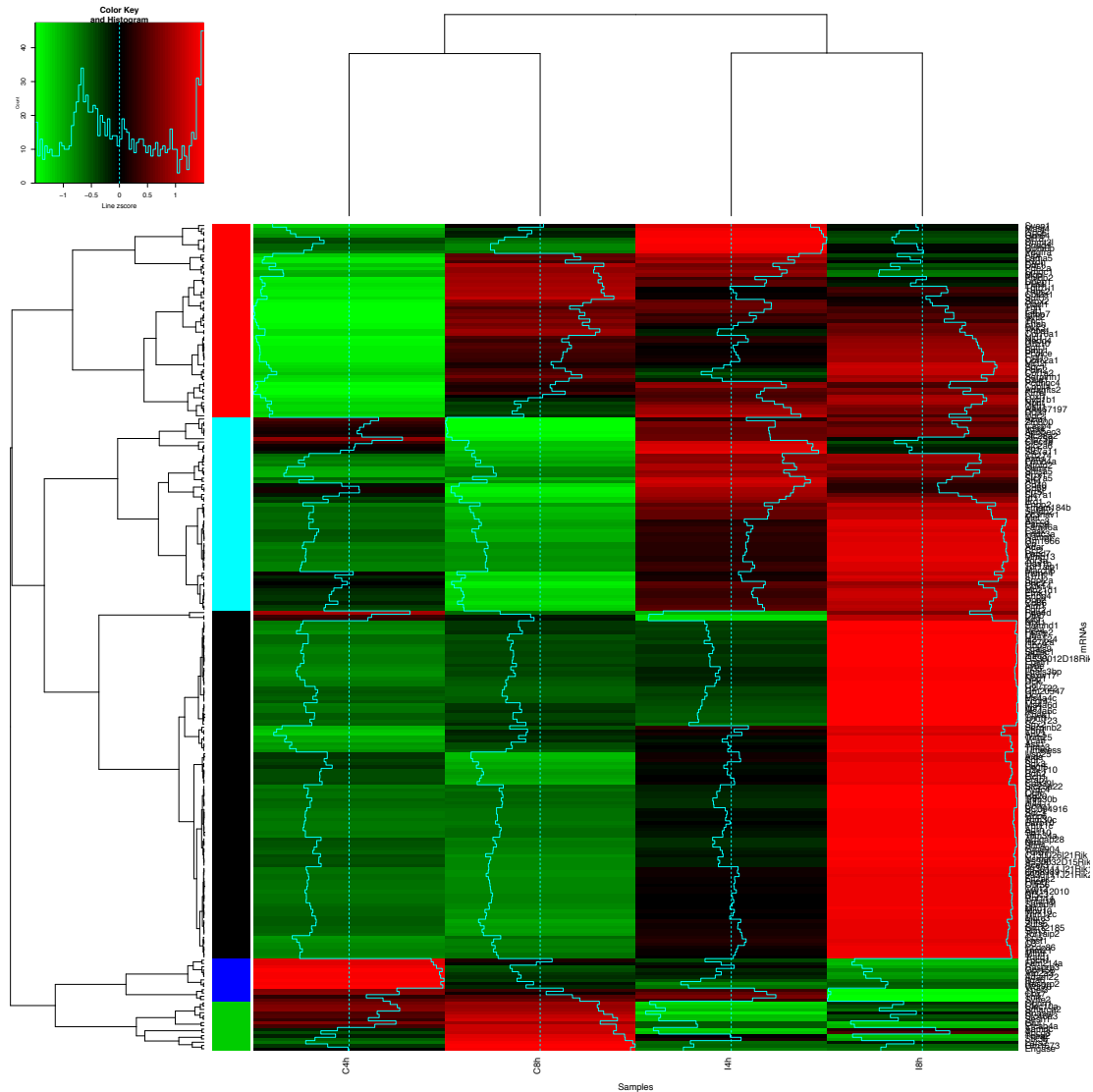
(C) Amostra Controle; (I) Amostra Infectada.

A Tabela 9 possui as informações gerais de mapeamento das bibliotecas do transcriptoma da infecção. No total foram sequenciadas 11 milhões de seqüências em média para cada biblioteca, sendo que 10 milhões foram mapeadas contra o genoma do *M. musculus* e/ou *T. cruzi*. Identificamos no total 15.990 genes expressos dos quais 134 e 140 foram diferencialmente expressos nos tempos de 4 e 8 horas, respectivamente. Dentre os genes diferencialmente expressos 21 foram regulados negativamente e 119 foram regulados positivamente no tempo de 4 horas e 12 foram regulados negativamente e 122 foram regulados positivamente no tempo de 8 horas (Figura 34).



**Figura 34 – Diagrama de venn para os genes diferencialmente expressos no transcriptoma de 4 e 8 horas após infecção.** Os genes regulados positivamente estão representados por 4h Pos ou 8h Pos. Os genes regulados negativamente representados por 4h Neg ou 8h Neg.

O padrão de expressão dos mRNAs expressos no transcriptoma mostra que há um grupo de genes com expressão aumentada nas amostras infectadas. Este fato é constatado na quantidade de genes regulados positivamente com significância estatística inferior a 5%, cerca de 84% do total. Em uma minoria dos genes observamos uma diminuição na expressão diferencial (Figura 35).

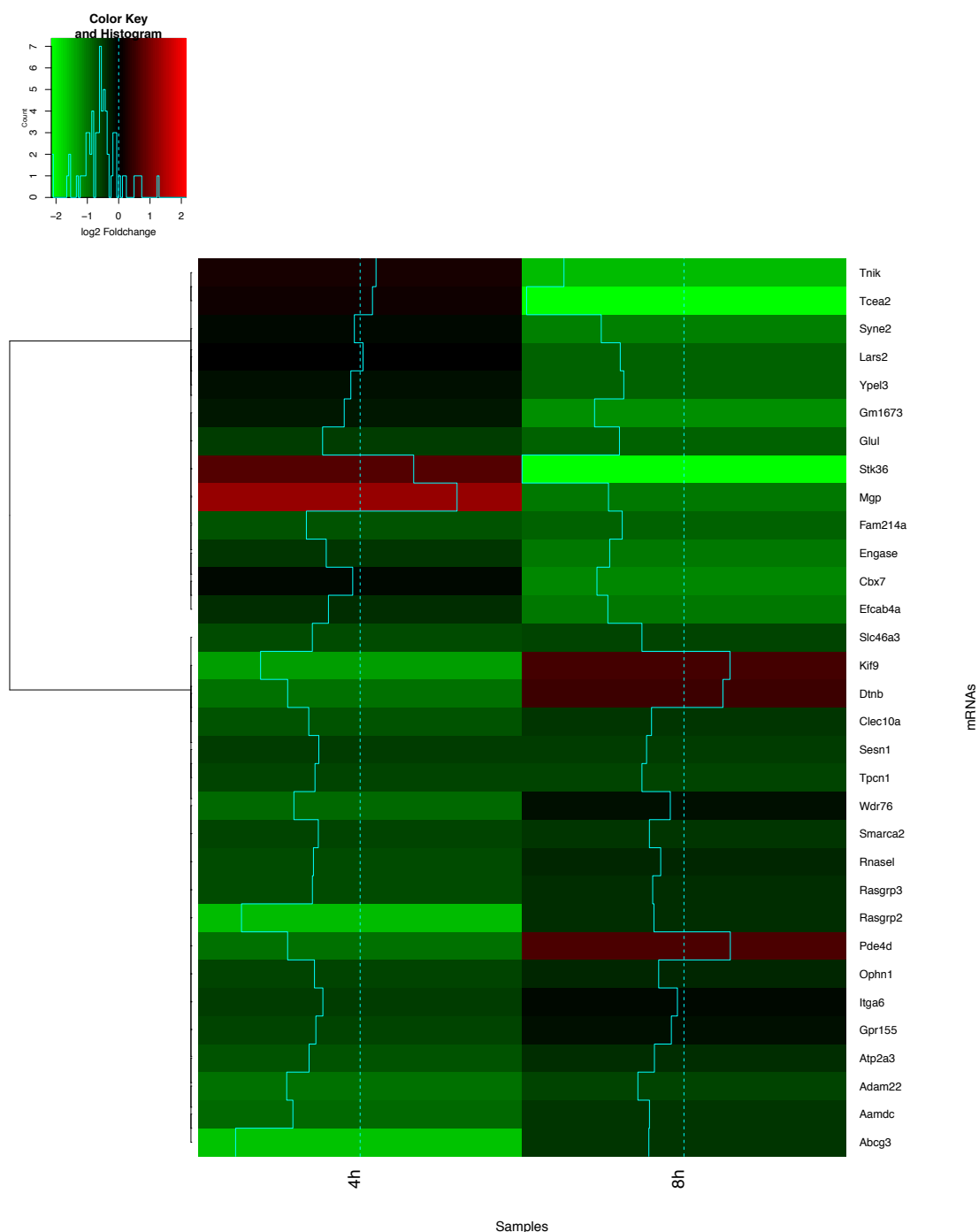


**Figura 35 – Heatmap da expressão normalizada pelo DESeq2 para as bibliotecas infectadas e controle do transcriptoma.** A expressão dos mRNAs expressos no transcriptoma 4 e 8 horas foi normalizada pelo *zscore* da linha para construção do *heatmap*. A coluna com diferentes cores abaixo do dendrograma da linha representa os *clusters* de genes com expressão similar. As duas primeiras colunas correspondem as amostras controle do 4 e 8 horas. As duas últimas colunas correspondem as amostras infectadas do 4 e 8 horas.

Avaliamos os genes com expressão diferencial citados anteriormente, onde calculamos o valor de *foldchange* entre as amostras infectadas e controle em cada tempo de infecção e construímos o *heatmap* para os genes regulados positivamente (Figura 36). Podemos observar que os genes regulados positivamente foram separados em dois grupos distintos. O “grupo A” com 154 genes com regulação positiva em relação ao controle que aumentaram a diferença no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas após infecção. E “grupo B” com 65 genes com regulação positiva em



Da mesma forma, avaliamos os genes com expressão diminuída, onde calculamos o valor de *foldchange* entre a amostra infectada e controle em cada tempo de infecção e construímos o *heatmap* (Figura 37).



**Figura 37 – Heatmap da expressão *foldchange* dos mRNAs diferencialmente nos tempos de 4 e 8 horas após infecção.** A expressão do *foldchange* das amostras infectadas em relação ao controle foram utilizadas para a construção do *heatmap*. A primeira coluna corresponde a amostra 4 horas e a segunda coluna corresponde a amostra 8 horas.

#### 5.4 Busca por alvos preditos e validados para os miRNAs diferencialmente expressos

Para determinar a função dos 18 miRNAs diferencialmente expressos pela ferramenta DESeq2, realizamos a predição dos alvos com a ferramenta TargetScan (versão 7.1) e a busca por alvos validados por PAR-CLIP na base de dados StarBase (versão 2.0) (LI et al., 2014; YANG et al., 2011). A Tabela 10 contém os alvos preditos para miRNA pela ferramenta TargetScan onde leva em consideração a associação da *seed* do miRNA com a região 3' UTR dos alvos candidatos e os alvos validados depositados na base de dados StarBase onde foi realizado a imunoprecipitação da proteína Argonaute e os RNAs contidos no complexo RISC foram sequenciados e detectado a presença de miRNAs em conjunto com seus possíveis alvos.

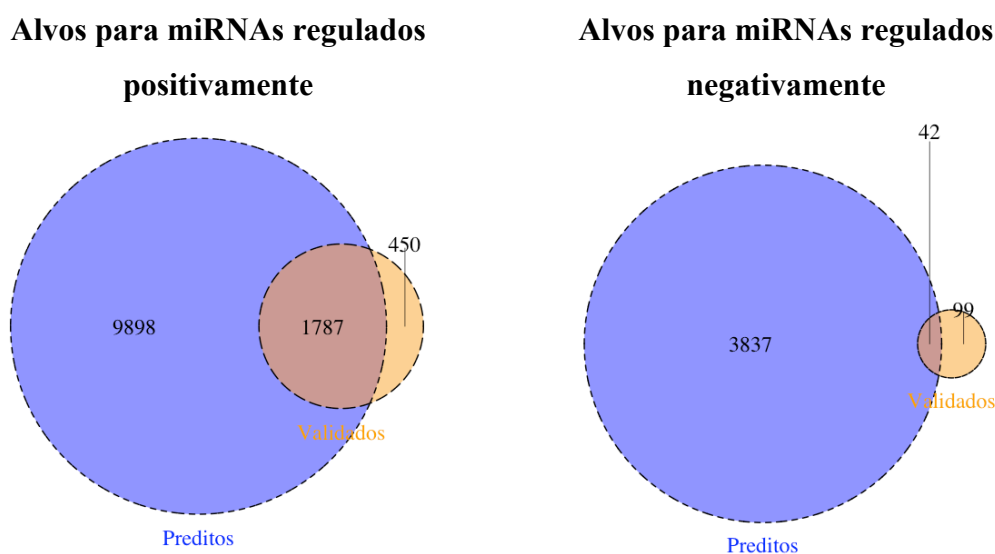
**Tabela 10 – Busca por alvos para os miRNAs diferencialmente expressos.** A predição de alvos foi feita com a ferramenta TargetScan onde leva em consideração a sequência da *seed* para avaliar a interação entre miRNAs e possível alvo. A validação dos alvos foi realizada com a busca na base de dados de sequenciamentos de PAR-CLIP, onde o complexo RISC foi imunoprecipitado e os RNAs associados no complexo sequenciado. O total de alvos preditos ou validados inclui os genes que foram identificados em um ou mais miRNAs e em parênteses corresponde ao total os alvos removendo a duplicidade

miRNAs	Regulação	Alvos preditos (TargetScan*)	Alvos validados (StarBase**)	Ambos
miR-130a-3p	Positiva	799	651	318
miR-142a-3p		307	-	-
miR-143-3p		431	213	42
miR-193a-3p		233	99	26
miR-196b-5p		310	254	71
miR-199a-5p		516	250	62
miR-214-3p		6.691	453	309
miR-214-5p		187	-	-
miR-218-5p		958	252	114
miR-21a-3p		5.452	-	-
miR-29b-3p		1.051	532	261
miR-338-5p		4.519	-	-
miR-34b-5p		666	369	101
miR-34c-5p		666	417	108
miR-455-5p		226	-	-
miR-451a		24	66	5
miR-411-5p		Negativa	95	141
miR-434-3p	3.806		-	-
<b>Total</b>		<b>26.937 (12.365)</b>	<b>3.697 (2.292)</b>	<b>1.431 (1.082)</b>

\*TargetScan versão 7.1 disponibilizada em Janeiro de 2016;

\*\*StarBase versão 2.0 disponibilizada em Setembro de 2013 – Considerando alvos encontrados em pelos menos uma das bibliotecas de PAR-CLIP utilizadas para análise.

A Figura 38 mostra que a grande maioria dos alvos validados estão contidos nos alvos preditos para os miRNAs regulados positivamente. Foram 9.898 alvos preditos exclusivamente, 450 alvos validados exclusivamente e 1.787 alvos em ambos. Este resultado indica que os genes encontrados na base de dados de alvos validados é mais específico do que os alvos preditos. O qual podemos observar pela quantidade de alvos preditos em relação aos validados, com exceção para os miRNAs miR-411-5p e miR-451a que apresentaram mais alvos validados do que preditos. Além do mais, a predição é dada apenas pela complementariedade da *seed* do miRNA e 3' UTR dos genes alvos, o que leva a uma quantidade maior de genes alvos candidatos preditos, pois a sequência *seed* possui entre 6 a 8 nucleotídeos de tamanho. Entretanto, não observamos o mesmo fenômeno com os alvos para os miRNAs regulados negativamente. A ferramenta DESeq2 apresentou apenas 2 miRNAs regulados negativamente e em contrapartida foram 16 miRNAs regulados positivamente. Possivelmente não obtivemos miRNAs regulados negativamente suficientes para observar uma relação clara entre alvos preditos e validados. A possível explicação da interação entre os alvos e os miRNAs regulados negativamente, é que estes miRNAs são menos abundantes do que os miRNAs regulados positivamente e por isso não observamos uma sobreposição significativa entre alvos preditos e validados. Pois a baixa abundância da expressão reduz as chances do sequenciamento durante a interação entre o alvo e o miRNA.



**Figura 38 – Diagrama de venn para os genes alvos preditos e validados para os miRNAs regulados negativamente e positivamente.** Os alvos preditos (circulo azul) foram detectados com a ferramenta TargetScan e alvos validados foram pesquisados na base de dados StarBase (circulo laranja).

Para aumentar a confiabilidade das análises, utilizamos apenas os alvos encontrados em ambas bases de dados, TargetScan e StarBase. Para facilitar, denominaremos os “alvos preditos e validados” daqui pra frente apenas como “alvos”.

Uma das características dos miRNAs é a capacidade de regular uma gama grande de alvos, com capacidade de regular um ou mais mRNAs. Este fato é comum pela complementariedade de baixa quantidade de bases, no caso da sequência da *seed* e até mesmo com o restante do miRNA (em torno de 22 nucleotídeos no total). A grande maioria da interação entre miRNAs e mRNAs ocorre com complementariedade imperfeita, com exceção da região da *seed*. Dessa maneira, o repertório de alvos regulados por um miRNAs pode aumentar significativamente. Por outro lado, um mesmo mRNA pode ser regulado por um ou mais miRNAs, pois pode haver diversos sítios para diferentes miRNAs na região 3' UTR dos alvos. Quando a região 3' UTR dos genes não estão resolvidas, utiliza-se em média 1000 nucleotídeos para realizar a predição do sítio de ligação para os miRNAs. Em média são observados mais 400 interações de mRNAs e miRNAs conservadas, relacionadas com a maioria dos mRNAs de mamíferos (FRIEDMAN et al., 2009). Portanto, há uma rede de regulação complexa entre os miRNAs e mRNAs alvos com interação N:N, onde um miRNAs pode regular um ou mais mRNAs e um mRNA pode ser regulado por um ou mais miRNAs.

Essa complexidade de interação de alvos dos miRNAs diferencialmente expressos foi observado nas bibliotecas sequenciadas deste estudo. Além da complexidade, é possível observar redundância da regulação e/ou um efeito somatório para a regulação de determinados genes.

### **5.5 Análise do comportamento dos alvos para miRNAs expressos diferencialmente**

Para avaliar a função dos miRNAs regulados positivamente e negativamente, analisamos o enriquecimento para vias biológicas dos alvos. Para a análise de enriquecimento para vias biológicas separamos os alvos em três grupos: alvos para os miRNAs regulados positivamente, alvos para os miRNAs regulados negativamente e alvos para o miR-34c-5p. As vias biológicas utilizadas para a análise de enriquecimento foram obtidas da base de dados Reactome.org. Observamos que a

maioria dos genes alvos para cada grupo, foi detectado no transcriptoma apresentando média de 97,31% (Tabela 11).

**Tabela 11 – Grupos de genes alvos para análise funcional.** Genes alvos para os miRNAs diferencialmente expressos foram separados em dois grupos para os miRNAs com regulação positiva, negativa ou somente para o miR-34c-5p. E a expressão dos alvos no transcriptoma 4 ou 8 horas.

<b>Grupos</b>	<b>Genes comuns no banco de dados de alvos</b>	<b>Com expressão no transcriptoma</b>
Alvos para miRNAs com expressão aumentada durante a infecção	1.073	1.045 (97,39%)
Alvos para miRNAs com expressão diminuída durante a infecção	14	13 (92,85%)
Alvos somente para o miR-34c-5p	108	102 (94,44%)
<b>Total</b>	<b>1.082</b>	<b>1.053 (97,31%)</b>

As tabelas 12 e 13 apresentam as 20 primeiras vias enriquecidas, ordenadas pela significância estatística, com valor de  $p$  menor que 1% para as vias dos alvos de miRNAs com regulação positiva e negativa e valor de  $p$  menor que 5% para as vias do miR-34c-5p. Realizamos o filtro das vias redundantes e aquelas que apresentaram mais de 2 genes por via biológica. A tabela 12 contém as vias biológicas enriquecidas para o grupo de genes alvos para miRNAs com regulados positivamente, no qual apresentou principalmente vias enriquecidas envolvidas com sinalização de TGF- $\beta$ , ativação de AKT/PI3K e atividade transcricional das Smads. A tabela 13 contém as vias biológicas enriquecidas para os grupos de genes alvos para miR-34c-5p, no qual observamos as vias enriquecidas envolvidas com sinalização extracelular por NOTCH, resposta de apoptose e controle do ciclo celular. Na figura 39 mostra as vias enriquecidas e genes alvos, observamos que alguns genes possuem função em diversas vias. Não observamos enriquecimento para os genes alvos para os miRNAs regulados negativamente para vias biológicas.

Tem sido descrito na literatura que o TGF- $\beta$  induz a reorganização de citoesqueleto de Actina em diversos modelos (ASSINDER; COLE, 2011; HUBCHAK et al., 2003; VARDOULI; MOUSTAKAS; STOURNARAS, 2005) por ativação e mobilização de Cdc42, RhoA e LIM-quinase (EDLUND et al., 2002; HUBCHAK et al., 2003). Calvet e colaboradores sugerem que a desorganização do citoesqueleto desencadeada pelo parasita, pode ser resultante da resposta de TGF- $\beta$  alterada ou baixa. Foi observado este fenômeno em cardiomiócitos altamente

infectados e conseqüentemente no evento de persistência da infecção (CALVET et al., 2016).

Outra via que vem sendo descrita importante para a infecção por *T. cruzi* é a via de PI3K. A inibição de PI3K por Wortmannin e LY294002 leva o bloqueio da invasão do *T. cruzi* em células hospedeiras como macrófagos e células não-fagocitárias (WILKOWSKY et al., 2001). A função de PKB/Akt tem sido demonstrada na fosforilação de BAD (LIZCANO; MORRICE; COHEN, 2000), que representa um sinal para resposta anti-apoptótica na célula hospedeira. Wilkowsky e colaboradores sugerem que a regulação positiva dessas enzimas pode ser considerado uma estratégia parasitária para preservar a vida da célula hospedeira e permitir que os parasitas estabeleçam um ambiente seguro para a sua sobrevivência e propagação da infecção (WILKOWSKY et al., 2001).

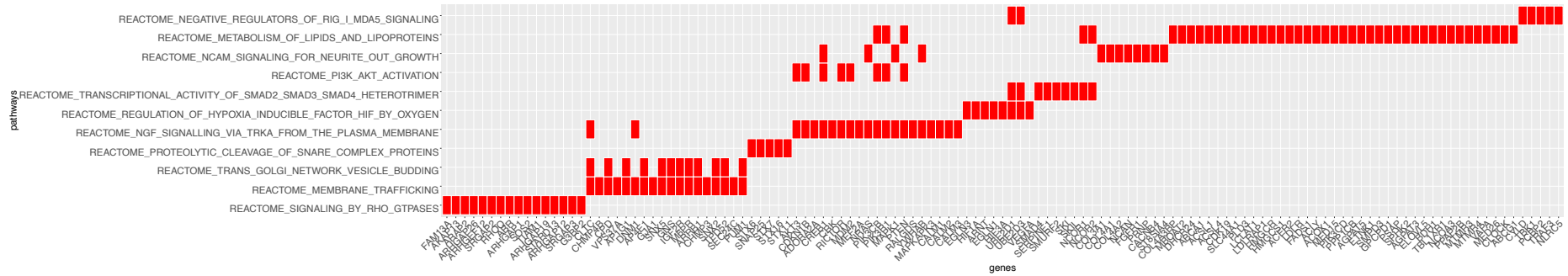
**Tabela 12 – Vias enriquecidas para os genes alvos dos miRNAs regulados positivamente.** Cada via enriquecida possui a frequência dos genes alvos em relação ao total da via e valor do teste de significância para o enriquecimento. As vias foram filtradas pelo significância estatística com valor de  $p \leq 1\%$  e contendo pelo menos 2 genes por via. No total foram 45 vias enriquecidas e as 20 vias mais significativas estão representadas na tabela

<b>Vias biológicas no <i>Reactome</i></b>	<b>Frequência</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
NEGATIVE_REGULATORS_OF_RIG_I_MDA5_SIGNALING	0.25	1.76E-03
METABOLISM_OF_LIPIDS_AND_LIPOPROTEINS	0.1081	7.00E-04
NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH	0.2069	3.09E-04
PI3K_AKT_ACTIVATION	0.2286	1.56E-03
TRANSCRIPTIONAL_ACTIVITY_OF_SMAD2_SMAD3_SMAD4_HETEROTRIMER	0.25	3.97E-04
REGULATION_OF_HYPOXIA_INDUCIBLE_FACTOR_HIF_BY_OXYGEN	0.35	1.82E-04
NGF_SIGNALLING_VIA_TRKA_FROM_THE_PLASMA_MEMBRANE	0.1654	7.26E-05
PROTEOLYTIC_CLEAVAGE_OF_SNARE_COMPLEX_PROTEINS	0.3846	9.77E-04
TRANS_GOLGI_NETWORK_VESICLE_BUDDING	0.2353	8.41E-05
MEMBRANE_TRAFFICKING	0.1698	1.65E-04
SIGNALING_BY_RHO_GTPASES	0.1509	1.40E-03
ACTIVATION_OF_BH3_ONLY_PROTEINS	0.3333	2.04E-03
SIGNALING_BY_NOTCH	0.1538	2.26E-03
APOPTOSIS	0.1364	2.36E-03
TRANSPORT_OF_GLUCOSE_AND_OTHER_SUGARS_BILE_SALTS_AND_ORGANIC_ACIDS_METAL_IONS_AND_AMINE_COMPOUNDS	0.1719	2.68E-03
TRANSPORT_TO_THE_GOLGI_AND_SUBSEQUENT_MODIFICATION	0.2333	2.69E-03
RIG_I_MDA5_MEDIATED_INDUCTION_OF_IFN_ALPHA_BETA_PATHWAYS	0.1818	2.70E-03
ALPHA_LINOLENIC_ACID_ALA_METABOLISM	0.4	2.77E-03
DESTABILIZATION_OF_MRNA_BY_TRISTETRAPROLIN_TTP	0.3125	2.81E-03
N GLYCAN ANTENNAE ELONGATION IN THE MEDIAL TRANS GOLGI	0.3125	2.81E-03

**Tabela 13 – Vias enriquecidas para os genes alvos do miR-34c-5p.** Cada via enriquecida possui a frequência dos genes alvos em relação ao total da via e valor do teste de significância para o enriquecimento. As vias foram filtradas pelo significância estatística com valor de  $p \leq 5\%$  e contendo pelo menos 2 genes por via. No total foram 7 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela

<b>Vias biológicas no <i>Reactome</i></b>	<b>Frequência</b>	<b>Pvalue</b>
NUCLEOTIDE_BINDING_DOMAIN_LEUCINE_RICH_REPEAT_CONTAINING_RECEP	0.0476	2.94E-02
TOR_NLR_SIGNALING_PATHWAYS		
TRANSPORT_TO_THE_GOLGI_AND_SUBSEQUENT_MODIFICATION	0.0667	1.56E-02
MITOTIC_G1_G1_S_PHASES	0.0238	4.68E-02
DEADENYLATION_DEPENDENT_MRNA_DECAY	0.0476	2.94E-02
FACILITATIVE_NA_INDEPENDENT_GLUCOSE_TRANSPORTERS	0.125	4.99E-02
INTEGRATION_OF_ENERGY_METABOLISM	0.0306	2.48E-02
PRE_NOTCH_TRANSCRIPTION_AND_TRANSLATION	0.0909	8.57E-03
APOPTOTIC_CLEAVAGE_OF_CELLULAR_PROTEINS	0.0625	1.77E-02

A)



B)

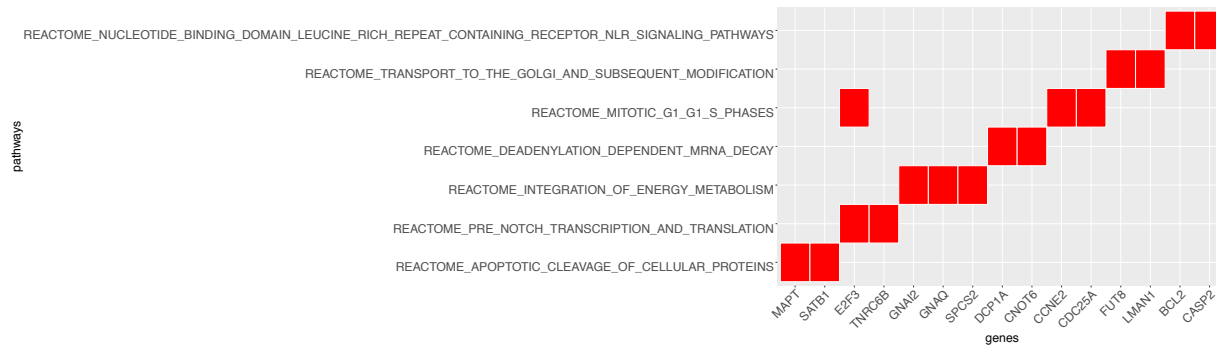
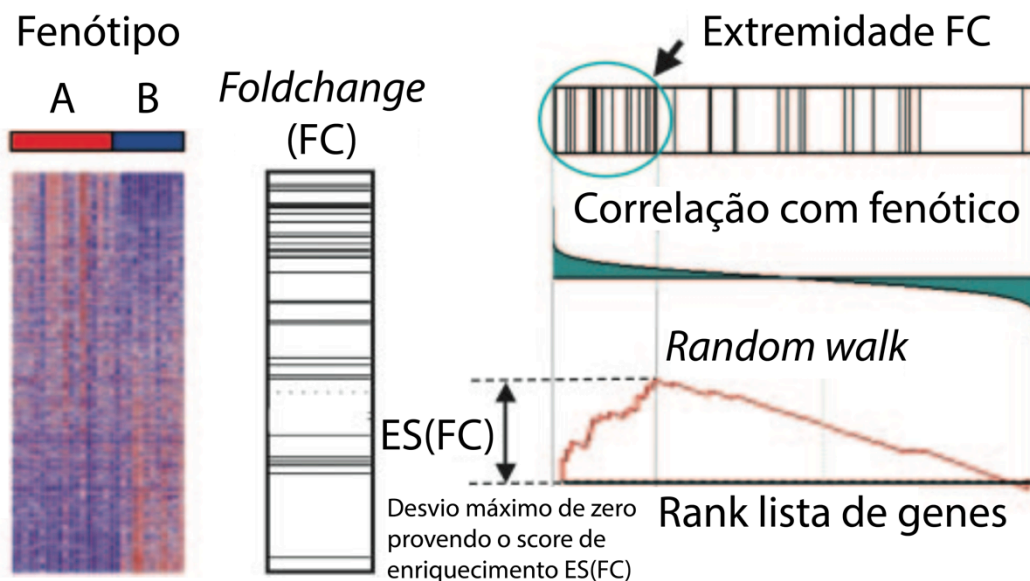


Figura 39 – Representação dos genes alvos para os miRNAs regulados positivamente e miR-34c-5p no Top 20 das vias biológicas enriquecidas. O eixo x representa os genes presentes nas vias enriquecidas representadas no eixo y. A) Vias enriquecidas para os genes alvos para os miRNAs regulados positivamente. B) Vias enriquecidas para os genes alvos para o miR-34c-5p.

## 5.6 Análise de vias enriquecidas nos genes regulados positivamente ao longo da infecção

Os genes diferencialmente expressos no transcriptoma foram definidos pela ferramenta DESeq2 com valor de significância inferior a 5%. Entretanto, a dispersão das bibliotecas pode resultar na perda de alguns genes importantes não observados na seleção inicial. Portanto, utilizamos a ferramenta GSEA (do inglês ‘Gene Set Enrichment Analysis’ ou Análise de Enriquecimento para Conjunto de Genes) que não requer definição prévia dos genes diferencialmente expressos para detectar vias biológicas enriquecidas para genes regulados positivamente ou negativamente. A ferramenta calcula e ordena a expressão diferencial para todos os genes, classifica entre os conjunto de genes ou vias biológicas da base de dados do Reactome.org e calcula um *score* de enriquecimento. Para cada via é calculado o *score* de enriquecimento e uma significância estatística quando há um conjunto de genes agrupados nas extremidades da lista dos genes (Figura 40).



**Figura 40 – Ferramenta *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) para análise de enriquecimento de vias biológicas.** A ferramenta DESeq2 avalia o enriquecimento das vias biológicas sem necessidade de definição dos genes diferencialmente expressos. A partir de duas bibliotecas com fenótipos diferentes, calcula-se e ordena-se o *foldchange*. Com esse conjunto de dados o GSEA classifica os genes nas vias biológicas anotadas e por fim, avalia o score de enriquecimento. Quando os genes estão agrupados nas extremidades, o score de enriquecimento apresenta significância estatística. Figura adaptada do (SUBRAMANIAN et al., 2005).

Todos os genes expressos no transcriptoma de 4 e 8 horas foram ordenados pelo *foldchange* e analisados utilizando a ferramenta GSEA. As tabelas 14, 15, 16 e 17

contém o *Top 20* das vias biológicas enriquecidas para os genes do transcriptoma de 4 e 8 horas regulados positivamente e negativamente. Realizamos o filtro das vias enriquecidas com redundância dos genes e com nível de significância com valor de  $p < 5\%$ .

**Tabela 14 – Top 20 das vias enriquecidas para os genes regulados positivamente no transcriptoma 4 horas com a ferramenta GSEA.** Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 40 vias enriquecidas e as 20 primeiras vias mais significativas estão representadas na tabela

<b>Vias biológicas no <i>Reactome</i></b>	<b>Tamanho</b>	<b>ES</b>	<b>NES</b>	<b>NOM p-val</b>	<b>FDR q-val</b>
EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	71	0.67	2.45	0	0
YAP1_AND_WWTR1_TAZ_STIMULATED_GENE_EXPRESSION	19	0.75	2.07	0	0.0016
AMINO_ACID_TRANSPORT_ACROSS_THE_PLASMA_MEMBRANE	25	0.66	1.95	0	0.0051
INTERFERON_SIGNALING	114	0.48	1.90	0	0.0078
NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH	55	0.54	1.86	0	0.012
INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS	74	0.47	1.74	0	0.035
AMINO_ACID_AND_OLIGOPEPTIDE_SLC_TRANSPORTERS	40	0.52	1.72	0	0.039
CYTOKINE_SIGNALING_IN_IMMUNE_SYSTEM	205	0.40	1.70	0	0.044
CHONDROITIN_SULFATE_DERMATAN_SULFATE_METABOLISM	31	0.58	1.80	0.0016	0.020
A_TETRASACCHARIDE_LINKER_SEQUENCE_IS_REQUIRED_FOR_GAG_SYNTHESIS	17	0.70	1.90	0.0017	0.0082
NCAM1_INTERACTIONS	32	0.61	1.87	0.0017	0.011
PI_3K_CASCADE	38	0.52	1.64	0.0048	0.073
SHC_MEDIATED_CASCADE	17	0.65	1.75	0.0052	0.035
ADHERENS_JUNCTIONS_INTERACTIONS	18	0.63	1.74	0.0071	0.036
GRB2_EVENTS_IN_ERBB2_SIGNALING	19	0.59	1.59	0.0072	0.10
SMAD2_SMAD3_SMAD4_HETEROTRIMER_REGULATES_TRANSCRIPTION	24	0.55	1.61	0.010	0.09
GLYCOSAMINOGLYCAN_METABOLISM	81	0.41	1.51	0.011	0.13
PPARA_ACTIVATES_GENE_EXPRESSION	77	0.42	1.54	0.012	0.11
P53_DEPENDENT_G1_DNA_DAMAGE_RESPONSE	52	0.46	1.55	0.014	0.12
CELL_CELL_JUNCTION_ORGANIZATION	34	0.49	1.53	0.015	0.12

**Tabela 15 – Vias enriquecidas para os genes regulados negativamente no transcriptoma 4 horas com a ferramenta GSEA.** Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 12 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela

<b>Vias biológicas no <i>Reactome</i></b>	<b>Tamanho</b>	<b>ES</b>	<b>NES</b>	<b>NOM p-val</b>	<b>FDR q-val</b>
PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	80	-0.56	-2.27	0	0
SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	100	-0.52	-2.16	0	0.0011
3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	87	-0.52	-2.14	0	0.0014
PEROXISOMAL_LIPID_METABOLISM	15	-0.76	-2.09	0	0.0021
NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	98	-0.48	-1.94	0	0.012
PACKAGING_OF_TELOMERE_ENDS	35	-0.53	-1.83	0	0.036
FORMATION_OF_THE_TERNARY_COMPLEX_AND_SUBSEQUENTLY_THE_43S_COMPLEX	34	-0.52	-1.74	0.0026	0.075
SIGNALING_BY_RHO_GTPASES	97	-0.37	-1.52	0.0033	0.22
ACTIVATION_OF_THE_MRNA_UPON_BINDING_OF_THE_CAP_BINDING_COMPLEX_AND_EIF5_AND_SUBSEQUENT_BINDING_TO_43S	41	-0.43	-1.53	0.0052	0.22
DEPOSITION_OF_NEW_CENPA_CONTAINING_NUCLEOSOMES_AT_THE_CENTROMERE	48	-0.43	-1.55	0.014	0.22
ACTIVATED_NOTCH1_TRANSMITS_SIGNAL_TO_THE_NUCLEUS	24	-0.51	-1.58	0.021	0.19
PHASE1_FUNCTIONALIZATION_OF_COMPOUNDS	30	-0.48	-1.53	0.027	0.22

**Tabela 16 – Vias enriquecidas para os genes regulados positivamente no transcriptoma 8 horas com a ferramenta GSEA.** Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 69 vias enriquecidas e as 20 primeiras vias mais significativas estão representadas na tabela

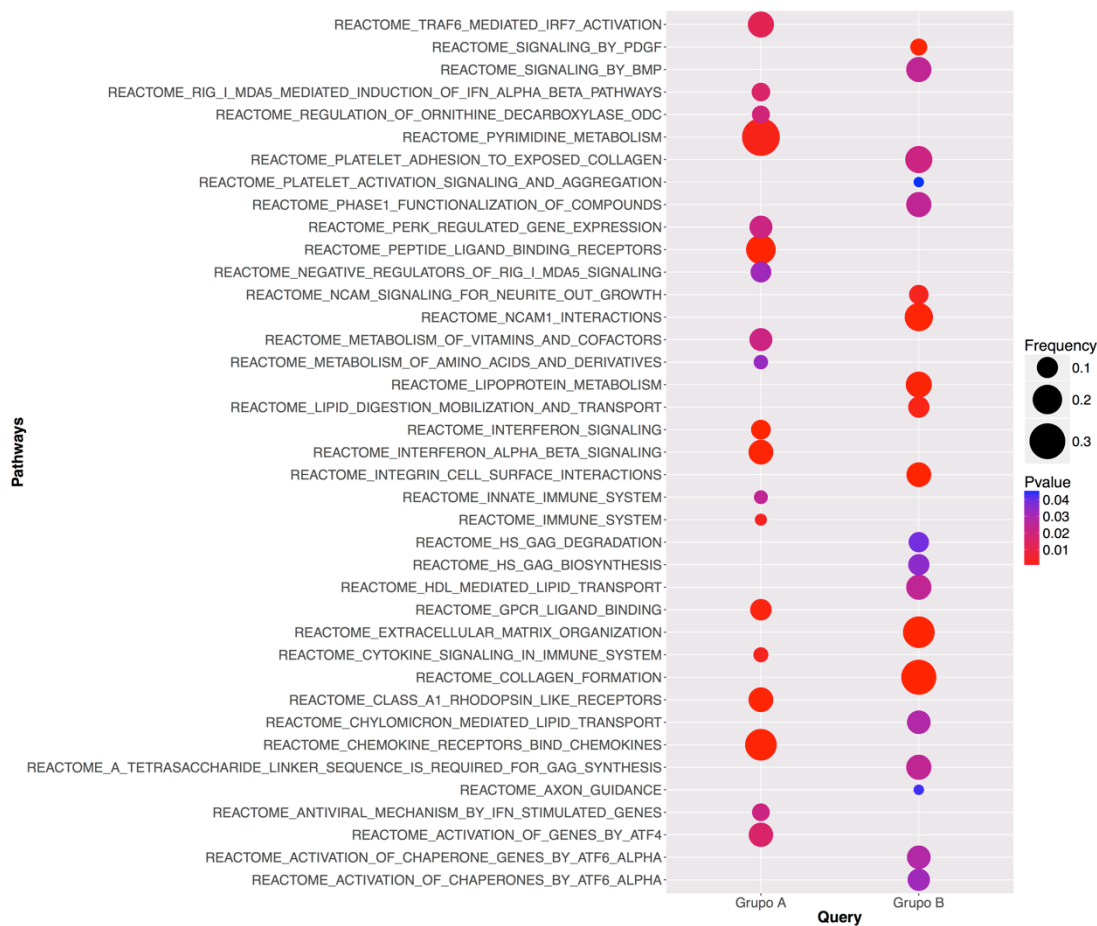
Vias biológicas	Tamanho	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
VIF_MEDIATED_DEGRADATION_OF_APOBEC3G	48	0.57	2.07	0	0.0084
CROSS_PRESENTATION_OF_SOLUBLE_EXOGENOUS_ANTIGENS_ENDOSOMES	45	0.59	2.05	0	0.0054
P53_DEPENDENT_G1_DNA_DAMAGE_RESPONSE	52	0.56	2.04	0	0.0044
P53_INDEPENDENT_G1_S_DNA_DAMAGE_CHECKPOINT	48	0.56	2.02	0	0.0057
ACTIVATION_OF_NF_KAPPAB_IN_B_CELLS	59	0.53	1.99	0	0.0079
AUTODEGRADATION_OF_THE_E3_UBIQUITIN_LIGASE_COP1	46	0.56	1.99	0	0.0072
ER_PHAGOSOME_PATHWAY	53	0.54	1.98	0	0.0063
REGULATION_OF_ORNITHINE_DECARBOXYLASE_ODC	48	0.56	1.98	0	0.0063
APC_C_CDH1_MEDIATED_DEGRADATION_OF_CDC20_AND_OTHER_APC_C_CDH1_TARGETED_PROTEINS_IN_LATE_MITOSIS_EARLY_G1	64	0.52	1.97	0	0.006
ANTIGEN_PROCESSING_CROSS_PRESENTATION	65	0.51	1.95	0	0.0084
CDK_MEDIATED_PHOSPHORYLATION_AND_REMOVAL_OF_CDC6	46	0.55	1.94	0	0.0088
DESTABILIZATION_OF_MRNA_BY_AUF1_HNRNP_D0	49	0.54	1.93	0	0.0083
CYTOSOLIC_TRNA_AMINOACYLATION	20	0.68	1.93	0	0.0079
SCF_BETA_TRCP_MEDIATED_DEGRADATION_OF_EMI1	48	0.54	1.92	0	0.0081
APC_C_CDC20_MEDIATED_DEGRADATION_OF_MITOTIC_PROTEINS	64	0.51	1.92	0	0.0079
ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	58	0.53	1.92	0	0.0079
MITOTIC_G1_G1_S_PHASES	114	0.45	1.91	0	0.0086
CYCLIN_E_ASSOCIATED_EVENTS_DURING_G1_S_TRANSITION	60	0.51	1.9	0	0.0089
CDT1_ASSOCIATION_WITH_THE_CDC6_ORC_ORIGIN_COMPLEX	48	0.52	1.85	0	0.013
REGULATION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	74	0.48	1.85	0	0.012

**Tabela 17 – Vias enriquecidas para os genes regulados negativamente no transcriptoma 8 horas com a ferramenta GSEA.** Cada via enriquecida possui a quantidade total de genes representado na coluna Tamanho, score de enriquecimento (ES), score de enriquecimento normalizado (NES), valor de significância para o enriquecimento (NOM p-val) e valor de significância para a taxa de falsos descobertos (FDR q-val). No total foram 12 vias enriquecidas e todas estão representadas na tabela

<b>Vias biológicas</b>	<b>Tamanho</b>	<b>ES</b>	<b>NES</b>	<b>NOM p-val</b>	<b>FDR q-val</b>
SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	101	-0.58	-2.48	0	0
3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	88	-0.57	-2.34	0	0
NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	99	-0.54	-2.34	0	0
RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT_ATP_SYNTHESIS_BY_CHEMIOSMOTIC_CO UPLING_AND_HEAT_PRODUCTION_BY_UNCOUPLING_PROTEINS_	75	-0.52	-2.14	0	0.00031
TCA_CYCLE_AND_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT	109	-0.45	-1.92	0	0.0089
FORMATION_OF_THE_TERNARY_COMPLEX_AND_SUBSEQUENTLY_THE_43S_CO MPLEX	34	-0.55	-1.91	0	0.0089
ACTIVATION_OF_THE_MRNA_UPON_BINDING_OF_THE_CAP_BINDING_COMPLEX _AND_EIFS_AND_SUBSEQUENT_BINDING_TO_43S	41	-0.47	-1.69	0.0072	0.065
FORMATION_OF_THE_HIV1_EARLY_ELONGATION_COMPLEX	26	-0.51	-1.65	0.0022	0.085
ABORTIVE_ELONGATION_OF_HIV1_TRANSCRIPT_IN_THE_ABSENCE_OF_TAT	17	-0.58	-1.64	0.021	0.086
ACTIVATION_OF_CHAPERONE_GENES_BY_XBP1S	42	-0.42	-1.54	0.022	0.13
FORMATION_OF_TRANSCRIPTION_COUPLED_NER_TC_NER_REPAIR_COMPLEX	28	-0.47	-1.52	0.024	0.15
PEROXISOMAL_LIPID_METABOLISM	15	-0.53	-1.49	0.032	0.18

A análise de enriquecimento para o transcriptoma de 4 e 8 horas observamos que destacou-se vias interessantes sugerindo uma indução na infecção. Identificamos vias enriquecidas positivamente no tempo de 4 horas como, organização da matriz extracelular, sinalização de interferon e citocinas, sinalização de TGF- $\beta$  e cascata de sinalização PI3K. Identificamos vias enriquecidas negativamente no tempo de 4 horas como, alongação de cadeia de peptídeos, metabolismo de lipídeos e sinalização do núcleo por Notch1. Identificamos vias enriquecidas positivamente no tempo de 8 horas como, controle do ciclo celular, desestabilização de mRNAs e processos de apresentação de antígenos. Por fim, identificamos vias enriquecidas negativamente no tempo de 8 horas como, regulação da tradução mediado 3' UTR, metabolismo de lipídeos e ativação de genes chaperonas por XBP1S.

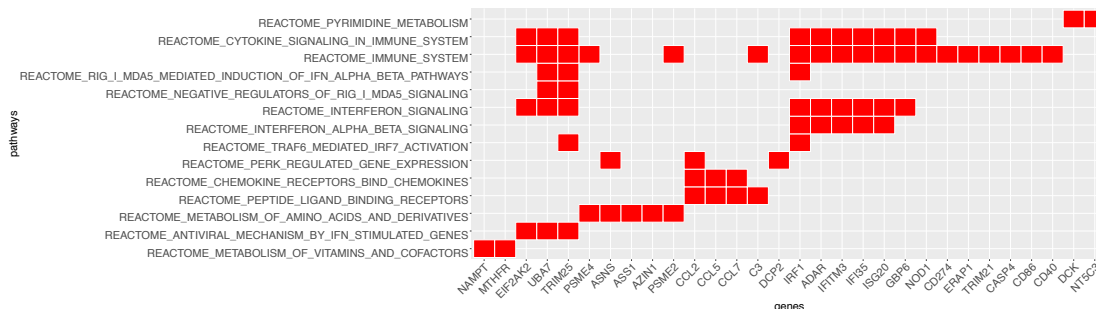
Para um melhor entendimento dos genes regulados positivamente, avaliamos o enriquecimento de vias biológicas nos genes do grupo A e B separadamente. A análise de enriquecimento mostra que os genes regulados positivamente do “grupo A”, foram enriquecidos para vias envolvidas com resposta imune como, sinalização da resposta imune por citocinas, ativação de IRF7 mediada TRAF6 entre outros. Este resultado corrobora a expressão diferencial da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  medida por RT-qPCR e sugere que os macrófagos estão expressando positivamente genes da resposta imune para combater a infecção pelo *T. cruzi*. Para os genes regulados positivamente do “grupo B”, foram enriquecidos para vias envolvidas com a reorganização da matriz extracelular e o transporte e síntese de lipídios. Conforme mencionado anteriormente, há dados na literatura que mostram o aumento da polimerização de F-Actina durante infecções por diversos patógenos. Observamos que o gene da Actina foi alterado dado a infecção por *T. cruzi* via RT-qPCR e que possui uma tendência de atenuar o sinal ao longo da infecção, correlacionando com os genes regulados positivamente no transcriptoma e que diminuem a expressão no tempo de 8 horas (Figura 41).



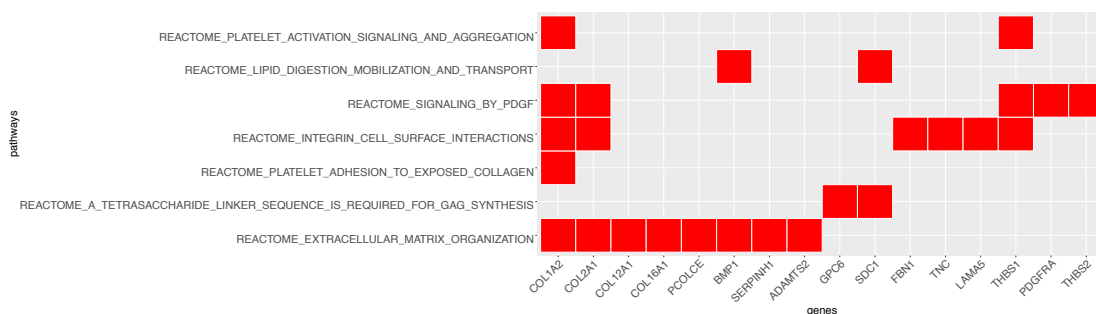
**Figura 41 – Análise de enriquecimento de vias para genes regulados positivamente nos grupos A e B de genes regulados positivamente.** Genes regulados positivamente classificados em grupo A e B pelo padrão de expressão nos tempos 4 e 8 horas. Para cada grupo foi realizado o enriquecimento para vias biológicas utilizando o Teste Exato Fisher, considerando valor de p inferior a 5%

Como mencionado anteriormente, as vias majoritariamente enriquecida para o “grupo A” foram relacionadas com resposta imune. Observamos que muitos dos genes regulados positivamente foram compartilhados entre algumas vias. Estes genes dependendo das interações e/ou níveis de expressão podem atuar em diferentes papéis. Este resultado sugere que estes genes são importantes para diversas vias descritas e anotadas na base de dados do Reactome. No grupo B a quantidade de genes que são compartilhados entre as vias é menor que no grupo A e o padrão do compartilhamento indica que estas vias representam apenas uma via e estamos observando níveis hierárquico diferentes (Figura 42).

## Grupo A



## Grupo B



**Figura 42 – Relação das vias enriquecidas e genes regulados positivamente para os Grupos A e B.** Grupo A corresponde ao genes regulados positivamente que aumentaram a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. Grupo B corresponde ao genes regulados positivamente que aumentaram a expressão no tempo de 8 horas em relação ao tempo de 4 horas. No eixo x corresponde ao genes regulados positivamente para as vias enriquecidas do eixo y.

### 5.7 Correlação da expressão dos alvos no transcriptoma por genes ou vias

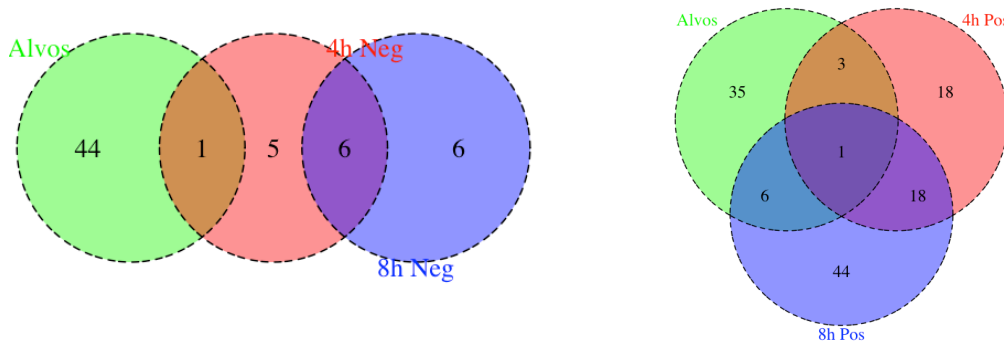
Avaliamos se os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos e do miR-34c-5p foram enriquecidos para os grupos de genes regulados positivamente, negativamente ou sem alteração no transcriptoma. Para isso realizamos o Teste Exato Fisher para os grupos de alvos em relação ao genes expressos no transcriptoma 4 e 8 horas. Contudo, não observamos significância estatística inferior a 5% (Tabela 18).

**Tabela 18 – Teste Exato Fisher para os alvos dos miRNAs regulados positivamente, negativamente e somente para miR-34c-5p nos grupos de genes regulados positivamente, negativamente ou sem alteração no transcriptoma 4 e 8 horas.** Para avaliar se os genes alvos dos miRNAs expressos diferencialmente foram significativamente representados nos mRNAs expressos diferencialmente realizamos o teste exato Fisher. Na coluna Expressão mRNAs contém os grupos de mRNAs regulados positivamente, negativamente e sem alteração, o valor entre parênteses representa o número de mRNAs em cada grupo. Nas colunas de Alvos miRs positivos, negativos e miR-34c-5p corresponde ao teste de enriquecimento, onde o valor indica a frequência dos genes alvos em cada grupo do transcriptoma e o valor em parênteses corresponde ao valor de  $p$

<b>Expressão mRNAs</b>	<b>Tempos (h)</b>	<b>Alvos miRs regulados positivamente</b>	<b>Alvos miRs regulados negativamente</b>	<b>Alvos do miR-34c-5p</b>
Positiva (119)	4	0	0	0
Negativa (21)		0	0	0
Sem alteração (15429)		0.0284 (0.991)	0	0.0170 (0.102)
Positiva (122)	8	0	0	0
Negativa (12)		0	0	0
Sem alteração (14930)		0.0289 (0.989)	0	0.0173 (0.987)

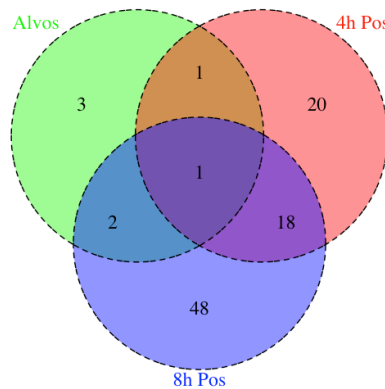
A falta de enriquecimento entre os grupos de genes, pode ser explicado pela baixa representação dos alvos no conjunto de genes diferencialmente expressos. A resposta global à infecção pelo *T. cruzi* poderia mascarar a papel regulatório dos miRNAs. Além disso, a regulação dos genes alvos pelos miRNAs são mais finas do que no controle exacerbados da expressão gênica. Apesar da ausência de padrão na análise de alvos específicos, é possível que os miRNAs ainda assim tenham um papel na regulação de vias envolvidas na resposta à infecção. Para analisar esta possibilidade, analisamos se as vias enriquecidas para os alvos de miRNAs seriam comuns às reguladas no transcriptoma durante a infecção (Figuras 43-44).

**Vias enriquecidas para alvos dos miRNAs regulados positivamente versus transcriptoma 4 e 8 horas**



**Figura 43 – Diagrama de venn para as vias enriquecidas dos alvos dos miRNAs regulados positivamente versus as vias enriquecidas do transcriptoma 4 e 8 horas.** As vias enriquecidas para os alvos foram determinadas por Teste Exato Fisher e as vias enriquecidas para os genes expressos no transcriptoma foram determinadas pela ferramenta GSEA. Valor de significância inferior a 5%.

**Vias enriquecidas para alvos para miR-34c-5p versus transcriptoma 4 e 8 horas**



**Figura 44 – Diagrama de venn para as vias enriquecidas dos alvos do miR-34c-5p expresso positivamente versus as vias enriquecidas do transcriptoma 4 e 8 horas.** As vias enriquecidas para os alvos foram determinadas por Teste Exato Fisher e as vias enriquecidas para os genes expressos no transcriptoma foram determinadas pela ferramenta GSEA. Valor de significância inferior a 5%.

Observamos poucas vias enriquecidas compartilhadas entre as vias enriquecidas dos alvos para miRNAs regulados positivamente, negativamente e alvos do miR-34c-5p em relação as vias enriquecidas no transcriptoma. Para os alvos dos miRNAs regulados positivamente, mostrou possuir vias em comum com vias enriquecidas positivamente e negativamente no transcriptoma. E os genes alvos do miR-34c-5p mostrou conter vias em comum somente para vias enriquecidas positivamente (Tabelas 19-20).

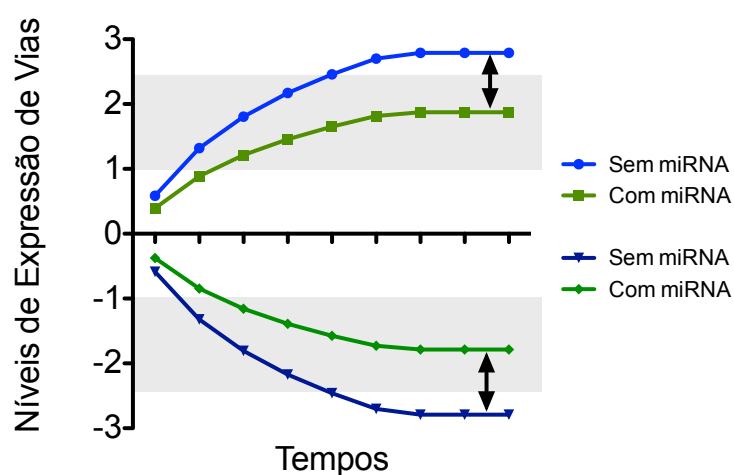
**Tabela 19 – Vias compartilhadas entre o alvos dos miRNAs regulados positivamente e grupos de genes regulados negativamente e positivamente no transcriptoma.**

<b>Grupos</b>	<b>Vias em comum</b>
Alvos miRNAs Versus genes regulados negativamente em 4 horas	SIGNALING_BY_RHO_GTPASES
Alvos miRNAs Versus genes regulados positivamente em 4 e 8 horas	SLC_MEDIATED_TRANSMEMBRANE_TRANSPORT
Alvos miRNAs Versus genes regulados positivamente em 4 horas	NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH
Alvos miRNAs Versus genes regulados positivamente 8 horas	PI_3K_CASCADE PPARA_ACTIVATES_GENE_EXPRESSION NEGATIVE_REGULATORS_OF_RIG_I_MDA5_SIGNALING/ RIG_I_MDA5_MEDIATED_INDUCTION_OF_IFN_ALPHA_BETA_PATHWAYS APOPTOSIS TRANSPORT_TO_THE_GOLGI_AND_SUBSEQUENT_MODIFICATION/N_GLYCAN_ANTENNAE_ELONGATION_IN_THE_MEDIAL_TRANS_GOLGI

**Tabela 20 – Vias compartilhadas entre o alvos do miR-34c-5p e grupos de genes com expressão aumentada no transcriptoma de macrófagos infectados.**

<b>Grupos</b>	<b>Vias em comum</b>
Alvos miR-34c-5p Versus genes regulados positivamente em 4 e 8 horas	MITOTIC_G1_G1_S_PHASES
Alvos miR-34c-5p Versus genes regulados positivamente em 4 horas	PRE_NOTCH_TRANSCRIPTION_AND_TRANSLATION
Alvos miR-34c-5p Versus genes regulados positivamente em 8 horas	TRANSPORT_TO_THE_GOLGI_AND_SUBSEQUENT_MODIFICATION NUCLEOTIDE_BINDING_DOMAIN_LEUCINE_RICH_REPEAT_CONTAINING_RECEPTOR_NLR_SIGNALING_PATHWAYS

Podemos destacar algumas vias importantes durante a infecção pelo *T. cruzi*. A via de sinalização de Rho GTPases foi enriquecida para os genes alvos dos miRNAs regulados positivamente e, interessante, esta via foi enriquecida para os genes regulados negativamente no transcriptoma de 4 horas. Rho GTPase é altamente estudada em células de mamíferos pelo seu papel crítico na manutenção da morfologia celular e coordenando a remodelação dinâmica do citoesqueleto de actina. A regulação fina da expressão dos componentes do citoesqueleto sugere a regulação pelos miRNAs. Outra via que mostra ser interessante é a de transporte de membrana pois foi enriquecida para os alvos dos miRNAs regulados positivamente e também regulados positivamente no transcriptoma de 4 e 8 horas. Podemos argumentar que estas vias são ativadas em níveis elevados pela infecção e os miRNAs estariam tamponando a expressão da via pela regulação de outros componentes da via. Para os alvos do miR-34c-5p, observamos vias enriquecidas em comum com o transcriptoma somente regulado positivamente. As vias enriquecidas em comum foram, controle do ciclo celular, sinalização por Notch e transporte e modificação do complexo golgi. Majoritariamente as vias compartilhadas entre os enriquecimentos para os genes alvos e expressão no transcriptoma foram para miRNAs e mRNAs regulados positivamente. A figura 45 contém um exemplo de atuação dos miRNAs na regulação fina dos genes de uma via biológica, mantendo em quantidade ideais para a célula (região cinza no gráfico).



**Figura 45 – Modelo teórico da atividade dos miRNAs diferencialmente expressos e a expressão da via regulada.** Os resultados obtidos com o enriquecimento para os alvos dos miRNAs regulados positivamente e alvos para miR-34c-5p comparados com as vias enriquecidas positivamente e negativamente para os mRNAs expressos no transcriptoma 4 e 8 horas. A presença do miRNA (em verde) regula a expressão da via em níveis suficientes para manter a expressão da via na zona ideal (em cinza) e sem o miRNA (em azul) a expressão da via estaria fora da zona ideal.

## 5.8 Discussão geral

O nosso modelo de infecção do *T. cruzi* em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos, mostrou crescimento do parasito intracelular e sinais da resposta do macrófago contra a infecção. Com base na resposta do macrófago e ciclo de vida do parasito sequenciamos bibliotecas de pequenos RNAs e mRNAs. As bibliotecas de pequenos RNAs mostrou que tanto os parasitos quanto os macrófagos, geram determinadas classes de pequenos RNAs. Os pequenos RNAs do *T. cruzi*, mostrou não ter diferença qualitativamente, mas apresentou diferenças quantitativamente ao longo da infecção. Quando normalizados pela expressão do parasito, esses pequenos RNAs mostraram ter importância nos tempos iniciais da infecção. Resultados obtidos pelo nosso grupo sugere que a proteína Argonauta é importante para a mudança de forma do parasito e possivelmente os pequenos RNAs do parasito deveriam ser expressos ao longo da infecção para auxiliar na transição das formas tripomastigotas para amastigotas. Contudo, esses dados precisam de mais atenção para formularmos uma hipótese da função dos pequenos RNAs do *T. cruzi* na infecção de macrófagos murinos. Por outro lado, observamos que os pequenos RNAs do macrófagos são majoritariamente derivados dos miRNAs. Identificamos que 18 miRNAs foram expressos diferencialmente e poderiam apresentar algum papel durante a infecção.

Identificamos alvos preditos e validados pela ferramenta TargetScan e base de dados StarBase, respectivamente, sendo regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos. As análises de enriquecimento mostraram a função destes miRNAs ao longo da infecção. As vias enriquecidas foram principalmente com sinalização de TGF- $\beta$ , atividade transcricional das Smads, cascata de sinalização de PI3K, sinalização de morte celular via NRAGE NRIF, NADE e JNK, ativação de NF $\kappa$ B via TRAF6, sinalização extracelular por NOTCH, resposta de apoptose e controle do ciclo celular. Os resultados sugerem que durante a infecção o parasito leva a expressão dos miRNAs que regulam vias importantes para a internalização como TGF- $\beta$ , e vias necessárias para o parasito completar seu ciclo de vida como sinalização de PI3K.

Avaliamos a expressão diferencial do mRNAs e observamos principalmente as vias resposta imune como, ativação de IRF7 mediado por TRAF6 e sinalização de

interferon, bem como vias da reorganização da matrix extracelular. As vias enriquecidas no transcriptoma já descritas na literatura e estão claramente envolvidas com o combate aos parasitos como vias de resposta imune e sobrevivência do parasito intracelular como a reorganização da matriz extracelular.

Não observamos relação entre os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos e os genes diferencialmente expressos no transcriptoma. Fato pelo qual pode ser explicado, pois outras vias podem ser mais responsivas a infecção e o sinal de regulação dos miRNAs estaria mascarado. Por outro lado, nossos resultados sugerem que algumas vias biológicas parecem ser reguladas de duas maneiras independentes durante a infecção: regulação direta da expressão do mRNA e outra indireta pelos miRNAs. Conforme o modelo apresentado na Figura 45, os miRNAs podem ajudar a reforçar ou modular fenótipos celulares. A indução de miRNAs pode ser importante para o ajuste fino de vias biológicas de forma a reforçar um fenótipo. Vias cujos genes são induzidos pela infecção podem ser moduladas pela ação de miRNAs que impedirão o excesso de atividade da via e ainda manter o sinal de infecção perceptível. Por outro lado, vias cujos genes são reprimidos durante a infecção podem ser também mais fortemente silenciadas pela ação de miRNAs sobre outros genes alvo da mesma via. Destacam-se as vias envolvidas com sinalização de Rho GTPases, transporte de membrana, controle do ciclo celular, sinalização por Notch e transporte e modificação do complexo Golgi que foram enriquecidas entre os alvos de miRNAs e mRNAs regulados ao longo da infecção. Estas vias são provavelmente importantes durante a infecção e, por isto, seriam reguladas de maneiras distintas e independentes.

## 6 Conclusões

O modelo de infecção em macrófagos murinos com formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi padronizado em nosso laboratório reproduzindo resultados publicados na literatura.

As bibliotecas de pequenos RNAs e mRNAs de macrófagos infectados com o *T. cruzi* foram construídas e sequenciadas com sucesso.

Foi desenvolvido pipeline de análise de bioinformática para os dados do sequenciamento de pequenos RNAs e mRNAs que identificou os miRNAs e mRNAs diferencialmente expressos durante a infecção de macrófagos e pelo *T. cruzi*.

A expressão diferencial do miR-34c-5p durante a infecção de macrófagos pelo *T. cruzi* foi validada por RT-qPCR.

Alvos dos miRNAs diferencialmente expressos durante a infecção foram identificados utilizando a ferramenta TargetScan e a base de dados StarBase.

Foram identificadas vias biológicas reguladas ao mesmo tempo por miRNAs e mRNAs diferencialmente expressos durante a infecção.

## **7 Perspectivas**

Avaliar funcionalmente o miR-34c-5p utilizando sequências anti-miR para bloquear o miRNA em macrófagos derivados da medula óssea e avaliar parâmetros da infecção como, o percentual de infecção, taxa de crescimento do parasito, produção de citocinas, expressão de mRNAs alvos, entre outros. Alternativamente, avaliar o impacto da indução da expressão dos miRNAs em macrófagos de camundongos nocautes para o receptor de *T. cruzi* (TLR9).

## 8 Bibliografia

- ASSINDER, S.; COLE, N. Does TGF- $\beta$  induced formation of actin stress fibres reinforce Smad dependent TGF- $\beta$  signalling in the prostate? **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 802–804, 2011.
- AZIMZADEH, J. S.; A., M.-N. RNAi pathway integration in *Caenorhabditis elegans* development. **Functional & integrative genomics**, v. 11, n. 3, p. 389–405, 2011.
- BAFICA, A. et al. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3515–3519, 15 set. 2006.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215–233, 2009.
- BATISTA, T. M.; MARQUES, J. T. RNAi pathways in parasitic protists and worms. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1504–1514, ago. 2011.
- BOHMERT, K. et al. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 1, p. 170–180, 2 jan. 1998.
- BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014.
- BOUR, T. et al. Apicomplexa-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 17, p. 4717–22, 2016.
- BURLEIGH, B. A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Sci STKE**, v. 2005, n. 293, p. pe36, 19 jul. 2005.
- CAI, Y. et al. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. **Cell Signal**, v. 26, n. 6, p. 1204–12, jun. 2014.
- CALVET, C. M. et al. TGF- $\beta$  receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- $\beta$  response is disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, v. 143, n. 06, p. 704–715, maio 2016.
- CAMPBELL, C. L. et al. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 47, 2008.
- CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & development**, v. 16, n. 21, p. 2733–2742, 2002.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, fev. 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHANG, T.-C. et al. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 26, n. 5, p. 745–752, jun. 2007.

CHOU, Y. et al. Identification and Characterization of a Novel Broad-Spectrum Virus Entry Inhibitor. **Journal of Virology**, v. 90, n. 9, p. 4494–4510, 1 maio 2016.

CHU, C.-Y.; RANA, T. M. Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 412–419, nov. 2007.

CORNEY, D. C. et al. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c Are Targets of p53 and Cooperate in Control of Cell Proliferation and Adhesion-Independent Growth. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8433–8438, 15 set. 2007.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301\_supp, p. S6–S7, 2010.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005.

CZECH, A. et al. Reversible and Rapid Transfer-RNA Deactivation as a Mechanism of Translational Repression in Stress. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003767, 29 ago. 2013.

DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 175–186, fev. 2004.

DE DIEGO, J. et al. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 4983–9, 1997.

EDLUND, S. et al. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 902–914, 2002.

EULALIO, A.; SCHULTE, L.; VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 742–750, jun. 2012.

FERREIRA, D. et al. Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5522–5528, 1 out. 2006.

FRANZÉN, O. et al. The Short Non-Coding Transcriptome of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1283, 30 ago. 2011.

- FRIEDMAN, R. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.
- GAJI, R. Y.; HUYNH, M.-H.; CARRUTHERS, V. B. A Novel High Throughput Invasion Screen Identifies Host Actin Regulators Required for Efficient Cell Entry by *Toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64693, 31 maio 2013.
- GARCIA SILVA, M. R. et al. Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. **Gene**, v. 466, n. 1, p. 26–35, 15 out. 2010.
- GARCIA-SILVA, M. R. et al. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 2, p. 64–73, jun. 2010.
- GARCÍA-ZEPEDA, E. et al. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. **Parasite Immunol**, v. 12, p. 679–84, 2007.
- GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895–906, dez. 2006.
- GHOSH, J. et al. *Leishmania donovani* Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 3, p. 277–288, mar. 2013.
- GRIMSON, A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. **Molecular Cell**, v. 27, n. 1, p. 91–105, jul. 2007.
- GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–840, 12 ago. 2010.
- HALIC, M.; MOAZED, D. Dicer-Independent Primal RNAs Trigger RNAi and Heterochromatin Formation. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 504–516, fev. 2010.
- HAN, H. et al. MicroRNA expression profile in different tissues of BALB/c mice in the early phase of *Schistosoma japonicum* infection. **Mol Biochem Parasitol**, v. 188, n. 1, p. 1–9, 2013.
- HANNON, G.; ROSSI, J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 371–8, 2004.
- HAUSSECKER, D. et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 673–695, 1 abr. 2010.
- HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1130–1134, 28 jun. 2007.
- HERMEKING, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 193–9, 2010.

- HUANG, X.; FEJES TÓTH, K.; ARAVIN, A. A. piRNA Biogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Trends in Genetics**, set. 2017.
- HUBCHAK, S. et al. Cytoskeletal rearrangement and signal transduction in TGF-beta-1-stimulated mesangial cell collagen accumulation. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 8, p. 1969–80, 2003.
- HUNTER, C.; SUN, H.; POETHIG, R. S. The Arabidopsis Heterochronic Gene ZIPPY Is an ARGONAUTE Family Member. **Current Biology**, v. 13, n. 19, p. 1734–1739, 2003.
- IVANOV, P. et al. Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. **Molecular Cell**, v. 43, n. 4, p. 613–623, ago. 2011.
- JANOWSKI, B. A. et al. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13, n. 9, p. 787–792, set. 2006.
- JONES, E. et al. AMPLIFICATION OF A TRYPANOSOMA CRUZI DNA SEQUENCE FROM INFLAMMATORY LESIONS IN HUMAN CHAGASIC CARDIOMYOPATHY. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348–57, 1993.
- JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, n. 29, 2010.
- LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 435–441, 2001.
- LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.
- LEE, R.; FEINBAUM, R.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.
- LEMAIRE, J. et al. MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to *Leishmania major* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2478, 3 out. 2013.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, jan. 2005.
- LI, J.-H. et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D92–D97, jan. 2014.

- LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 5 abr. 2016.
- LIZCANO, J.; MORRICE, N.; COHEN, P. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site. **Biochem. J.**, v. 349, p. 547–555, 2000.
- LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitol J**, v. 4, p. 30–59, 2010.
- LOVE, M.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
- LUNA-GOMES, T. et al. Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90582, 5 mar. 2014.
- LYE, L.-F. et al. Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001161, 28 out. 2010.
- MANQUE, P. A. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces a Global Host Cell Response in Cardiomyocytes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855–1862, 1 maio 2011.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet**, v. 17, n. 1, 2011.
- MO, Z.-X. et al. Infection by the nematode *Angiostrongylus cantonensis* induces differential expression of miRNAs in mouse brain. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, mar. 2016.
- MORAL, J. et al. Cytoskeleton reorganisation/disorganisation is a key feature of induced inaccessibility for defence to successive pathogen attacks: Cytoskeleton involvement on induced inaccessibility. **Molecular Plant Pathology**, maio 2016.
- MUKHERJEE, B. et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2731–2742, 15 set. 2015.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease: *T. cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634–643, maio 2012.
- NAVARRO, I. C. et al. MicroRNA Transcriptome Profiling in Heart of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003828, 18 jun. 2015.

- PEREIRA, M. C. S.; SINGER, R. H.; MEIRELLES, M. D. N. S. Trypanosoma cruzi infection affects actin mRNA regulation in heart muscle cells. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 271–279, 2000.
- QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 841–842, 15 mar. 2010.
- RASSI, A.; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101–1108, 6 mar. 2007.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- REINHART, B. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.
- SALOMON, C. J. First Century of Chagas' Disease: An Overview on Novel Approaches to Nifurtimox and Benznidazole Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888–894, 2012.
- SASAKI, T. et al. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome\*. **Genomics**, v. 82, n. 3, p. 323–330, set. 2003.
- SCHMUNIS, G.; YADON, Z. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 15, n. 1–2, p. 14–21, 2010.
- SHABALINA, S.; KOONIN, E. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 10, p. 578–587, out. 2008.
- SHREE, S. et al. The M. tuberculosis HAD phosphatase (Rv3042c) interacts with host proteins and is inhibited by Clofazimine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 17 mar. 2016.
- SOBALA, A.; HUTVAGNER, G. Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 6, p. 853–862, nov. 2011.
- SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.
- SUZUKI, H. I. et al. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 512–521, 22 jun. 2015.
- THOMPSON, D. M.; PARKER, R. Stressing Out over tRNA Cleavage. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 215–219, jul. 2009.
- ULLU, E. et al. RNA interference: advances and questions. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, n. 1417, p. 65–70, 2002.

VAGO, A. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891–2, 1996.

VARDOULI, L.; MOUSTAKAS, A.; STOURNARAS, C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 11448–11457, 2005.

WILKOWSKY, S. et al. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. **Experimental Cell Research**, v. 264, p. 211–218, 2001.

WILLIAMS, R. W.; RUBIN, G. M. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 10, p. 6889–6894, 14 maio 2002.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular Mechanisms of RNA Interference. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 217–239, 6 maio 2013.

XU, X. et al. Hypoxia induces downregulation of soluble guanylyl cyclase  $\beta$ 1 by miR-34c-5p. **J Cell Sci**, v. 125, n. 24, p. 6117–6126, 2012.

YANG, J.-H. et al. starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database, p. D202–D209, 1 jan. 2011.

YIGIT, E. et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 747–757, 2006.

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.

## **9 Trabalhos desenvolvidos em colaboração durante o doutorado**

### **9.1 Projeto: Análise da expressão diferencial de microRNAs em Macrófagos derivados da medula óssea infectados com bactéria intracelular *Brucella abortus***

*Brucella abortus* é uma bactéria patogênica gram-negativa, que provoca uma doença crônica em seres humanos e animais domésticos chamado brucelose. A capacidade hospedeiro para montar uma resposta Th1 / pró-inflamatória contra esta bactéria é crucial para controlar e para resolver a infecção. Recentemente, estudos têm demonstrado que microRNAs (miRNAs) são fundamentais tanto na imunidade adaptativa e inata, influenciando nas funções imunológicas contra as bactérias. Respostas imunes para vários microorganismos infecciosos são reguladas a nível pós-transcrição por vários miRNAs. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliado o perfil pequeno RNA focando expressão miRNA durante o tempo inicial da infecção de macrófagos derivados de medula óssea por *Brucella abortus*.

Colaboramos com identificação dos microRNAs diferencialmente expressos, com pipeline desenvolvido no doutorado, em macrófagos infectados pela bactéria. Onde a expressão dos microRNAs foram validadas por RT-qPCR. Realizamos a predição dos alvos pela ferramenta TargetScan e busca por alvos validados na base de dados StarBase. Além da análise de enriquecimento para definir função dos microRNAs diferencialmente expressos.

### **9.2 Projeto: Identificação de microRNAs com expressão alterada em Camundongos modelos para a Doença de Huntington**

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa que afeta predominantemente os neurônios do estriado. As repetições da poliglutamina anormalmente estendidos na proteína huntingtina é identificada como a causa da doença. Esta mutação induz alterações nos níveis de vários mRNAs entre outras alterações de expressão. Pouco se sabe sobre o impacto da regulação miRNA durante o desenvolvimento do HD. O principal objetivo do projeto foi identificar miRNAs diferencialmente expressos no modelo experimental de HD (BACHD) em dois

estágios da doença que se correlacionam com a fase assintomática e o aparecimento de sintomas em humanos.

Colaboramos com identificação dos microRNAs diferencialmente expressos, com pipeline desenvolvido no doutorado, em amostras de estriado de camundongos selvagens e modelos HD (BACHD). Onde a expressão dos microRNAs foram validadas por RT-qPCR. Realizamos a predição dos alvos pela ferramenta TargetScan e busca por alvos validados na base de dados StarBase. Além da análise de enriquecimento para definir função dos microRNAs diferencialmente expressos. Atualmente estamos realizando as validações dos alvos que apresentaram enriquecimento para vias biológicas por RT-qPCR.

### **9.3 Projeto: Identificação de genes regulados por heme em macrófagos murinos**

Heme é o grupo prostético de muitas enzimas dentro dos organismos. Conservada em quase todas as formas de vida, heme promove estresse oxidativo e tem muitos efeitos pró-inflamatórios, como um padrão molecular danos associados (DAMP). A albumina, a proteína mais abundante no soro, foi já descrito para a sua capacidade para se ligar a heme, mas a sua influência sobre os muitos efeitos pró-inflamatórios de heme não são completamente compreendidos. Os resultados do nosso grupo mostram que a heme-albumina induzida não é dependente de muitos receptores inatos conhecidos e proteínas adaptadoras. O objetivo do projeto foi sequenciar o transcriptoma de macrófagos selvagens e mutantes para TLR4 para identificação da via independente da resposta inflamatória.

Colaboramos com as análises globais do transcriptoma tais como, mapeamento, anotação, normalização e análise de expressão diferencial. Identificamos mRNAs diferencialmente expressos e realizamos a análise de enriquecimento para vias biológicas para identificar quais vias alternativas estão envolvidas.

#### 9.4 Identificação e Caracterização da Argonauta TcPIWI e de Pequenos RNAs em *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, é um parasita intracelular que possui um ciclo de vida complexo envolvendo vários estágios de desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Como um organismo unicelular, esta adaptação está basicamente limitada à regulação rápida do seu padrão de expressão gênica. Em vários organismos, a regulação pós-transcricional da expressão gênica envolve a via de RNA de interferência (RNAi) que utiliza pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) associados a uma proteína da família Argonauta para a busca de alvos contendo sequências complementares a do pequeno RNA. A proteína AGO está associada à via clássica de silenciamento gênico induzida por RNA de fita dupla (dsRNA) mas este gene está ausente no genoma de *T. cruzi*. A proteína PIWI por sua vez é conservada em todos os tripanossomatídeos e, embora já tenha sido identificada em *T. cruzi* (TcPIWI), assim como os pequenos RNAs, sua função ainda não foi caracterizada. O objetivo do trabalho foi estudar esta potencial via de RNAi em *T. cruzi* por meio da caracterização da Argonauta TcPIWI e de pequenos RNAs.

Colaboramos com a identificação e caracterização dos pequenos RNAs do *Trypanosoma cruzi*, realizando diversas análises como mapeamento, anotação, normalização das sequências, busca por padrões da expressão dos pequenos RNAs no genoma, preferência dos pequenos RNAs na região 3' ou 5' dos genes, preferência da primeira e última base, e outras características.