

ANDRÉ NICOLAU AQUIME GONÇALVES

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE PEQUENOS RNAs E
RNAs MENSAGEIROS NA INTERAÇÃO MACRÓFAGO-
*Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte
17 de Julho de 2014

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

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE PEQUENOS RNAS E
RNAS MENSAGEIROS NA 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
17 de Julho de 2014

Sumário

1	Introdução.....	10
1.1	Aspectos gerais da Doença de Chagas.....	10
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.3	Interação parasito hospedeiro.....	13
1.4	A via de RNA de Interferência.....	14
1.5	Vias de RNAi em animais.....	16
2	Justificativa.....	19
3	Objetivos.....	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	Metodologia.....	21
4.1	Cultivo de células LLC-MK2 e <i>T. cruzi</i> cepa CLBrener.....	21
4.2	Cultivo de células L-929.....	21
4.3	Macrófagos derivados da medula óssea.....	21
4.4	Infecção dos macrófagos com formas tripomastigotas.....	22
4.5	Extração de RNA.....	23
4.6	Quantificação de RNA por NanoDrop e BioAnalyzer.....	24
4.7	Transcrição reversa.....	24
4.8	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	24
4.9	Preparo do RNA para sequenciamento de nova geração por Illumina.....	26
4.10	Análises de bioinformática.....	26
4.11	Análises estatísticas.....	28
5	Resultados preliminares.....	29
5.1	Padronização da cinética de infecção.....	29
5.2	Análise Bioinformática dos pequenos RNAs.....	35
5.2.1	Análise das <i>reads</i> mapeadas no genoma do <i>T. cruzi</i>	36
5.2.2	Análise dos RNAs mapeados no genoma do <i>Mus musculus</i>	39
6	Perspectivas.....	53
7	Bibliografia.....	54

Resumo

A doença de chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, capaz de invadir vários tipos celulares embora possua tropismo para tecidos musculares. A interação inicial entre parasito e hospedeiro envolve a ativação de vias responsáveis pela internalização do parasito, resposta imune inata e combate aos parasitos intracelulares, entre outras. Diversas mudanças na expressão gênica acontecem na célula hospedeira para se adaptar e responder ao patógeno e vice-versa. A via de RNA de interferência (RNAi), representada principalmente por microRNAs (miRNA), está intimamente ligada a regulação pós-transcricional da expressão gênica que permite um ajuste fino de várias respostas biológicas como a interação patógeno-hospedeiro. Por exemplo, macrófagos infectados por *Leishmania* ou *Toxoplasma* tem a expressão alterada de miRNAs que regulam genes envolvidos com vias importantes para internalização e replicação dos parasitos. Até o momento, não há descrição do perfil de miRNAs durante a infecção do *T. cruzi* em macrófagos murinos. Nesse trabalho, realizamos o sequenciamento de pequenos RNA de macrófagos murinos infectados com o parasito *T. cruzi* nos tempos precoces de 2, 4, 8 horas e no tempo tardio de 48 horas após a infecção, para avaliar a expressão de pequenos RNAs, incluindo os miRNAs, durante a cinética da infecção. Como controle, observamos o crescimento do parasito e a expressão diferencial da citocina pro-inflamatória TNF- α como indicador da resposta imune inata durante a infecção. Entre os pequenos RNAs do hospedeiro, observamos a expressão diferencial de vários miRNAs entre 2 e 48 horas após a infecção. No tempo de 48h há uma mudança drástica no perfil geral de pequenos RNAs do hospedeiro sugerindo grandes alterações no macrófago infectado. No entanto, não observamos mudança significativa no perfil de pequenos RNAs do parasito ao longo da infecção. Por esta razão, nós concentramos nossas análises nos miRNAs expressos diferencialmente em macrófagos nos tempos precoces de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Observamos que 49 miRNAs mostraram expressão diferencial quando comparados ao seu controle. Somente 3 deles foram diferencialmente expressos nos 3 tempos de infecção, miR-21a-3p, miR-142-3p e miR-34c-5p. Estes foram os miRNAs escolhidos para análises subsequentes onde realizamos a predição *in silico* dos seus potenciais mRNAs alvos. Estes alvos foram analisados de forma global e mostraram enriquecimento para processos biológicos como via de sinalização para os receptores de hormônios de crescimento, resposta celular para estímulo de hormônios de crescimento, resposta celular para estímulo de citocinas, resposta celular a TNF- α , diferenciação celular, regulação negativa de processos biossintéticos e angiogenesis. Nosso objetivo agora é analisar o papel destes processos durante a infecção por *T. cruzi*. Além disto, iremos validar a expressão dos miRNAs por northern blot e seus mRNA alvos por qPCR para verificarmos a correlação entre a expressão miRNA:mRNA. Por fim, iremos avaliar fenotipicamente o curso da infecção após aumentarmos a expressão dos miRNAs candidatos com miRNAs mímicos e após diminuirmos a expressão com miRNAs antagonísticos.

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 e pela presença do inseto vetor (Rassi *et al.*, 2010).....10
- Figura 2 – Diagrama do fluxo natural da doença de Chagas.** São duas fases na doença humana: a aguda, no qual começa em torno de uma semana depois do início da infecção e é usualmente assintomática; e a crônica, no qual é subdividida em indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A espessura das setas indica a probabilidade relativa de um caminho representado (Rassi *et al.*, 2007).....11
- Figura 3 – Ciclo de vida do *T. cruzi*. Durante o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados os insetos fêmeas podem adquirir ou depositar formas infectivas do parasito capazes de infectar diversos tipos celulares. (Rassi *et al.*, 2010).....13
- 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 II, tais como Dicers e Droshas estão envolvidas na biogênese dos pequenos ncRNAs. No caso dos precursores ssRNA, não há evidências de enzimas envolvidas no processamento dos pequenos ncRNAs. 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 denominadas fita “guia” e a fita não carregada denominada fita “passageira”. A formação do complexo RISC irá mediar o reconhecimento da sequência específica em alvos potenciais e implicar com a função biológica (Batista e Marques, 2011).....15
- Figura 5 – Sítios complementares canônicos de 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 e na posição 8 do miRNA. Sítio 7mer-A1 similar ao sítio 7mer-m8 no entanto a base adicional complementar é na posição 1 do miRNA. E sítio 8mer no qual combina os sítios 7mer-A1 e 7mer-m8 com complementariedade de 8 nucleotídeos.....17
- 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 1h a 48h foram submetidas a extração/quantificação do RNA, síntese do cDNA e avaliação dos genes do hospedeiro e patógeno por qPCR.....23
- Figura 7 – *Pipeline* de análise do transcriptoma de pequenos RNAs. Reads brutas foram tratadas retirando sequências adaptadoras do sequenciamento e selecionadas por tamanho. Mapeadas contra o genoma do *Mus musculus* e *T. cruzi*. As reads mapeadas foram anotadas para os genes dos dois genomas. Os miRNAs foram normalizados e avaliados os diferencialmente expressos entre amostras infectadas e não infectadas.....28
- Figura 8 – Microscopia dos macrófagos infectados com *T. cruzi*. Macrófagos plaqueados em lamínulas circulares e fixadas com kit panótico. Nos tempos 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção contém esferas escuras no citoplasma celular no qual corresponde aos parasitos intracelulares. Foi determinada a quantidade de

células infectadas, não infectadas e parasitos intracelulares por microscopia invertida. Amostra controle coletada no tempo de 1 hora após a infecção.....	29
Figura 9 – Número relativo de parasitos intracelulares. Relação do total de parasitos intracelulares e total de células contadas multiplicado pelas células infectadas.	31
Figura 10 – Quantificação RNA. Amostras quantificadas no equipamento NanoDrop com 1,5 µL de RNA.....	31
Figura 11 – Sinal de qPCR para genes constitutivos do <i>M. musculus</i>. Sinal de qPCR para o gene RpL32 normalizado por -40 ao longo da infecção e na RT(-).	32
Figura 12 – Sinal de qPCR para genes constitutivos do <i>T. cruzi</i>. (A) Sinal de qPCR para o gene 24S normalizado por -40 ao longo da infecção e RT(-). (B) Sinal de qPCR para o gene RpL9 normalizado por -40 ao longo da infecção e RT(-).....	33
Figura 13 - Sinal de qPCR para o gene de Actina. O Ct das amostras infectadas e não infectadas foram normalizadas por -40 e realizado teste de significância para amostras não pareadas com <i>t-Student</i> p-valor > 5%.....	33
Figura 14 – Sinal de qPCR para o gene da citocina pro-inflamatório TNF- α . O Ct das amostras infectadas e não infectadas 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%.....	34
Figura 15 – Classificação do mapeamento das <i>reads</i> nos genomas. As <i>reads</i> podem ser classificadas em: <i>single mapper</i> , <i>multiple mapper</i> , <i>multiple reference</i> . R1 corresponde a <i>single mapper</i> no qual foi possível mapear em uma região única de um único genoma . R2 corresponde a <i>multiple reference</i> no qual foi possível mapear em uma região sintênica entre genomas ou haplotipos e <i>single mapper</i> em cada genoma. R3 corresponde a <i>multiple mapper</i> no qual foi possível mapear em duas ou mais regiões de um único genoma. R4 corresponde a <i>multiple mapper</i> e <i>multiple reference</i> no qual foi possível mapear duas ou mais vezes em cada genoma. R5 corresponde a <i>multiple reference</i> no qual foi possível mapear duas ou mais vezes entre os genomas e <i>single mapper</i> em um dos genomas.....	35
Figura 16 – Taxa de mapeamento das bibliotecas. <i>Reads</i> mapeadas no genoma do <i>Mus musculus</i> (versão GRCm38) e <i>T. cruzi</i> (versão 7.0) ou em ambos os genomas.....	36
Figura 17 – Distribuição das <i>reads</i> nas anotações do <i>T. cruzi</i> . As <i>reads</i> mapeadas no genoma do <i>T. cruzi</i> foram distribuídas para as features mRNA, snRNA, rRNA, tRNA e sem anotação (<i>No feature</i>) ao longo da infecção.....	37
Figura 18 – Distribuição de tamanho das <i>reads</i> do <i>T. cruzi</i> . O tamanho das <i>reads</i> mapeadas representado no eixo x, a normalização das <i>reads</i> por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do <i>T. cruzi</i>	38
Figura 19 – Distribuição de tamanho das <i>reads</i> de <i>T. cruzi</i> normalizado pelo sinal RpL9. O tamanho das <i>reads</i> mapeadas representado no eixo x, a normalização das <i>reads</i> por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4.....	39
Figura 20 - Distribuição das <i>reads</i> por anotações do <i>Mus musculus</i> . O total de <i>reads</i> 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.....	40
Figura 21 – Distribuição de tamanho das <i>reads</i> do <i>Mus musculus</i> . O tamanho das <i>reads</i> mapeadas representado no eixo x, a normalização das <i>reads</i> por milhões	

(RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do <i>M. musculus</i>	41
Figura 22 – Distribuição de tamanho das <i>reads</i> do <i>Mus musculus</i> . O tamanho das <i>reads</i> mapeadas representado no eixo x, a normalização das <i>reads</i> 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.....	42
Figura 23 – <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 não infectadas “C” e infectadas “I”.....	43
Figura 24 - <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 não infectadas 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.....	44
Figura 25 – Diagrama de <i>Venn</i> para expressão positiva e negativa dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente expressos positivamente e negativamente ao longo da infecção.	45
Figura 26 – Numero de miRNAs diferencialmente expressos positivamente e negativamente ao longo da infecção. Em cada barra está representado o número de miRNAs com RPM (<i>Reads</i> por Milhões) de 1 a 100 (laranja), 100 a 1000 (verde) e maiores que 1000 (azul).....	45
Figura 27 – <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 não infectada.....	46
Figura 28 – Gráfico de RPM dos miRNAs mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-34c-5p e mmu-miR-142-3p. Em azul as bibliotecas não infectadas e em vermelho as bibliotecas infectadas. A normalização seguiu a equação 2. Acima de cada barra possui o número de <i>foldchange</i> da biblioteca infectadas em relação a não infectadas.....	47

Listas de Tabelas

Tabela 1 – Iniciadores para detecção dos genes constitutivos e específicos desenhados pelo software Primer3Plus.....	25
Tabela 2 – Taxa de infecção. Contagem de células infectadas, não infectadas, parasitos intracelulares e total de parasitos relativos para a triplicata biológica.....	30
Tabela 3 – Número de genes preditos como alvos dos miRNAs e número de genes anotados para análise de enriquecimento GO. Alvos preditos com as ferramentas e algoritmos PITA e miRanda.....	49
Tabela 4 – Análise de enriquecimento para termos GO dos alvos preditos para o miRNA mmu-miR-21a-3p. Alvos preditos nas ferramenta PITA e miRanda e os genes comuns submetidos para análise na ferramenta WebGestalt.....	50
Tabela 5 – Análise de enriquecimento para termos GO dos alvos preditos para o miRNA mmu-miR-142-3p. Alvos preditos nas ferramenta PITA e miRanda e os genes comuns submetidos para análise na ferramenta WebGestalt.....	50
Tabela 6 – Análise de enriquecimento para termos GO dos alvos preditos para o miRNA mmu-miR-34c-5p. Alvos preditos nas ferramenta PITA e miRanda e os genes comuns submetidos para análise na ferramenta WebGestalt.....	51

Equações

- Equação 1 – Número relativo de parasitos (NPR). Cálculo realizado para replica (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).....22
- Equação 2 – Normalização gene constitutivo sinal 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).....25
- Equação 3 – Normalização genes alvo sinal 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).....25
- Equação 4 – Normalização da expressão do miRNAs. Expressão normalizada pelo total de *reads* mapeadas em cada amostra. A expressão de cada miRNA_i na amostra_j foi dividido pelo total mapeado na amostra_j e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM.....27
- Equação 5 – Normalização da expressão do miRNAs. Expressão normalizada pelo total de *reads* mapeadas nos miRNAs em cada amostra. A expressão de cada miRNA_i na amostra_j foi dividido pelo total dos miRNA na amostra_j e multiplicado por 1 milhão, correspondente a RPM.....27

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pela transmissão do parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) pelo inseto vetor da família *Reduviidae* pertencentes ao gênero *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, conhecido no Brasil por 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 sem presença do inseto vetor como USA, Canadá, Europa, Austrália e Japão (Coura e Viñas, 2010; Rassi *et al.*, 2010). A evidência da doença nessas regiões pode ser explicada pelo aumento de viagens, imigração, transfusões, transplantes de órgãos e/ou não conhecimento da doença pelo indivíduo (Bonney, 2014). O principal meio de transmissão é dado por insetos vetores hematófagos, que durante o repasto sanguíneo transmitem formas infectivas do *T. cruzi* nas fezes que alcançam a corrente sanguínea pela lesão provocada pelo inseto ou pela mucosas (boca ou olhos) (Salomon, 2012).

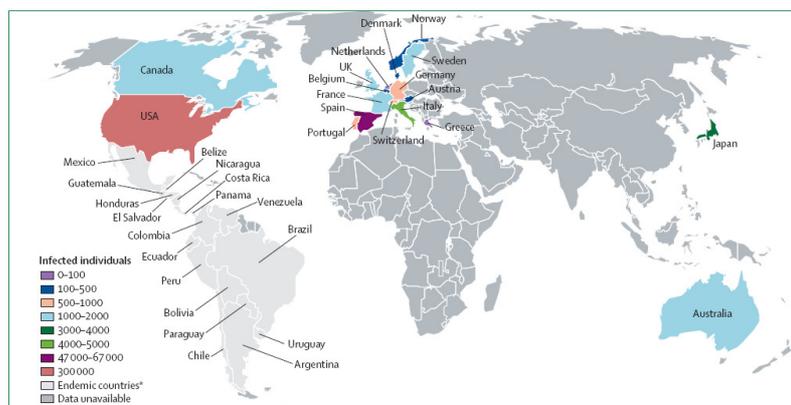


Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas no mundo. Distribuição de indivíduos infectados em países endêmicos e não endêmicos, mostrando que a doença de Chagas não é mais exclusiva dos países latinos e pela presença do inseto vetor (Rassi *et al.*, 2010).

Após a infecção o paciente pode desenvolver a fase aguda da doença com duração em torno de 1 a 2 meses (Rassi *et al.*, 2010). Esta fase é determinada pela presença de tripomastigotas no sangue do paciente, tipicamente assintomática ou associado com febre, hepatoesplenomegalia e edema (Rassi *et al.*, 2010). Quando diagnosticada na fase aguda, o indivíduo pode alcançar a cura pelo tratamento com medicamentos. Passada a fase aguda sintomática ou assintomática o paciente passa a fase crônica, no qual é caracterizada pela escassez de parasitos no sangue ou nos tecidos, sendo possível a detecção por técnicas de imunohistoquímica ou de

amplificação de DNA do parasito (Jones *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Lages-Silva *et al.*, 2001). A fase crônica apresenta as seguintes fases clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista, sendo a indeterminada mais frequente. Na fase crônica surge as lesões irreversíveis no coração, esôfago, e/ou cólon, levando o paciente a óbito (Rassi *et al.*, 2007). A figura 2 demonstra o fluxo natural de contaminação por *T. cruzi*, cerca de 5% dos indivíduos contaminados morrem por miocardite aguda e/ou meningoencefalite.

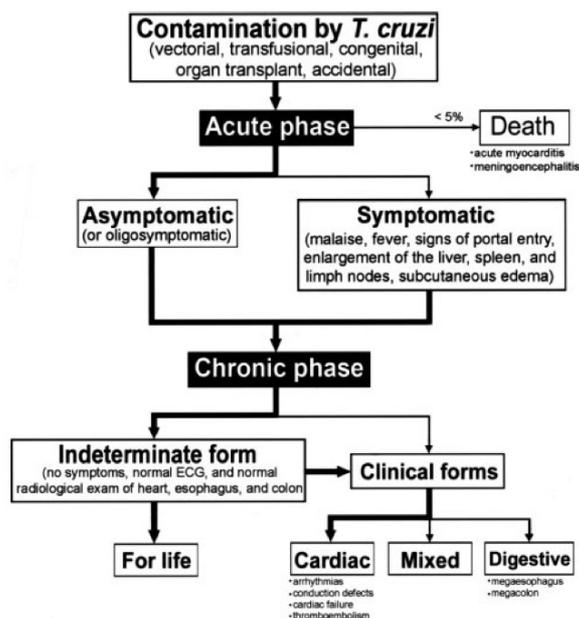


Figura 2 – Diagrama do fluxo natural da doença de Chagas. São duas fases na doença humana: a aguda, no qual começa em torno de uma semana depois do início da infecção e é usualmente assintomática; e a crônica, no qual é subdividida em indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A espessura das setas indica a probabilidade relativa de um caminho representado (Rassi *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) estima que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas são infectadas com *T. cruzi*, principalmente nos países da América Latina.

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae (Lopes *et al.*, 2010). O barbeiro se infecta ao alimentar de sangue de animais contaminados pelo parasito. Parte do ciclo vital desse protozoário ocorre no triatomíneo e a outra parte no hospedeiro vertebrado infectado. O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve formas proliferativas e formas altamente diferenciadas com capacidade infectante (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo com quatro estágios divididos entre o hospedeiro vertebrado e o inseto vetor. O inseto vetor pode se alimentar de sangue contaminado com formas tripomastigotas sanguíneas no qual são digeridos e submetidos ao estresse nutricional sofrendo mudança de forma para epimastigotas no intestino médio do inseto. A forma epimastigota é capaz de realizar a multiplicação binária e assexuada. Os epimastigotas passam do intestino médio para o intestino posterior e sofrem novamente estresse nutricional passando para a forma tripomastigota metacíclica. Durante o repasto sanguíneo os insetos depositam fezes contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado. O hospedeiro vertebrado ao coçar a região com fezes contaminadas, introduz as formas infectivas na corrente sanguínea pela lesão causada pelo inseto ou pelas mucosas. Na corrente sanguínea os tripomastigotas metacíclicos interagem com diversos tipos celulares, infectando principalmente por via de fagocitose. Durante a internalização do parasito, lisossomos são recrutados para a região do fagossomo e envolve os parasitos intracelulares. Os parasitos formam um vacúolo parasitóforo no qual exercem função protetora durante os primeiros instantes da infecção. Mediante estímulos o parasito muda da forma tripomastigota para amastigota rompendo o vacúolo parasitóforo e realiza a multiplicação binária no citoplasma celular. A multiplicação ocorre de forma descontrolada até a superpopulação de amastigotas intracelulares. Nesse ponto, o parasito sofre com o estresse nutricional passando para a forma tripomastigota sanguínea, rompendo a membrana plasmática da célula, liberando as formas tripomastigotas sanguíneas e infectando novas células para recomeçar o ciclo (Figura 3).

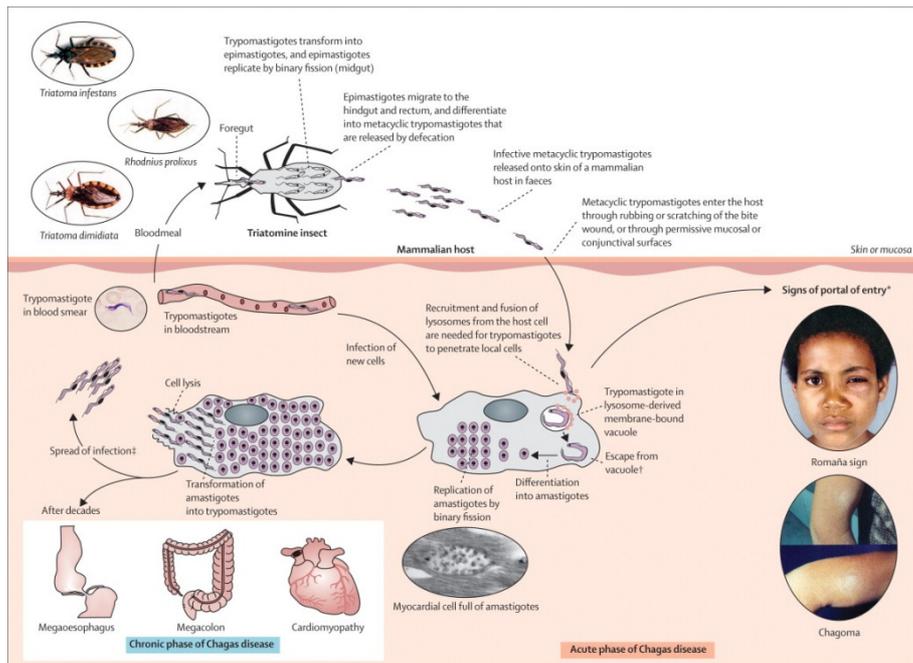


Figura 3 – Ciclo de vida do *T. cruzi*. Durante o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados os insetos fêmeas podem adquirir ou depositar formas infectivas do parasito capazes de infectar diversos tipos celulares. (Rassi *et al.*, 2010).

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.

1.3 Interação parasito hospedeiro

A adesão na célula hospedeira é o primeiro passo do *T. cruzi* para a invasão. Glicoproteínas de superfície com propriedade de adesão celular são expressas nas formas tripomastigotas metacíclicas como, gp90, gp82, gp30 e gp35/50, no qual são diferencialmente expressos em diferentes cepas, e podem ou não aumentar a eficiência de internalização do parasito (Yoshida, 2006).

Durante o estágio agudo da infecção, ocorre invasão e replicação intracelular bastante ativa numa variedade de tecidos do hospedeiro. A resposta imune montada pelo hospedeiro é eficaz no controle dos parasitos, mas não elimina a infecção e os parasitos persistem durante décadas apresentando baixa parasitemia (infecção assintomática) (Nagajyothi *et al.*, 2012).

A imunidade protetora contras os protozoários, tal como *T. cruzi*, é mediada principalmente por resposta de T *helper* 1 (Th1) no qual é caracterizado pela produção

de citocinas inflamatórias como Interleucina 12 (IL-12). A citocina IL-12 é requerida para o desenvolvimento de resposta imune Th1, Interferon gamma (IFN- γ) e *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α), ativando resposta por macrófagos e aumentando a produção de óxido nítrico (NO), envolvidos no controle da replicação dos parasitos (Gazzinelli e Denkers, 2006; Garcia-Zepeda *et al.*, 2007; Luna-Gomes *et al.*, 2014).

Padrões moleculares derivados do *T. cruzi*, como glycosylphosphatidylinositol (GPI) associados com mucin-like (proteínas de membrana) são reconhecidos por receptores Toll-like (TLR), TLR2, TLR4 e TLR6. Após o reconhecimento há a ativação de fatores de transcrição levando ao aumento da expressão de genes de resposta imune, bem como genes de miRNAs.

1.4 A via de RNA de Interferência

A descoberta da interferência de RNA (RNAi) revolucionou a nossa compreensão da regulação de genes, revelando uma variedade de vias relacionadas, na qual pequenos RNA não codificadores em torno de ~20 a 30 nucleotídeos (nt) e associados com proteínas controlam a expressão genética (Carthew e Sontheimer, 2009). A via de RNAi é importante em diversos processos que são comuns em plantas e animais (Shabalina e Koonin, 2008). Os pequenos RNAs associados a proteínas da família Argonata formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês *RNA-induced silencing Complex* - RISC), no qual reprime/silencia genes com a especificidade conferida pelo emparelhamento de bases entre o pequeno RNA e o seu alvo de mRNA (Wilson e Doudna, 2013).

A via clássica de RNAi envolve o reconhecimento de RNA de fita dupla por um membro da família RNase III (Chu e Rana, 2007), tal como Dicer ou Drosha, o qual leva a clivagem em pequenos RNA não codificantes (ncRNAs) de 20-30 nucleotídeos (Hannon e Rossi, 2004). Estes pequenos ncRNAs são incorporados ao RISC, que possui como proteína central a Argonata (Ago) que pode levar a degradação ou repressão da tradução de mRNAs homólogos aos pequenos ncRNAs integrante do RISC (Azimzadeh e A., 2011). O mRNA alvo é clivado no centro da região complementar ao ncRNA, atuando como siRNA (small interfering RNA), dessa forma resulta em uma rápida degradação do mRNA alvo e na diminuição da expressão da proteína. Ou então o ncRNA pode ficar associado com o mRNA impedindo o progresso da tradução, atuando como miRNA (Ullu *et al.*, 2002) (Figura 4).

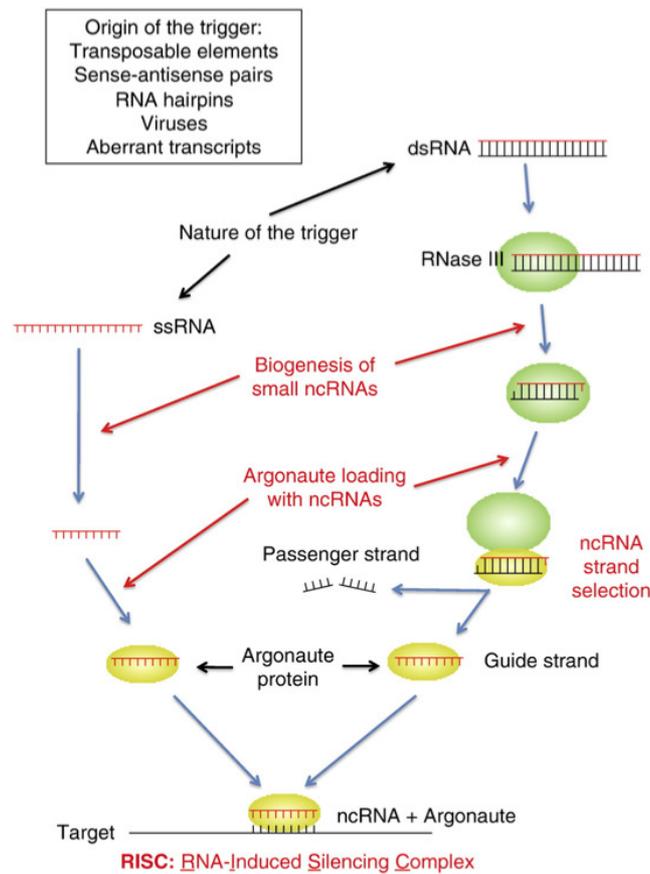


Figura 4 – Modelo simplificado da via de RNAi. Os pequenos RNAs podem ser originados de diversas fontes para a ativação das vias de RNAi. O processamento dos pequenos RNAs não codificadores (ncRNA) podem ter natureza fita simples longa de RNA (ssRNA) ou dupla fita longa de RNA (dsRNA). No caso dos precursores dsRNA, enzimas de RNase II, tais como Dicers e Droshas estão envolvidas na biogênese dos pequenos ncRNAs. No caso dos precursores ssRNA, não há evidências de enzimas envolvidas no processamento dos pequenos ncRNAs. 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 denominadas fita “guia” e a fita não carregada denominada fita “passageira”. A formação do complexo RISC irá mediar o reconhecimento da sequência específica em alvos potenciais e implicar com a função biológica (Batista e Marques, 2011).

A Argonauta é a proteína central e essencial para a formação do complexo RISC. Dependendo da Argonauta e do perfil do pequeno RNA a função e alvos do complexo RISC varia entre os tipos celulares e forma de ação no mRNA alvo. Os humanos possuem quatro proteínas Argonauta que formam o clado Ago1-4. Dentre as quatro, somente Ago2 possui atividade com sítio de clivagem (Janowski *et al.*, 2006). O que evidencia a importância da proteína Ago no processo de regulação gênica em diversos organismos mesmo sem a presença de proteínas responsáveis pela geração dos pequenos RNAs (Halic e Moazed, 2010).

T. cruzi não possui a via clássica de RNAi, no entanto, possui uma cópia da proteína Ago da família PIWI, mas não possui proteínas responsáveis pelo processamento dos pequenos RNAs (Batista e Marques, 2011). Porém, é capaz de

produzir pequenos RNAs derivados de sequências de tRNAs com tamanho médio de 33 nucleotídeos (Garcia-Silva *et al.*, 2010; Franzén *et al.*, 2011).

1.5 Vias de RNAi em animais

Em animais, existem três classes de pequenos RNAs, como siRNA, piRNA e miRNAs que definem vias separadas de RNAi. A via de miRNAs foi descrita inicialmente pelo seu envolvimento no controle do desenvolvimento larval de vermes *Caenorhabditis elegans* revelando dois pequenos RNAs reguladores, conhecidos como *lin-4* e *let7* (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000). A biogênese do miRNA passa pela transcrição dos genes contendo sequências precursoras de miRNA pela RNA polimerase II. O RNA transcrito possui tendência de forma grampos (hairpins) que são reconhecidos pela Droscha e clivados em miRNAs primários (pri-miRNA) e exportado para o citoplasma pela exportin-5. O pri-miRNA é então reconhecido pela enzima RNase III a Dicer e cliva formando fita dupla de RNA (dsRNA) com 22 nt. O dsRNA é carregado na Ago para formar o complexo miRISC (Bartel, 2004). O controle pos-transcricional é mediado pela associação do complexo miRISC com os mRNAs alvos para repressão da tradução (Bartel, 2009). Com complementariedade por pareamento de bases nos sítios dos alvos, os miRNAs atuam como repressores desestabilizando os mRNAs (Guo *et al.*, 2010). O fator que afeta a eficácia das interações miRNA:mRNA é o tipo de sítio de ligação, no qual podem ser classificados baseados na extensão de pareamento da região 5' do miRNA. Sítios 6mer pareado perfeitamente somente com a *seed* do miRNA (nucleotídeos 2-7 do miRNA) e tipicamente conferem a melhor repressão. O pareamento da *seed* pode ocorrer com a adenina na posição oposta da posição 1 ou 8 do miRNA, denominados sítios 7mer-A1 ou 7mer-m8. Pode ocorrer a combinação dos sítios apresentados com adenina e pareamento completo com 8 nucleotídeos denominado sítio 8mer (Lewis *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007) (Figura 5). Sítios 8-mer são mais eficazes que sítios 7mer-m8 no qual são mais eficazes do que os sítios 7-mer-A1 e, com o pareamento adicional na região 3' do miRNA aumenta a eficácia para cada tipo de sítio (Grimson *et al.*, 2007).

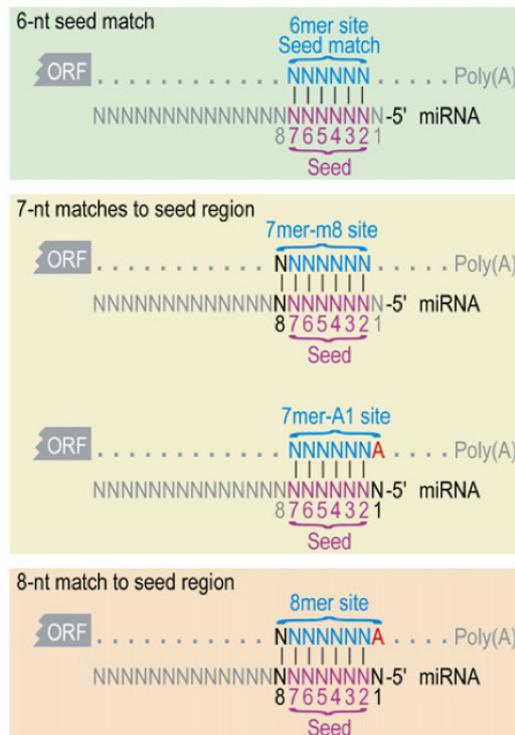


Figura 5 – Sítios complementares canônicos de miRNAs. Sítio 6mer corresponde a complementariedade perfeita da *seed* do miRNA (nucleotídeo 2 a 7) com sequência 3' UTR do mRNA alvo. Sítio 7mer-m8 corresponde a complementariedade perfeita na *seed* do miRNA e na posição 8 do miRNA. Sítio 7mer-A1 similar ao sítio 7mer-m8 no entanto a base adicional complementar é na posição 1 do miRNA. E sítio 8mer no qual combina os sítios 7mer-A1 e 7mer-m8 com complementariedade de 8 nucleotídeos.

A regulação da expressão dos miRNAs é mediada por estímulos de receptores responsáveis por levar o recrutamento de fatores de transcrições relacionados com genes de miRNA e a ativação dos mesmos. E os miRNA podem atuar regulando genes importantes para a infecção de microorganismos em vários tipos celulares. Estudos de expressão de miRNA em resposta a várias infecções bacterianas têm revelado miRNAs comuns como atores-chave na resposta imune inata do hospedeiro (Eulalio *et al.*, 2012). Estudos relatam o papel fundamental de miRNAs mediante a infecções parasitárias, tais como *Toxoplasma*, *Leshmania* e *Schistosoma* (Ghosh *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013; Lemaire *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014). 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 ciclo de vida.

Durante a infecção por *Schistosoma japonicum*, 65 miRNAs foram identificados como diferencialmente expressos no fígado, baço e pulmões. Estes miRNAs foram principalmente relacionados com resposta imune, proliferação/diferenciação celular, metabolismo e transdução de sinal. Foi identificado que os miRNA miR-494 e miR-

30e tem 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 com *Leishmania major* foi observado miRNAs diferencialmente expressos com 3 e 6 horas após a infecção. Dentre eles o miR-146a é induzido pela cascata de sinalização dependente de TLR4 e regula negativamente transcritos de TRAF (*TNF receptor-associated family*) 6 e IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) 1, sugerindo que miR-146a é regulador negativo da resposta inflamatória (Lemaire *et al.*, 2013).

Por fim, 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 como anti-apoptose (Cai *et al.*, 2014).

2 Justificativa

Estudos demonstram que genes importantes em diversos processos celulares, como resposta imune, inflamação, organização do citoesqueleto, apoptose, ciclo celular e stress oxidativo são diferencialmente expressos durante a interação parasito-hospedeiro (Manque *et al.*, 2011). As vias de RNAi tem papel importante na regulação pós-transcricional da expressão gênica e poderiam regular tanto genes do parasito quanto do hospedeiro durante a infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*. Os pequenos RNAs podem ser fatores de virulência do parasita ou influenciar na resposta do hospedeiro. No caso específico do hospedeiro, miRNAs podem regular a resposta das células infectadas para determinar susceptibilidade ou resistência à infecção. Desta forma, miRNAs poderiam ser alvos para o tratamento da Doença de Chagas ou serem utilizados como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da doença.

Portanto propomos a avaliação de bibliotecas construídas a partir de pequenos RNAs e a identificação de candidatos a ncRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica durante a infecção de macrófagos murinos pelo *T. cruzi*. Além disso, comparações entre as diversas bibliotecas de pequenos RNAs em diferentes condições serão feitas utilizando a técnica RNA-Seq, o que permitirá a identificação de ncRNAs e possibilitará determinar melhor as vias de regulação, adaptação e interação do parasita-hospedeiro.

Estudos recentes mostraram miRNAs envolvidos com processos celulares importantes para o controle de infecções parasitárias por *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Schistosoma* e *Trypanosoma*. Entretanto atualmente não há descrito na literatura o perfil de miRNAs envolvidos com a interação *T. cruzi*-macrófagos murinos e quais processos celulares possam estar envolvidos durante uma infecção a nível molecular.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o transcriptoma de pequenos RNAs e RNA mensageiros na interação macrófago-*T. cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de infecção de macrófagos murinos com formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a expressão de genes do macrófago e do *T. cruzi* por qPCR, durante a infecção;
- Construir e sequenciar bibliotecas de pequenos RNAs preparadas a partir de diversos tempos escolhidos após a infecção;
- Construir e sequenciar bibliotecas de RNAs mensageiros preparadas a partir de diversos tempos escolhidos após a infecção;
- Realizar análises de bioinformática com os dados do sequenciamento para definir estatisticamente miRNAs diferencialmente expressos nos tempos específicos da infecção e seus possíveis alvos;
- Realizar análises de bioinformática com os dados do sequenciamento para definir estatisticamente RNAs mensageiros diferencialmente expressos nos tempos específicos da infecção;
- Validar a expressão de miRNAs diferencialmente expressos e seus alvos;
- Análise funcional do papel dos miRNAs diferencialmente expressos e seus alvos durante a infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*.
- Análise funcional do RNAs mensageiros diferencialmente expressos durante a infecção de macrófagos pelos *T. cruzi*.

4 Metodologia

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

As formas tripomastigotas foram cultivadas em LLC-MK₂ (*Rhesus Monkey Kidney Cells*), obtidas no laboratório da professora Daniella Bartholomeu, 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, 1% de L Glutamina (2,05 mM) e 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, em garrafas de cultura (25, 75, 150cm²) em estufas com ambiente a 37°C e 5% CO₂. Para a multiplicação das células, o meio de cultura foi desprezado, as células lavadas com PBS 1X e tratadas com solução de tripsina contendo 0,2% de EDTA. As células foram homogeneizadas em meio RPMI 1640 suplementado e distribuídas em garrafas de 25, 75 e 150 cm² juntamente com meio de cultura. As formas tripomastigotas liberadas a partir do quinto dia após a infecção foram coletadas, centrifugadas a 2.500 g por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.), o sobrenadante descartado, *pellet* ressuscitado em 1 mL, concentração determinada na câmara de Neubauer e adicionadas na proporção de 10 formas tripomastigotas para cada célula nas garrafas com LLC-MK₂.

4.2 Cultivo de células L-929

Células L-929 derivadas de camundongos cepa C3H/An foram cultivadas em meio DMEM completo suplementado com L-glutamina 1:100, Penicilina e Streptomicina 1:100 (opcional), Piruvato de sódio 1:100, HEPES 1:40 e 10% SFB. As células foram mantidas em garrafas de cultura em ambiente a 37°C e 5% CO₂. O sobrenadante foi coletado após 10 dias da segunda passagem, filtrado com membrana de 0,22 µm e armazenado em tubos falcons 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, denominado de *L929-cell Conditioned Medium* (LCCM).

4.3 Macrófagos derivados da medula óssea

Camundongos C57BL/6 de 4 a 6 semanas de vida foram sacrificados por deslocamento cervical e submersos em álcool 70%. Os fêmures e tíbias foram removidos, tecido muscular retirados e os ossos armazenados em placas de petri mantidas no gelo. As extremidades de cada fêmur ou tíbia foram removidas, lavadas com 5 mL de HBSS (solução salina) 1X ou PBS 1X gelado, coletadas em falcons de

50 mL e mantidos no gelo. Essa solução foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos e refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado com 1mL de DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 1% de penicilina/estroptomicina. Foram adicionados 12 mL de DMEM suplementado em cada tubo de 50 mL com a solução ressuspensionada. A solução foi filtrada para reter os resíduos de tecidos musculares, ossos e ressuspensionada em placas de petri, incubados em estufas com ambiente 37°C e 5% CO₂ *overnight*.

As células não aderidas foram coletadas e centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos e refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de DMEM suplementado e determinada a concentração com a câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para obter cerca de 5 x 10⁵ células por poço para as placas de 24 poços. No quarto dia após o plaqueamento foram adicionados 100 µL de LCCM, no sétimo dia o meio de cultura foi trocado e no décimo dia os macrófagos estavam prontos para serem estimulados.

Para determinar a taxa de infecção durante a cinética, foi adicionado lamínulas circulares de 13 mm durante o plaqueamento dos macrófagos em placas de 24 poços. Após a coleta dos tempos de infecção, as lamínulas foram tratadas com kit Panótico rápido de e foi determinada a quantidade de células infectadas, células não infectadas e parasitos intracelulares através do microscópio. Para avaliar a infecção ao longo da cinética, calculou-se o número relativo de parasitos intracelulares pela equação 1, onde calculamos a 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 replica (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 CLBR

Tripomastigotas extracelulares da cultura de LLC-MK₂ foram coletados, centrifugados a 2.500 g por 5 minutos em T.A. e determinada a concentração por câmara de Neubauer. O meio de cultura dos macrófagos derivados após 10 dias foi removido e adicionado 200 µL de meio de cultura. 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 a infecção em triplicatas em placas de 24 poços. Macrófagos não submetidos à infecção por *T. cruzi* foram utilizados como controles. O tempo mínimo para a infecção foi de 2 horas e cada *timepoint* seguiu com a coleta de 200 μL do sobrenadante, lavagem dos poços por duas vezes com PBS 1X gelado, coleta dos macrófagos para extração com reagente Trizol e armazenadas no freezer -70°C para proceder com extração nos tempos de 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após a infecção (Figura 6).

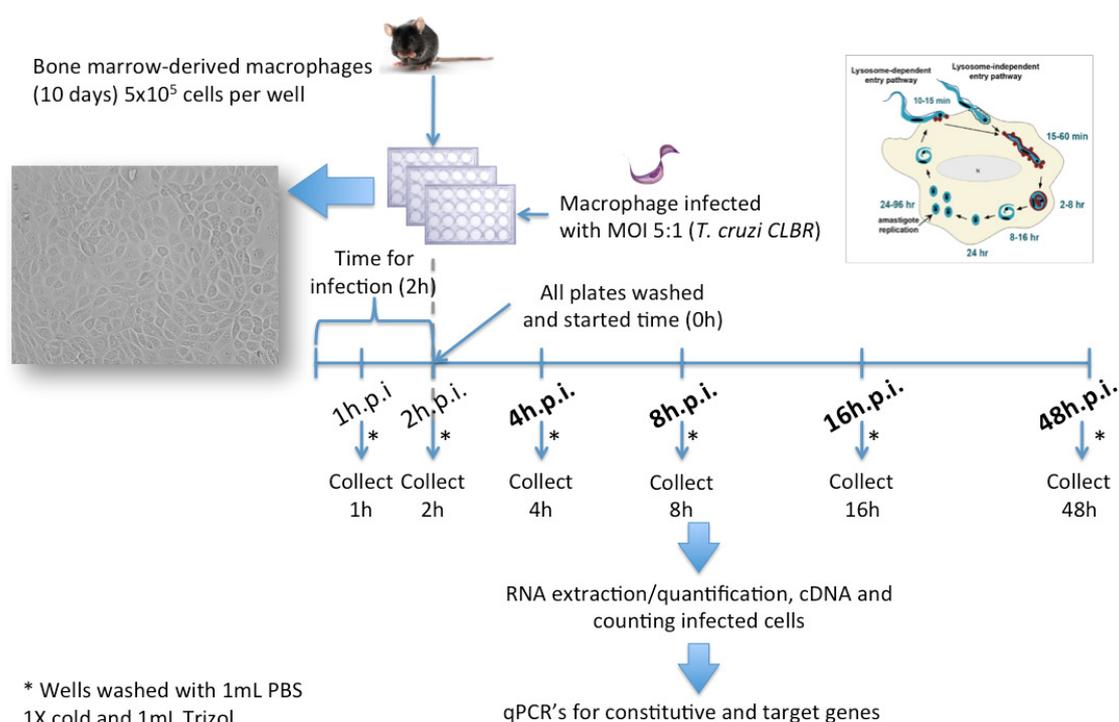


Figura 6 – Desenho experimental da cinética de infecção. Macrófagos derivados da medula óssea e infectados com *T. cruzi* MOI 5:1. Amostras coletadas nos tempos de 1 a 48 horas após infecção foram submetidas a extração/quantificação do RNA, síntese do cDNA e avaliação dos genes do hospedeiro e patógeno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

4.5 Extração de RNA

Após descongelamento dos macrófagos com Reagente Trizol® e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 200 μL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada por vigorosa vortexação e incubada a T.A. por 3 minutos e centrifugada a 12.000 g por 15 minutos com refrigeração de 4°C . A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 10 ng de glicogênio e adicionados 500 μL 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% e, após centrifugação de 5 minutos a 7500 g, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do *pellet*. O RNA foi homogeneizado em 10 µL de água livre de RNAses e estocado em freezer -80°C até a sua utilização.

4.6 Quantificação de RNA por NanoDrop e BioAnalyzer

As amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop. A solução contendo RNA foi homogeneizado e utilizado 1,5 µL para estimar 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 um iniciador randômico (Invitrogen, EUA). Uma pré-mistura contendo RNA (100 ng a 1 ug), iniciadores randômicos (300 ng/µL) e água foi incubado 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), 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 testada teve um controle negativo (RT-) que não recebeu 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 1.

Tabela 1 – Iniciadores para detecção dos genes constitutivos e específicos desenhados pelo software Primer3Plus para RT-qPCR

Iniciadores para qPCR			
Organismo	Gene	Nome	Sequências (5' -> 3')
<i>Mus musculus</i>	RpL32	<i>Left</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG
		<i>Right</i>	TGACTGGTGCCTGATGAACT
	GAPDH	<i>Left</i>	GGGTTCCCTATAAAATACGGACTGC
		<i>Right</i>	CCATTTTGTCTACGGGACGA
	TNF- α	<i>Left</i>	CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA
		<i>Right</i>	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
	IL-12	<i>Left</i>	TGGTGTCTCCACTCATGG
		<i>Right</i>	AGCAGCAGATGTGAGTGG
<i>T. cruzi</i>	RpL9	<i>Left</i>	TGACAACTCGACCATCAACA
		<i>Right</i>	GGCGAAGCGAATCTTAAAC
	24S	<i>Left</i>	CGTGGGTTGAGTTGGAGTG
		<i>Right</i>	GCTTCACCTTGTTTCAGGCATA
	AGO	<i>Left</i>	GCAGAACTGACCTCGTATGG
		<i>Right</i>	CGATTCTGTTTGTGATTCAAAGAT

As reações foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, EUA, seguindo programa próprio. Genes constitutivos normalizados segundo Equação 2 e genes alvos normalizados em relação aos genes constitutivos segundo Equação 3.

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

Equação 2 – Normalização gene constitutivo sinal 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 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).

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, foram precipitados 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* ressuscitado 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*, procedimentos realizado no Laboratório de RNA de Interferência em colaboração com Renan XXXX e sequenciado no laboratório de uso comum da genética no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.10 Análises de bioinformática

As *reads* 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 TGGGAATTCTCGGGTGCCAAGG -e 0.12 -x TRIM:-m 15 --untrimmed-output reads_ao_filtradas.fastq reads_brutas.fastq>reads_filtradas.fastq*”. As *reads* filtradas foram submetidas à ferramenta *FastQC* para avaliar a qualidade do sequenciamento base a base, com o seguinte comando: “*fastqc reads_filtradas.fastq*”.

Para otimizar o mapeamento, as *reads* com sequência iguais foram colapsadas e a frequência absoluta salva no novo identificador da *read* (e.g. *>ID=1_freq=15*) para obtenção de uma significativa diminuição na quantidade de *reads*. 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.

As *reads* 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 reads_filtradas_colapsadas.fasta -v 0 --all --sam --threads 4 --al reads_mapeadas.fasta--un reads_ao_mapeadas.fasta > mapeamento.sam*”. O mapeamento foi realizado para as bibliotecas infectadas e não infectadas. 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 e Hall, 2010), foi realizada a anotação automática das *reads* 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 seqüências de tRNAs (<http://gtrnadb.ucsc.edu> versão mm9). O comando para anotação: “`intersectedBed -a mapeamento.bed -b miRNAs_database_v20.bed -wao > reads_mapeadas_e_annotadas.intb`”.

As anotações seguiram a seguinte estratégia: primeiro foram anotadas as *reads* mapeadas com a base de dados de miRNAs (miRBase versão 20). Com as *reads* não anotadas com miRNAs, foi realizada a anotação com mRNA, snRNA, snoRNA, rRNA e tRNA. As *reads* anotadas foram contabilizadas para cada miRNA (maduro e pre-miRNA) com script `miRExpression.pl` desenvolvido no Laboratório de RNA de Interferência. Somente os miRNAs que apresentaram *reads* contabilizadas nas duas bibliotecas (não infectadas e infectadas) foram utilizados para a análise de expressão diferencial. Para cada miRNA foi realizada a normalização via ferramenta DESeq2 (Love MI, Huber W and Anders S, 2014). A figura 7 abaixo resume a análise de bioinformática desenvolvida para a avaliação do RNA-seq.

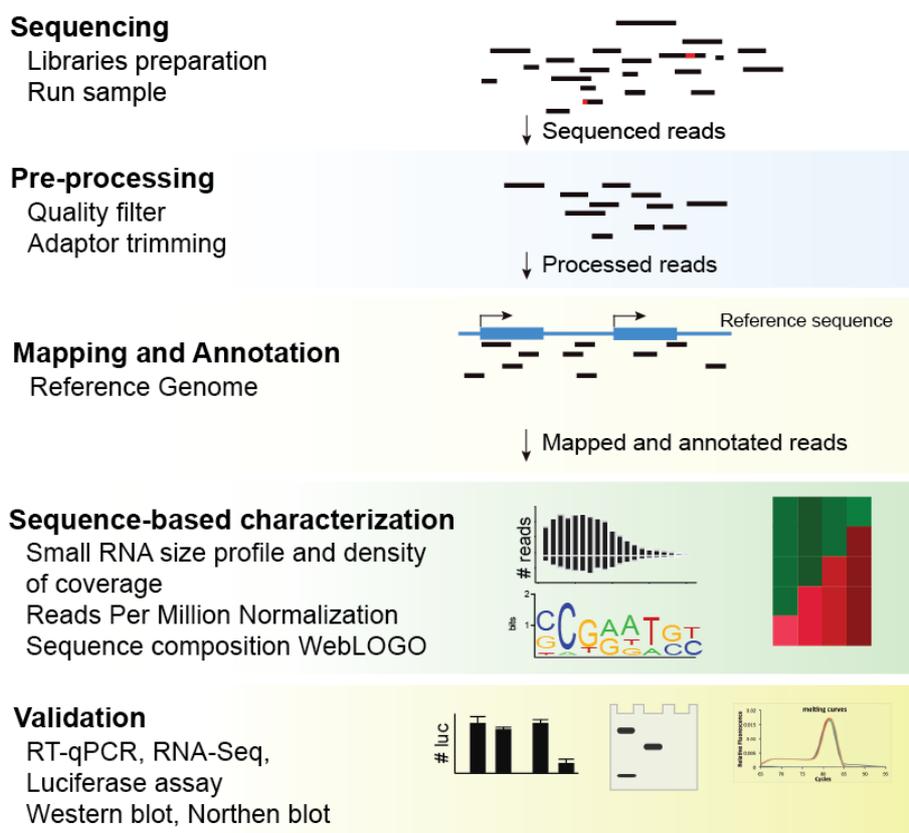


Figura 7 – Pipeline de análise do transcriptoma de pequenos RNAs. Reads brutas foram tratadas retirando seqüências adaptadoras do sequenciamento e selecionadas por tamanho. Mapeadas contra o genoma do *Mus musculus* e *T. cruzi*. As reads mapeadas foram anotadas para os genes dos dois genomas. Os miRNAs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

4.11 Análises estatísticas

Os resultados de 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 discussões

5.1 Padronização da cinética de infecção

Para determinar a eficiência de infecção, macrófagos foram plaqueados em lamínulas circulares de 13 mm e infectados com formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi*. Foram coletados os mesmos tempos de 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após a infecção descritos na seção 4.4 de materiais e métodos. As lamínulas circulares foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas com corante kit panótico rápido. As lâminas foram observadas no microscópio e determinada a quantidade de células infectadas, não infectadas e parasitos intracelulares. Pode ser observado na Figura 8 a presença de parasitos intracelulares ao longo dos tempos da cinética de infecção e no aumento significativo no tempo de 48 horas após a infecção.

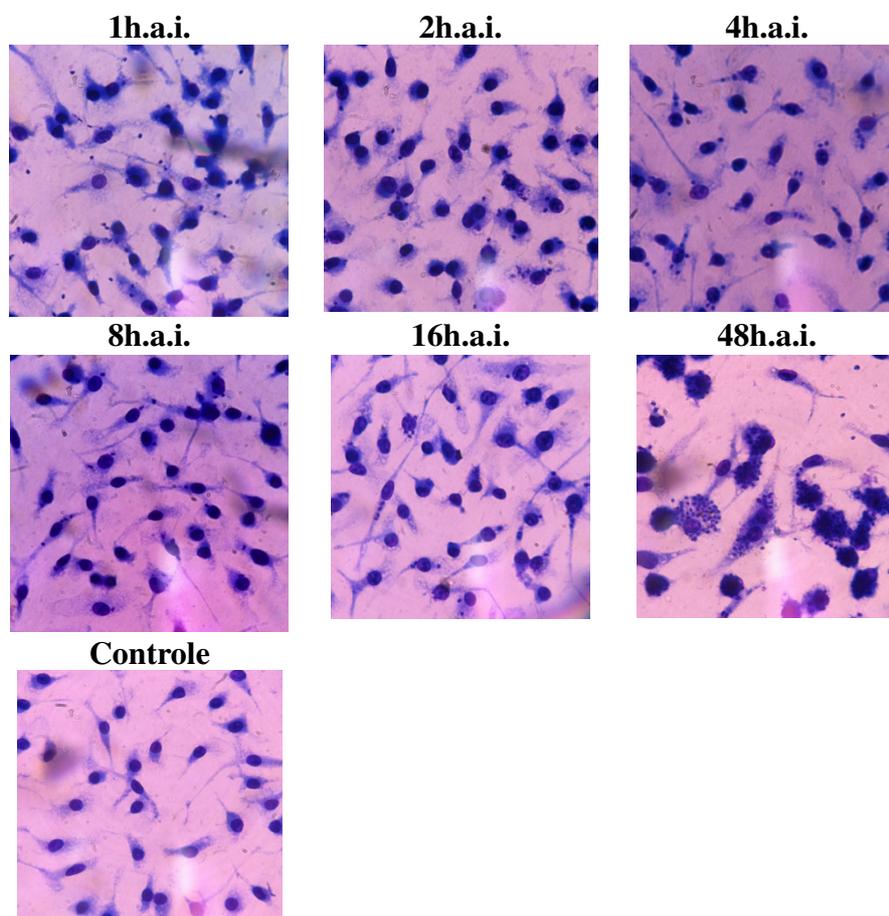


Figura 8 – Microscopia dos macrófagos infectados com *T. cruzi*. Macrófagos plaqueados em lamínulas circulares e fixadas com kit panótico. Nos tempos 1, 2, 4, 8, 16 e 48 horas após infecção (h.a.i.) contém esferas escuras no citoplasma celular no qual corresponde aos parasitos intracelulares. Foi determinada a quantidade de células infectadas, não infectadas e parasitos intracelulares por microscopia invertida. A amostra controle foi coletada no tempo de 1 hora após a infecção.

Para cada tempo de infecção foi realizada a contagem de células infectadas, não infectadas e parasito intracelulares através do microscópio. Foram contadas em média

300 células por cada tempo e por cada réplica biológica. A Tabela 2 possui a contagem total de cada amostra e para comparação do total de parasitos entre as amostras, foi calculado o total relativo no qual consiste da relação de parasitos intracelulares pelo total de células contadas multiplicado pela células infectadas (Equação 1). Pode ser observado a presença de parasitos intracelulares ao longo da cinética da infecção, e aumento significativo no tempo de 48 horas após infecção, o aumento significativo no tempo de 48 horas após infecção era previsto uma vez que o parasito já completou seu ciclo de vida e multiplicação intracelular (Figura 9). Em média obtivemos 43.8% células infectadas com *T. cruzi* entre as amostras coletadas. Este resultado aumenta a probabilidade de observarmos o sinal de resposta contra a infecção dos macrófagos infectados.

Tabela 2 – Taxa de infecção. Contagem de células infectadas, não infectadas, parasitos intracelulares e total de parasitos relativos para a triplicata biológica

Tempos		Células infectadas	Células não infectadas	<i>T. cruzi</i> intracelulares	Total Relativo	Percentual células infectadas
1h.a.i.	A	144	188	204	88.48	43.4%
	B	130	161	173	77.29	44.7%
	C	123	204	180	67.71	37.6%
2h.a.i.	A	178	180	328	163.08	49.7%
	B	130	208	186	71.54	38.5%
	C	100	213	122	38.98	31.9%
4h.a.i.	A	153	169	260	123.54	47.5%
	B	110	192	433	157.72	36.4%
	C	115	184	332	127.69	38.5%
8h.a.i.	A	150	172	202	94.10	46.6%
	B	154	156	297	147.54	49.7%
	C	160	186	300	138.73	46.2%
16h.a.i.	A	130	163	241	106.93	44.4%
	B	138	161	310	143.08	46.2%
	C	140	176	250	110.76	44.3%
48h.a.i.	A	170	185	504	241.35	47.9%
	B	187	198	401	194.77	48.6%
	C	175	204	486	224.41	46.2%

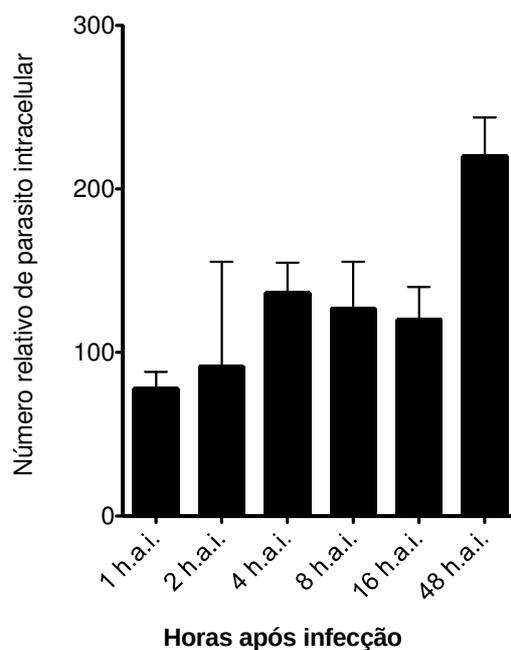


Figura 9 – Número relativo de parasitos intracelulares. Relação do total de parasitos intracelulares e total de células contadas multiplicado pelas células infectadas.

O RNA total foi extraído dos macrófagos infectados e não infectados com *T. cruzi* pelo método de Trizol e submetido ao espectrofotômetro NanoDrop no qual 1,5 μ L do RNA foi utilizado para quantificação. A Figura 10 mostra que a extração foi homogênea para todos os tempos de infecção. Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 μ L de RNA, cerca de 150 ng em média de RNA, com iniciadores randômicos para a síntese.

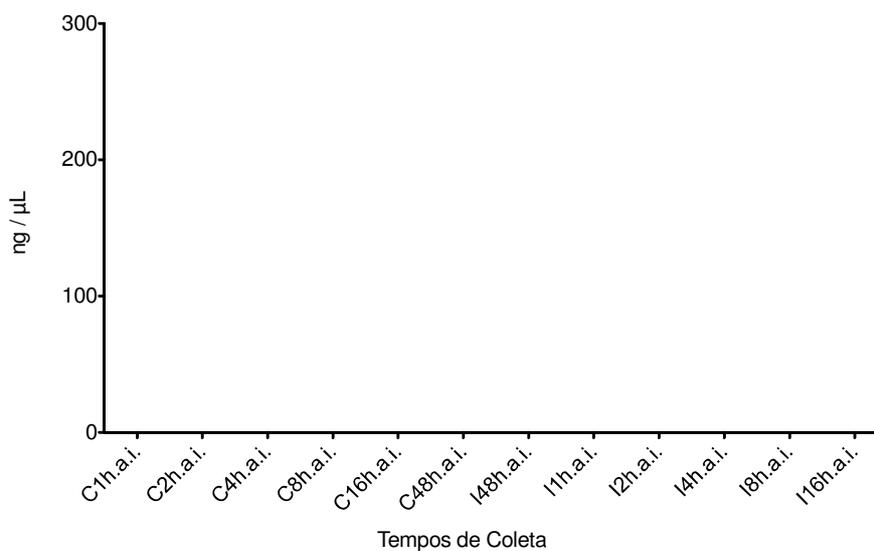


Figura 10 – Quantificação RNA. Amostras quantificadas no equipamento NanoDrop com 1,5 μ L de RNA. As amostras com a letra C no início correspondem a amostras não infectadas (barras brancas) e amostras com a letra I no início correspondem a amostras infectadas (barras pretas).

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 1). O sinal de detecção do mRNA de RpL32 ficou com Ct (*Cycle Threshold*) médio de $19,09 \pm 0,44$ para todas as amostras mostrando homogeneidade entre amostras infectadas e não infectadas, bem como entre os tempos de coleta. Este resultado também ficou bem acima do controle negativo sem transcriptase reversa na síntese do cDNA com Ct médio de $27,33 \pm 1,1$ que indica o background de amplificação (Figura 11).

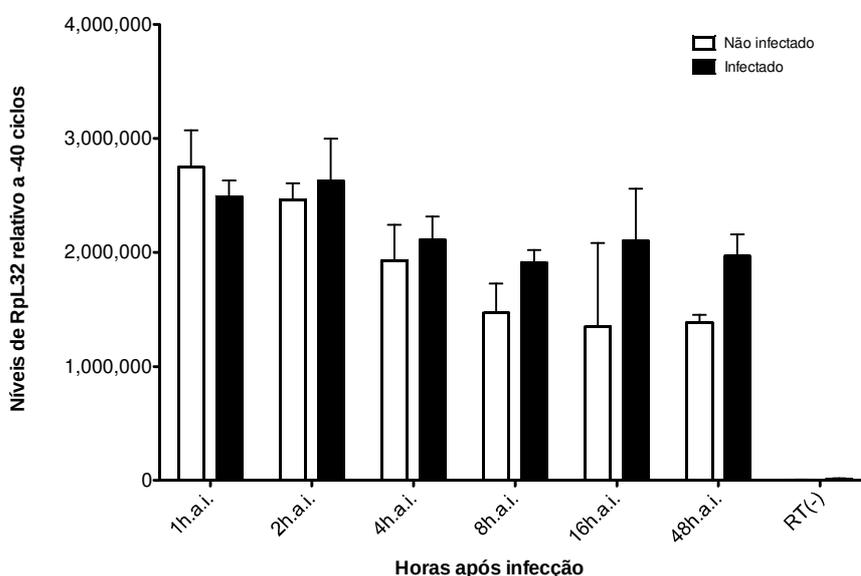


Figura 11 – Sinal de qPCR para genes constitutivos do *M. musculus*. Sinal de qPCR para o gene RpL32 específico da espécie *Mus musculus* normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e nas amostras RT(-).

Para avaliar a presença de parasitos intracelulares nas amostras infectadas e a confirmação da ausência nas amostras não infectadas foi medido o sinal de RT-qPCR para os genes constitutivos do parasito o gene ribossomal alfa (24S) e gene da proteína ribossomal L9 (RpL9) específico da espécie *T. cruzi*. Somente as amostras infectadas com formas tripomastigotas obtiveram sinal específico para os genes 24S e RpL9 com médias respectivas de Ct $6,39 \pm 1,06$ e $21,53 \pm 1,60$ e as amostras não infectadas obtiveram amplificação inespecífica com médias de Ct $27,27 \pm 4,29$ e $35,78 \pm 1,67$, respectivamente para 24S e RpL9, sinal foi correspondente com as amostras negativas (Figura 12).

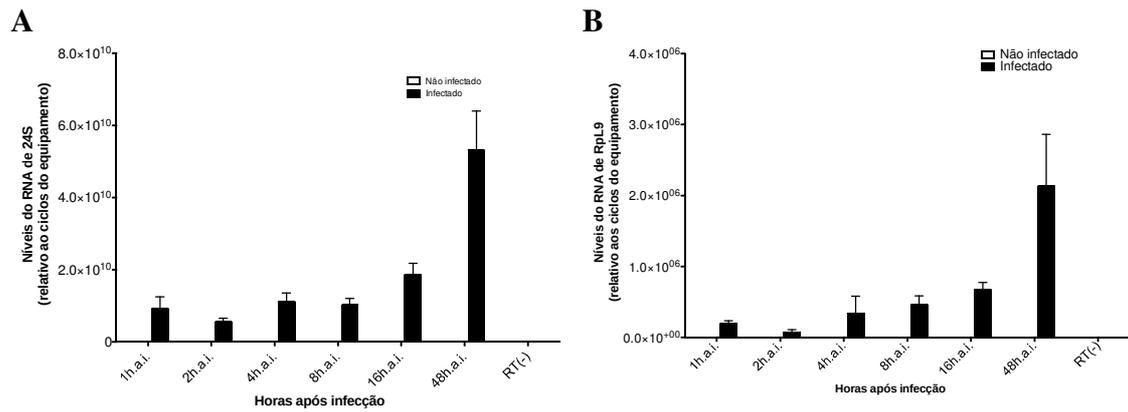


Figura 12 – Sinal de qPCR para genes constitutivos do *T. cruzi*. (A) Sinal de RT-qPCR para o gene 24S normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e amostras RT(-). (B) Sinal de RT-qPCR para o gene Rpl9 normalizado por -40 ciclos ao longo da infecção e amostras RT(-).

As células hospedeiras mediante infecção por patógenos levam a expressão positiva de componentes da matriz extracelular promovendo a proteção de ataques sucessivos dado por patógenos da mesma espécie ou espécie diferentes (refs). Há trabalhos relatando esse fenômeno tanto em parasitos como XXXX (Ref), bactérias XXX (Ref), quanto em vírus XXX (Ref). De forma similar observamos em infecções com *T. cruzi* modificações na expressão dos genes responsáveis por codificar proteínas da matriz celular, tal como a Actina (Pereira *et al.*, 200). E ao medir o sinal de RT-qPCR para Actina observamos um aumento significativo da expressão relativa nas amostras contendo *T. cruzi* em relação as amostras não infectadas (Figura 13). Em outros modelos de estudos com camundongos, a Actina é amplamente utilizada como controle normalizador de genes alvos do estudo, no entanto para modelo de infecções por patógenos, como *T. cruzi*, pode ser considerado como marcador da infecção, demonstrado por (Manque *et al.*, 2011) através da técnica de microarranjo o aumento da expressão do mRNA de Actina ao longo da infecção.

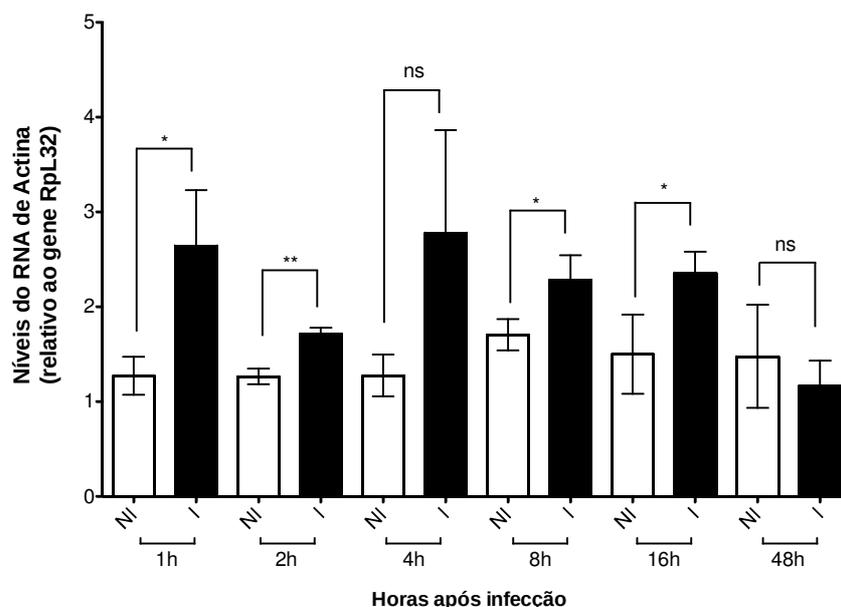


Figura 13 - Sinal de qPCR para o gene de Actina. O Ct das amostras infectadas e não infectadas foram normalizadas por Rpl32 e realizado teste de significância para amostras não pareadas com *t-Student* p-valor < 5%. Amostras Não Infectadas (NI) e amostras Infectadas (I).

A interação de macrófagos e células dendríticas com formas infectivas tripomostigotas do *T. cruzi* promove a secreção de citocinas pro-inflamatórias responsáveis por sinalizar e ativar a resposta imune contra o patógeno. As principais citocinas secretadas pela infecção do *T. cruzi* são *Tumor Necrose Factor Alpha* (TNF- α), *Interleucine 6* e *Interleucine 12* (IL-12) sendo que macrófagos produzem TNF- α , IL-6 (Penas, 2014) e IL-12 (Vázquez, 2014) e células dendríticas IL-12 (Terrazas, 2014). Estas citocinas são responsáveis por levar a ativação de células *Natural Killer* (NK) para a produção de Interferon do tipo II (Interferon gamma) responsável pela ativação de macrófagos e resposta MHC II para resposta imune adaptativa e inata. Há relatos na literatura da produção de citocinas TNF- α e IL-6 induzida mediante infecção por *T. cruzi* (Junqueira *et al.*, 2010) (de Pinho *et al.*, 2014). Ao medir o sinal de qPCR para TNF- α 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. No entanto não observamos expressão diferencial significativa para a citocina IL-12 (Figura 15). O resultado obtido mostra que temos um problema técnico na amplificação do sinal de RT-qPCR para estes genes. Contudo, a expressão diferencial de TNF-alpha ilustra a resposta do macrófago contra a infecção e observamos que o pico de expressão foi no tempo de

2h após a infecção e se mantendo elevada até 48 horas após infecção em relação aos macrófagos não infectados (Figura 14).

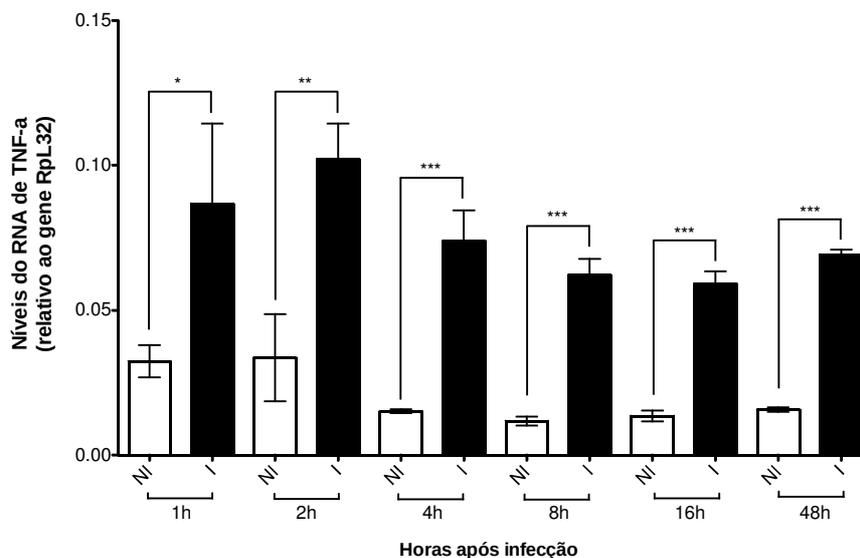


Figura 14 – Sinal de qPCR para o gene da citocina pro-inflamatório TNF- α . O Ct das amostras infectadas e não infectadas foram normalizadas pelo sinal de Rpl32 ao longo da infecção e realizado teste de significância para amostras não pareadas com *t-Student* p-valor < 5%. Amostras Não Infectadas (NI) e amostras Infectadas (I).

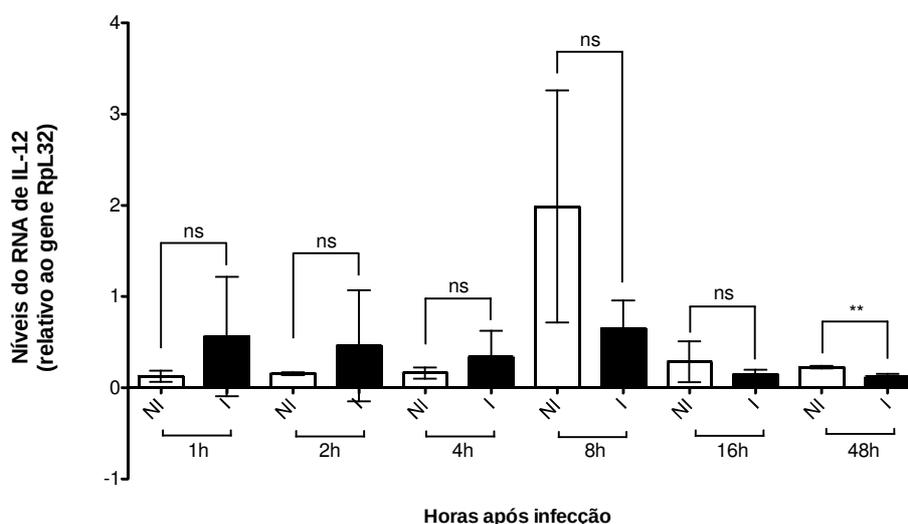


Figura 15 – Sinal de qPCR para o gene da citocina IL-12. O Ct das amostras infectadas e não infectadas foram normalizadas pelo sinal de Rpl32 ao longo da infecção e realizado teste de significância para amostras não pareadas com *t-Student* p-valor < 5%. Amostras Não Infectadas (NI) e amostras Infectadas (I).

Todos os tempos são determinantes para a resposta do macrófago contra a infecção do *T. cruzi*, o sinal de TNF- α indicou que 1 hora após a infecção já há a produção de mRNA da citocina, permanecendo ao longo de 2, 4, 8, 16 até 48 horas após a infecção. No entanto os tempos entre 2 onde observamos o pico de produção está diretamente relacionado com a resposta precoce do macrófago mediante a

infecção do *T. cruzi*, e possivelmente pela produção de pequenos RNA para montar essa resposta parasitária. Além da resposta do macrófago, durante a cinética da infecção, o parasito sofre diversas mudanças fisiológicas para se adaptar a resposta do hospedeiro e mudar da forma infectiva tripomastigota para a forma replicativa amastigota. Os tempos da cinética da infecção foram selecionados com base na resposta do macrófago e nas mudanças fisiológicas do parasito. **Considerando estes critérios, foram selecionados os tempos de 2, 4, 8 e 48 horas após a infecção, para sequenciamento de pequenos RNAs na plataforma Illumina e agrupados em tempos precoces e tardios para resposta mediante uma infecção.**

5.2 Análise Bioinformática dos pequenos RNAs

Ao final do sequenciamento obteve-se arquivos no formato fastQ contendo as leituras (*reads*) para as sequencias dos RNAs de tamanho entre 15 e 45 nucleotídeos e foram submetidas ao *pipeline* de análise desenvolvido no laboratório de RNA de Interferência (LabRNAi).

As *reads* correspondentes aos RNAs das amostras infectadas e não infectadas foram mapeadas contra o genoma do *M. musculus* (versão GRCm38) e *T. cruzi* (versão 7.0) concatenados. O mapeador utilizado foi o Bowtie (Langmead B., et. al. 2009), não permitindo *mismatch* (erro de pareamento ou alinhamento) das *reads* em relação aos genomas e permitindo o mapeamento múltiplo (Figura 15).

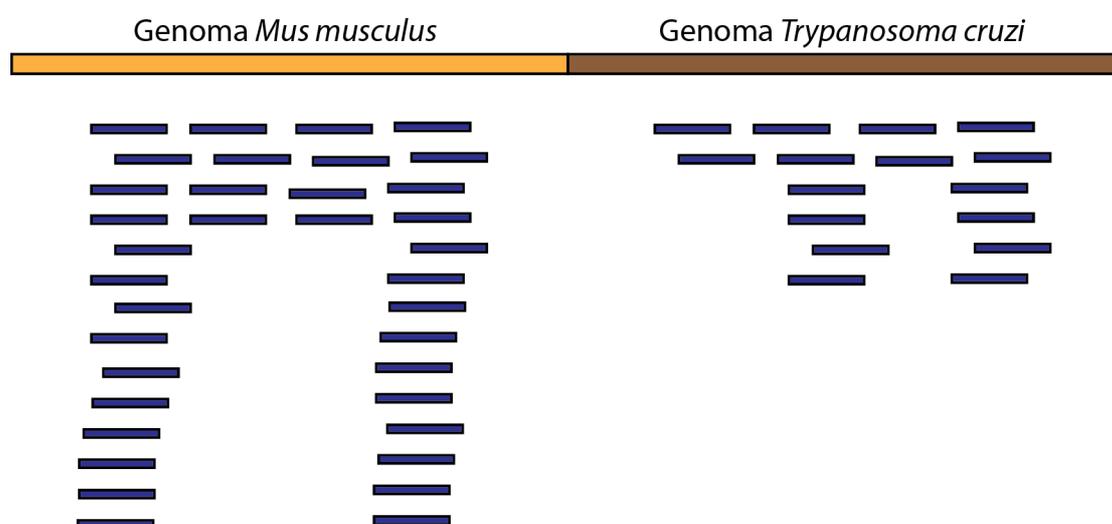


Figura 16 – Mapeamento das *reads* nos genomas *Mus musculus* e *Trypanosoma cruzi* concatenados. As *reads* foram mapeadas considerando 0 mismatches e permitindo alinhamento múltiplo.

A Figura 16 mostra o resultado do mapeamento com o percentual de *reads de* RNAs mapeadas no genoma hospedeiro, no genoma do patógeno ou ambos os genomas. Obtivemos uma taxa em torno de 60% de *reads* mapeadas totais, sendo que este número tende a aumentar quando um numero maior de *mismatches* é permitido no alinhamento.

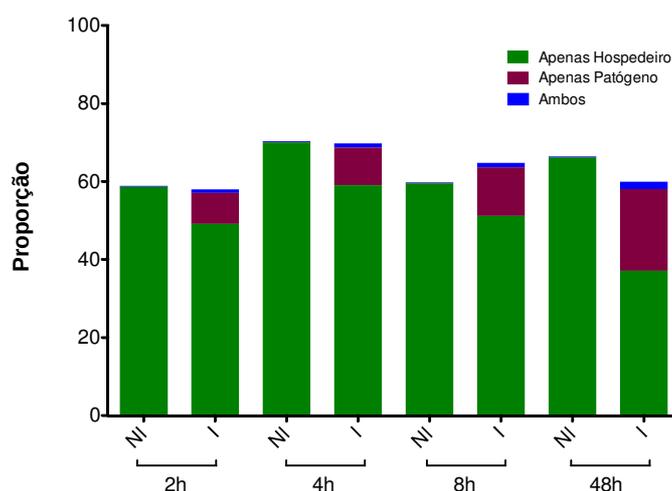


Figura 17 – Taxa de mapeamento das bibliotecas. *Reads* mapeadas no genoma do *Mus musculus* (versão GRCm38) e *T. cruzi* (versão 7.0) ou em ambos os genomas.

Os resultados mostram que a detecção de um número significativo de RNAs mapeados no genoma do patógeno só ocorreu nas bibliotecas preparadas a partir de macrófagos infectados, corroborando a pureza das amostras controle sem a presença dos parasitos. O numero relativo de *reads* do parasito em relação ao hospedeiro aumenta com o tempo de infecção como era de se esperar devido ao crescimento do *T. cruzi* de acordo com o seu ciclo de vida. E observamos um aumento da proporção de *reads* derivadas do *T. cruzi* nos tempos 2, 4, 8 e 48 horas após infecção (Figura 16).

5.2.1 Análise das *reads* 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 dentre as anotações ou *features* (regiões específicas do genoma anotadas com alguma função biológica validadas *in silico* e/ou *in vitro*) conhecidas no

genoma do parasito, como mRNA, snRNA, rRNA, tRNA, além das regiões sem anotação denominadas “No feature”.

As anotações correspondentes a rRNA e tRNA representaram mais de 80% de todos os pequenos RNA derivados do parasito (Figura 17). A representação elevada das *features* de rRNAs e tRNAs sugerem que esses pequenos RNAs possuem alguma função durante a infecção em células hospedeiras.

Refazer figura em pt

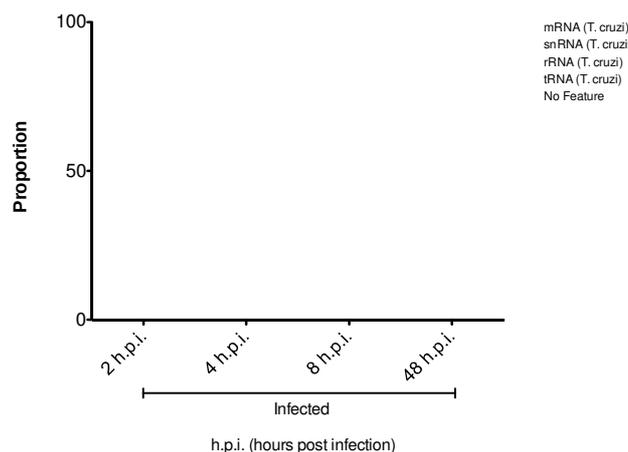


Figura 18 – Distribuição das reads nas anotações do *T. cruzi*. As reads mapeadas no genoma do *T. cruzi* foram distribuídas para as features mRNA, snRNA, rRNA, tRNA e sem anotação (*No feature*) ao longo da infecção.

Analisando a distribuição de tamanho dos pequenos RNA mapeados somente no genoma do patógeno, observamos um perfil de degradação mais proeminente nas features de mRNAs, rRNAs e sem anotação. Para as features de snRNAs e tRNAs observamos uma distribuição normal com picos de pequenos RNAs em 36 nucleotídeos derivados de snRNAs e pico evidente de pequenos RNAs em 33 nucleotídeos derivados de tRNAs (Figura 18). Quando avaliamos a representação dos genes ao longo da infecção, não observamos uma mudança qualitativa. O pico de 33 nucleotídeos dos pequenos RNAs derivados de tRNA observado nas bibliotecas de pequenos RNAs já foram descritos em outros estudos mediante a resposta do parasito a estresse nutricional, bem como em parasitos sem tratamentos (Garcia-Silva *et al.*, 2010; Franzén *et al.*, 2011). Entretanto ainda não se sabe qual seria a função desses pequenos RNAs no ciclo de vida do parasito, Garcia-Silva e colaboradores sugere que há um aumento de pequenos RNAs derivados de tRNAs durante o estresse nutricional e que a associação com a proteína Argonauta estaria colocalizada na região onde as microvesículas são secretadas e o complexo pequeno RNA e argonauta derivada do parasito atuariam silenciando alvos na células hospedeiras. As reads derivadas de

sequências de rRNA mostraram um padrão sem tamanho predominante o que é condizente com degradação. Assim, dentre as anotações representadas nos pequenos RNAs do parasito, somente a família de tRNAs parece ser de relevância biológica.

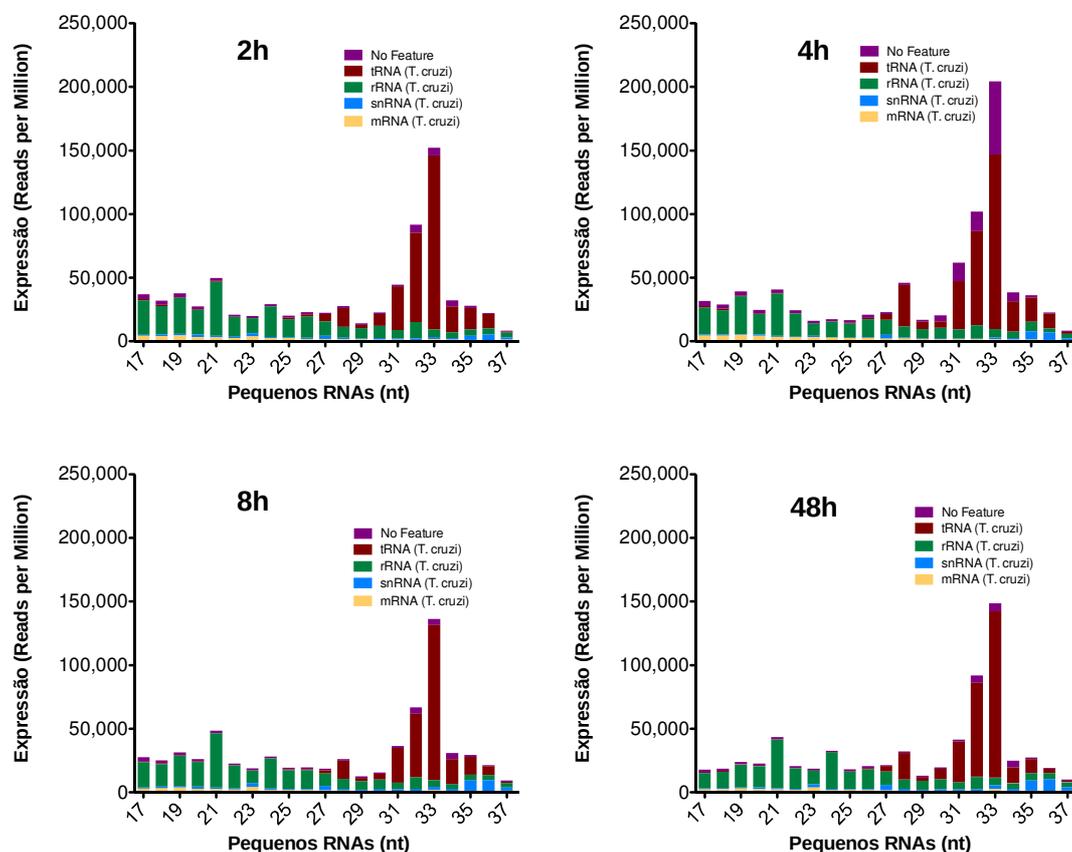


Figura 19 – Distribuição de tamanho das reads do *T. cruzi*. O tamanho das reads mapeadas representado no eixo x, a normalização das reads por milhões (RPM) mapeadas segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do *T. cruzi*.

Conforme observado há um padrão de tamanho dos pequenos RNAs com 33 nucleotídeos derivados de sequências de tRNAs ao longo da infecção. E ao longo da infecção observamos um aumento de parasitos intracelulares principalmente no tempo de 48 horas após a infecção. Quando comparamos em termos quantitativos a expressão de pequenos RNAs ao longo da infecção, não observamos uma diferença significativa. Entretanto a quantidade de reads no sequenciamento de RNA é limitado pela quantidade de cluster das sequencias das amostras. Para a comparação entre as amostras seria necessário realizar o sequenciamento com a técnica de spike-in, a qual consiste em adicionar uma quantidade conhecida de RNA no processo de preparação das bibliotecas e após o sequenciamento normalizar a quantidade relativa de reads pela representação do spike-in. Como não realizamos o spike-in nas amostras

infectadas com *T. cruzi* não podemos afirmar que a quantidade de pequenos RNAs manteve-se constante ao longo da infecção. Contudo podemos realizar uma normalização alternativa para avaliar a variação da quantidade de pequenos RNAs derivados do *T. cruzi*. Dessa forma, realizamos a normalização da expressão dos pequenos RNA de tRNAs em relação a quantidade de parasitos em cada tempo de infecção através do gene constitutivo RpL9 do parasito. Observamos diminuição relativa da quantidade de pequenos RNAs (Figura 19) em relação a quantidade de parasitos detectados no RT-qPCR (Figura 12). Este resultado sugere que a expressão dos pequenos RNA do parasito diminui ao longo da cinética da infecção. Em adição medimos por RT-qPCR o sinal do gene da proteína Argonauta do parasito e observamos mesmo padrão de diminuição do mRNA de TcAgo ao longo da infecção, sugerindo que os pequenos RNAs do parasito e TcAgo possuem papel importante no inicio da infecção, se estes tiverem alguma relação evidentemente.

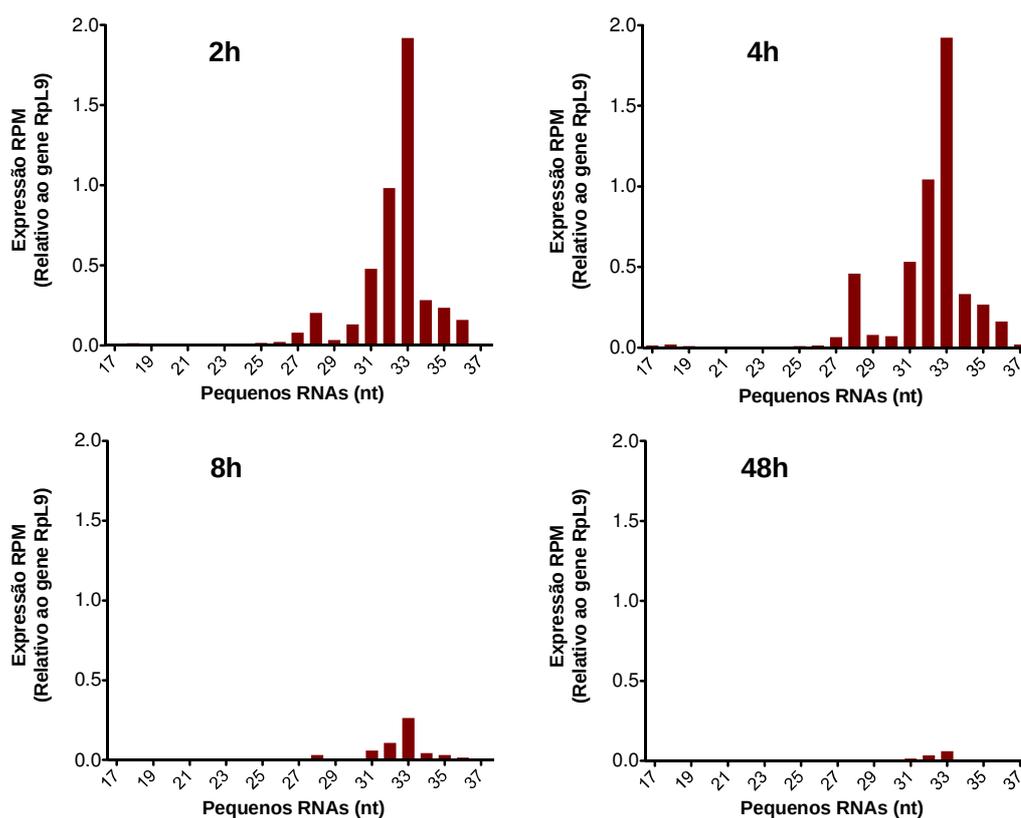


Figura 20 – Distribuição de tamanho das reads de *T. cruzi* normalizado pelo sinal do gene constitutivo do parasito RpL9. O tamanho das reads mapeadas representado no eixo x, a normalização das reads por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4.

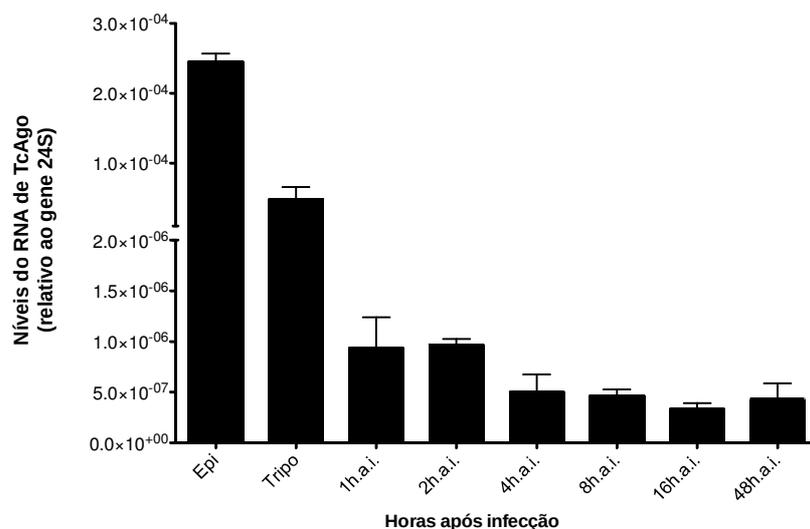


Figura 21 – Sinal de qPCR para o gene de ArgonAUTA do *T. cruzi*. Os Cts das amostras infectadas, amostras das formas epimastigotas e tripomastigotas foram normalizados pelo sinal do gene de 24S.

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

Os RNAs mapeados somente no hospedeiro foram classificados por anotações (lincRNA, pseudogene, snRNA, rRNA, snoRNA, mRNA, miRNA e tRNA) ou sem anotação denominadas “*No feature*” (Figura 20).

Pode ser observado que não há grandes diferenças de representação das anotações nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção. No entanto na amostra de 48 horas após a infecção há um diminuição significativa da *reads* representadas para miRNAs e aumento para as *reads* representadas de tRNAs na amostra infectada em relação a não infectada. É importante destacar que estes RNAs são derivados do hospedeiro e não do parasito, pois seriam necessários 10 *mismatches* para que uma *read* derivada do tRNA de camundongo mapeasse no tRNA do *T. cruzi*. Recentemente foi publicado uma proteína transmembrana de Apicomplexa responsável pela importação de tRNAs (tRIP do inglês *tRNA import protein*) exógenos de parasitos causadores da Malária (Ref). Assim investigamos se o *T. cruzi* poderia possuir codificar tRIP e importar os tRNAs do hospedeiro durante a fase intracelular. Atraves de análise de alinhamento de nucleotídeos ou aminoácidos do gene e proteína do tRIP, não identificamos homologia e possíveis candidatos no genoma do *T. cruzi*. Por outro lado, analisamos em uma biblioteca de pequenos para formas tripomastigotas a presença de pequenos RNAs não mapeados no genoma do *T. cruzi* que poderiam

mapear no genoma da Macaca mulata, organismo que dar origem a linhagem celular onde as formas tripomastigotas foram cultivadas e coletadas para infecção dos macrófagos. Em seguida, analisou-se a distribuição de tamanho dos pequenos RNAs derivados do genoma do hospedeiro normalizando conforme a equação 4 pelo total mapeado no genoma (Figura 21).

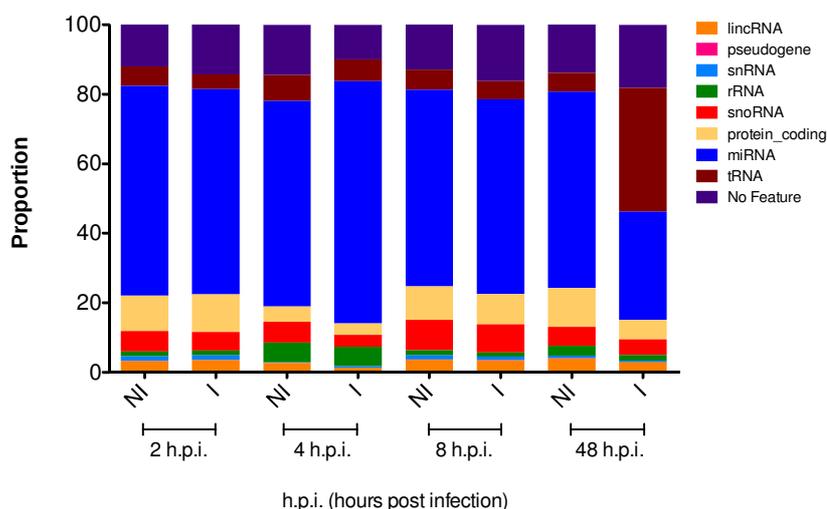


Figura 22 - Distribuição das reads por anotações do *Mus musculus*. O total de reads mapeados foram distribuídas em cada biblioteca e cada anotação distribuída segundo sua proporção. De forma geral não há diferenças nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção, somente no tempo de 48 horas há uma diferença grande que pode ser explicada pelo viés de sequenciamento ou o macrófago com grandes alterações gênicas.

Conforme observado nas figura 21 e 22 não há diferença da representação geral dos miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas entre amostras infectadas e não infectadas. A diminuição da representação dos miRNAs e aumento da representação dos tRNAs no tempo 48 horas não alteraram o perfil de tamanho do RNAs mapeados. No entanto, durante o sequenciamento a quantidade de clones sequenciados é limitado e escolhidos aleatoriamente. Com a presença de sequencias derivadas do *T. cruzi* há maior chance de competição com as sequencias do *M. musculus* para serem sequenciadas. O que pode explicar a diminuição das reads derivadas de miRNAs, pois estaria relacionado a chance de sequenciamento dos clones representantes dos miRNAs. Dessa maneira, a expressão dos miRNAs foi normalizada pelo total de mapeados nos miRNAs e assim evitar o viés de sequenciamento (Figura 22).

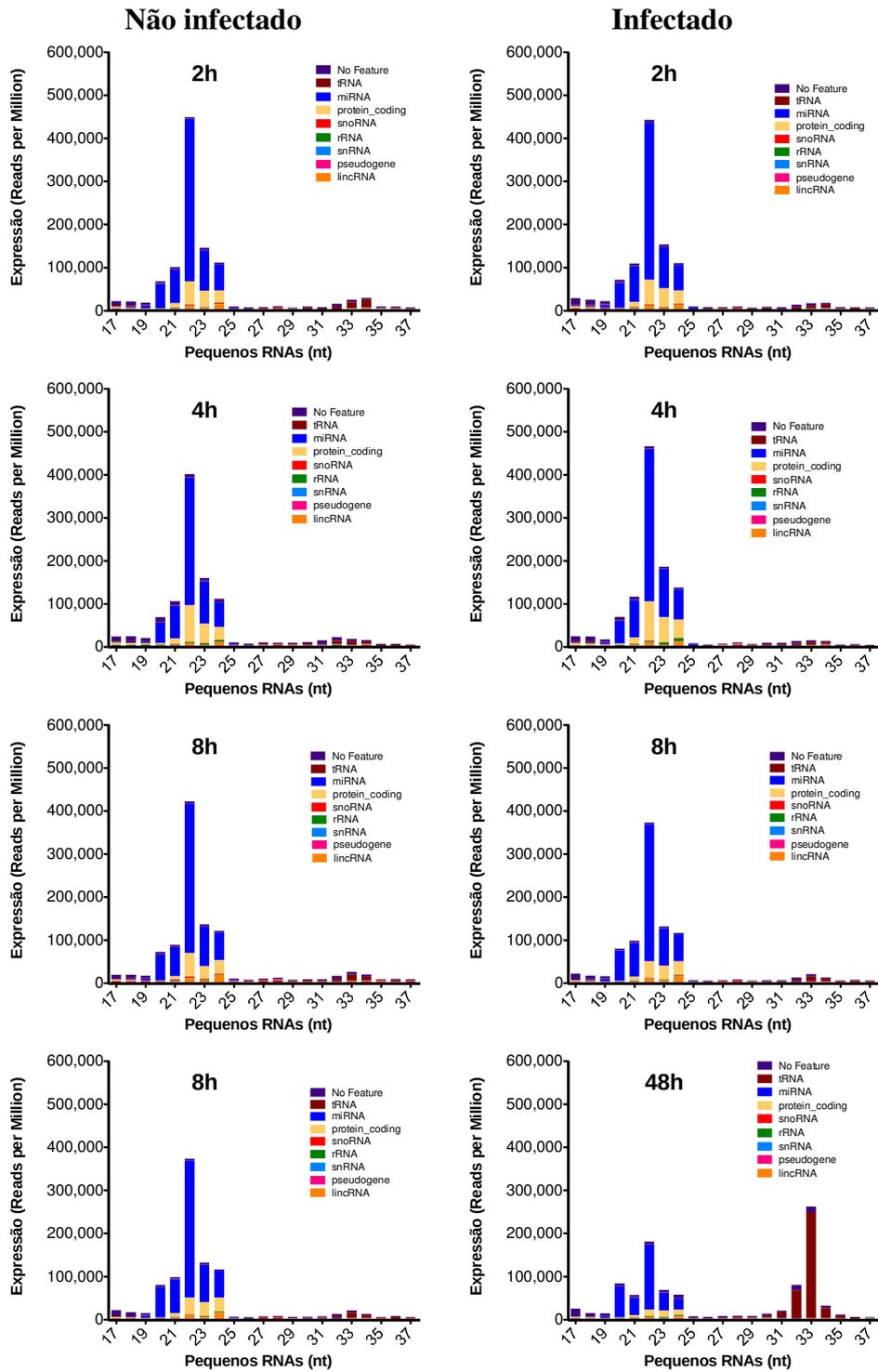


Figura 23 – Distribuição de tamanho das reads do *Mus musculus*. O tamanho das reads mapeadas representado no eixo x, a normalização das reads por milhões (RPM) mapeados segundo a equação 4 e cada cor representa uma anotação do genoma do *M. musculus*.

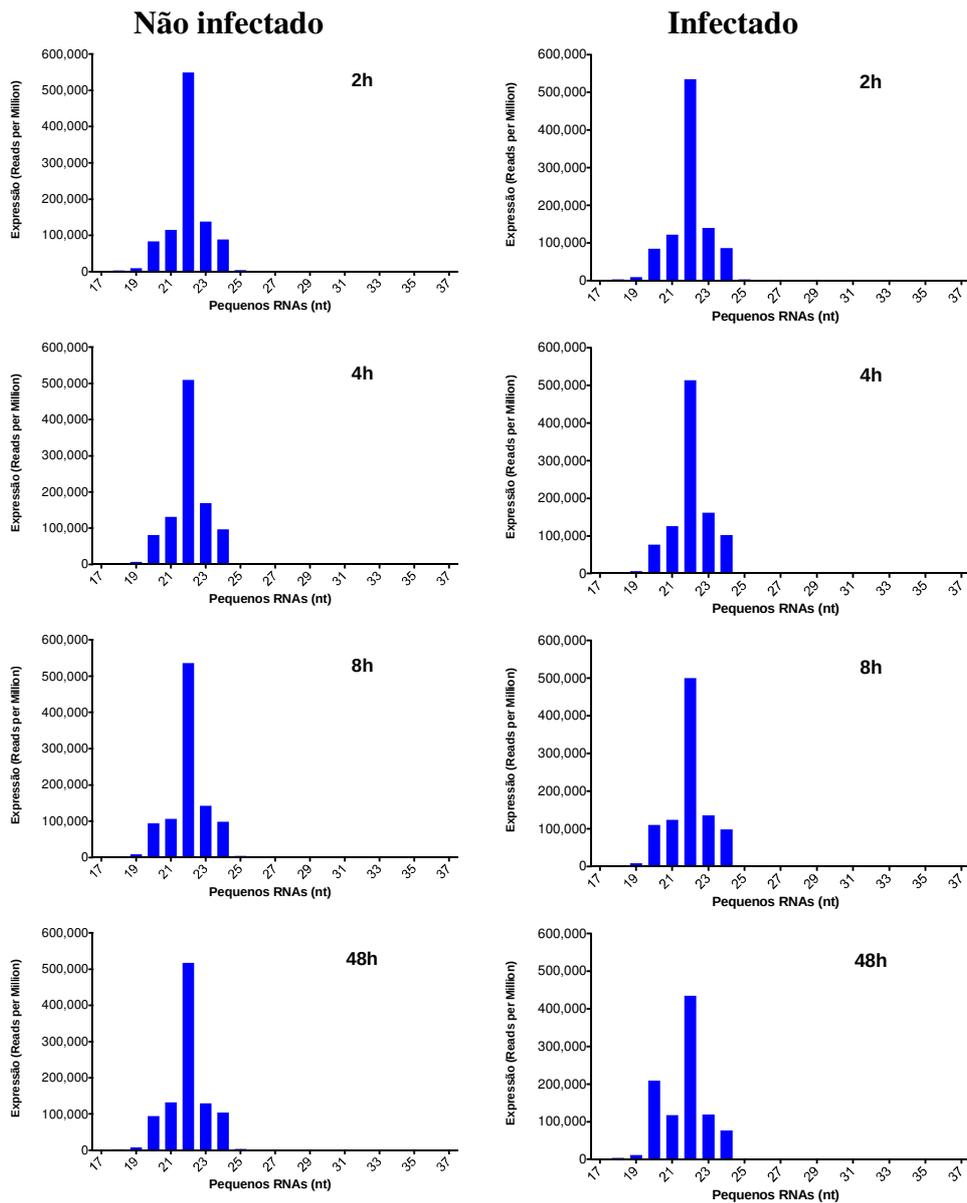


Figura 24 – Distribuição de tamanho das reads do *Mus musculus*. O tamanho das reads mapeadas representado no eixo x, a normalização das reads por milhões (RPM) total mapeado nos miRNAs segundo a equação 5. Não houve diferenças visíveis nos tempos precoces, no entanto uma leve diminuição da expressão no tempo de 48h

Observou-se grandes diferenças de expressão para miRNAs e tRNAs no tempo de 48 horas após a infecção, sugerindo que estas modificações possam estar associadas com a perda de função dos macrófagos. A presença de pequenos RNAs derivados de sequências de tRNA do genoma hospedeiro, sugere o elevado estresse oxidativo celular, no aparecimento de tRNA *halves* e repressão da tradução (Thompson e Parker, 2009; Ivanov *et al.*, 2011; Sobala e Hutvagner, 2011; Czech *et al.*, 2013). No entanto estudos relatam que pequenos RNA derivados de tRNA podem atuar como reguladores de expressão global por silenciamento de RNA (Haussecker *et al.*, 2010), mas os dados apresentados na figura 21 necessitam de validações

experimentais para avaliar a real função desses pequenos RNA derivados de tRNA. Com as *reads* de miRNAs normalizadas pelo total mapeado em miRNAs, o perfil da distribuição de tamanho não mostrou alterações grandes, no entanto observa-se uma diminuição pequena da expressão dos miRNAs ao longo da infecção, principalmente no tempo de 48 horas após infecção. Com a normalização pelo total dos microRNAs houve a redução do viés no tempo de 48 horas após a infecção e a diminuição da diferença entre as amostras não infectada e infectada. Com o aumento de pequenos RNAs derivados de tRNA do macrófago e a possível sinal a elevado estresse pela infecção, as comparações da expressão dos miRNAs entre amostras infectadas e não infectadas foram realizadas somente para os tempos precoces de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Estes miRNAs foram comparados par a par para avaliar a correlação da expressão (Figura 23).

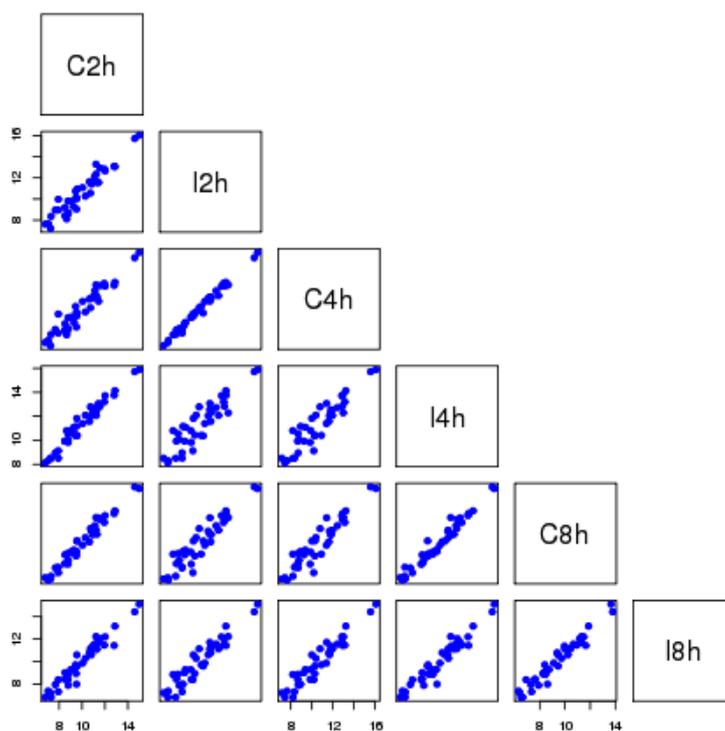


Figura 25 – Scatter plot da expressão dos miRNA. Correlação da expressão dos miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Cada círculo em azul representa um miRNA com expressão nas amostras não infectadas “C” e infectadas “I”.

A expressão dos miRNAs não apresenta grandes alterações, pois diferente de outras classes de pequenos RNAs, como siRNA, os microRNAs possuem uma expressão constitutiva e sofre alterações para realizar o ajuste fino da expressão dos seus alvos. Observamos um aumento discreto na dispersão no tempo de 4 horas o qual diminui em 8 horas após a infecção (Figura 23).

O sequenciamento dos pequenos RNAs foi realizado para amostras individuais não infectadas e infectadas para os tempos selecionados. De fato realizamos o pool das replicas biológicas da 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 solicita no mínimo 1µg de RNA total e segundo, pela consistência entre as replicas biológicas em outros sequenciamento de RNA. Contudo, os métodos para a seleção de genes diferencialmente expressos são baseados em replicas biológicas com o calculo da expressão média e desvio padrão, variáveis necessárias para calcular se há diferença estatística entre dois tratamentos. Portanto, realizamos diferentes normalizações dos microRNAs expressos nas bibliotecas bem como diferentes métodos para seleção dos microRNAs diferencialmente expressos. Os métodos de normalização utilizados foram, Reads Per Million (RPM) e normalização da expressão pela ferramenta DESeq2. Para a seleção dos microRNAs diferencialmente expressos utilizamos, a seleção dos microRNAs com foldchange superior a 1,5 vezes, seleção dos microRNAs pela distribuição do foldchange e considerando aqueles com diferença significativa inferior a 5% e por fim utilizamos a ferramenta DESeq2 para avaliar a dispersão de todas as features detectadas no sequenciamento e determinar quais microRNAs foram diferencialmente expressos com significância inferior a 5%.

5.2.2.1 Seleção dos microRNAs diferencialmente expressos pelo valor do *Foldchange*

A expressão dos microRNAs foi normalizada pelo método RPM (*Reads Per Million*) o qual indica a proporção de representação dos microRNAs a cada milhão de *reads* sequenciadas. Para evitar valores de foldchanges exorbitantes, filtramos removendo os microRNAs com expressão inferior a 100 *reads* tanto na amostra infectada quanto na amostras não infectada. Em seguida obtivemos o valor de foldchange para cada microRNA dividindo a expressão normalizada da amostra infectada em relação a amostras não infectada. E realizamos a seleção dos miRNAs pelo critério de *foldchange* superior a 1,5 vezes.

A figura 24 ilustra os miRNAs diferencialmente expressos nos tempos 2, 4 e 8 horas após a infecção. E pode ser observado o aumento de miRNAs expressos diferencialmente ao longo da infecção com pico em 4h.

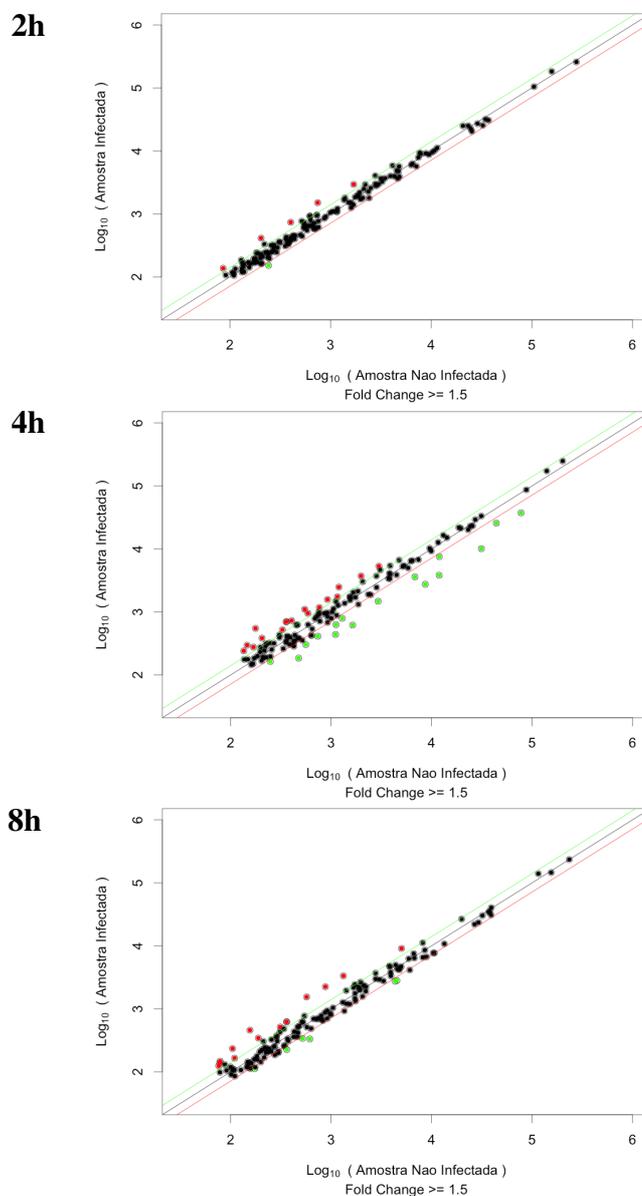


Figura 26 - Volcano plot para expressão dos miRNAs nos tempos de 2 e 8 horas após a infecção. Comparação da expressão dos miRNA nas amostras infectadas e não infectadas baseado apenas da diferença em *foldchange*, a biblioteca de 4 horas após a infecção não foi feita em réplicas técnicas como as bibliotecas de 2 e 8 horas após a infecção.

No total foram 49 miRNAs diferencialmente expressos em todos os tempos comparando os macrófagos infectados aos não infectados no critério de *foldchange*. Estes miRNAs podem ser responsáveis por regular processos biológicos importantes ao longo da infecção por *T. cruzi*. Para os microRNAs expressos positivamente observamos que 2, 11 e 8 microRNAs 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. E apenas 3 microRNAs foram expressos comumente nos três tempos após infecção. Para os microRNAs expressos negativamente observamos 0, 15 e 5 microRNAs foram exclusivos para os tempos de 2, 4 e 8 horas após infecção respectivamente. Apenas um microRNA foi expresso em comum entre 4 e 8 horas após infecção. E nenhum miRNA foi expresso negativamente entre os três tempos de infecção. (Figura 25).

Refazer figuras

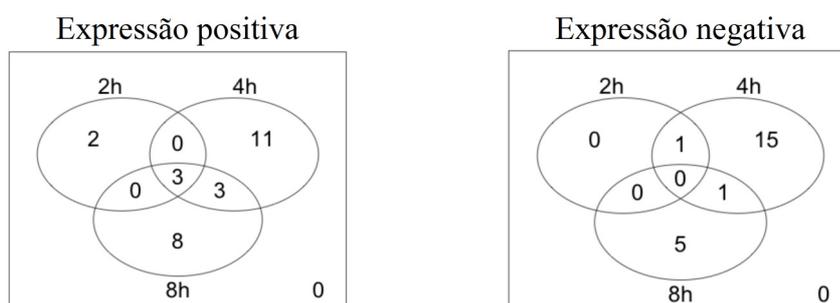


Figura 27 – Diagrama de Venn para expressão positiva e negativa dos miRNAs nos tempos de 2h, 4h e 8h. Representação da distribuição dos miRNAs diferencialmente expressos positivamente e negativamente ao longo da infecção.

Ao longo da infecção há aumento do número de miRNAs diferencialmente expressos com pico representado no tempo de 4 horas após a infecção. Todos os 49 miRNAs possuem expressão normalizada superior a 100 RPM. No tempo de 2 horas após a infecção apresentou 6 miRNAs diferencialmente expressos, indicando uma possível resposta inicial dado a infecção pelo *T. cruzi*. No tempo de 4 horas após a infecção observa-se aumento significativo de 17 miRNAs expressos positivamente e 17 expresso negativamente e aumento de miRNAs com expressão normalizada superior a 1.000 RPM. E uma diminuição dos miRNAs no tempo de 8 horas com 14 miRNA expressos positivamente e 6 miRNAs expressos negativamente (Figura 26).

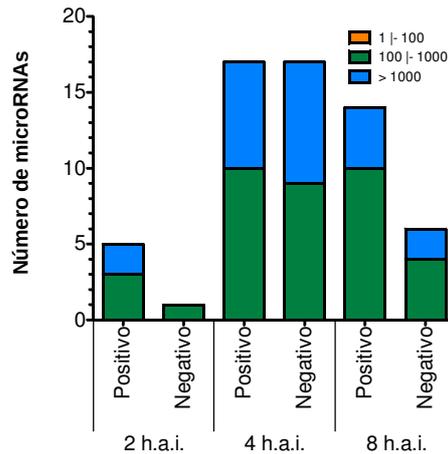


Figura 28 – Numero de miRNAs diferencialmente expressos positivamente e negativamente ao longo da infecção. Em cada barra está representado o número de miRNAs com RPM (*Reads* por Milhões) de 1 a 100 (laranja), 100 a 1000 (verde) e maiores que 1000 (azul).

Todos os miRNAs com diferenças em *foldchange* apresentaram RPM superior a 100, que são os miRNAs de maior expressão, sugerindo função importante na regulação gênica durante a cinética de infecção.

Com os 49 miRNAs diferencialmente expressos foi realizado a clusterização pelo padrão de expressão de cada miRNA ao longo da infecção (conforme o gráfico de *Heatmap* na Figura 27).

Refazer heatmap

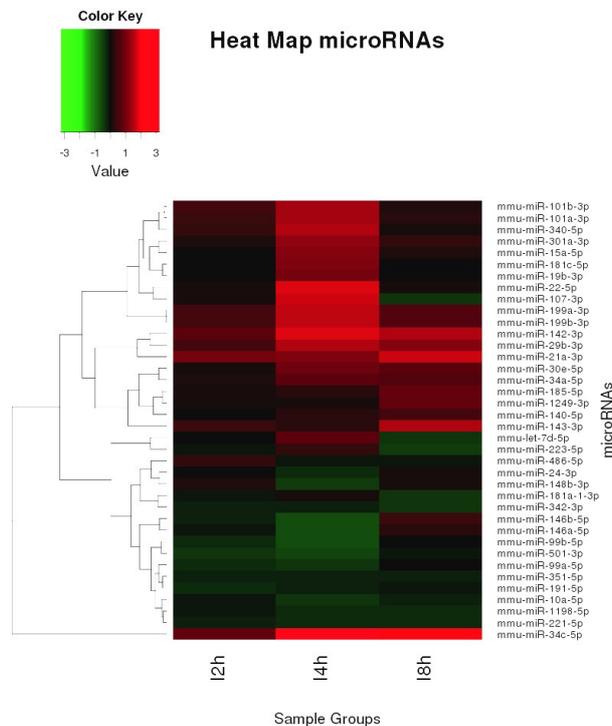


Figura 29 – *Heatmap* para os miRNAs nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a infecção. Calculado o z-score de cada miRNA na amostra infectada em relação a amostra não infectada.

O algoritmo de clusterização separou os miRNAs em dois grupos evidentes, representando os miRNAs regulados positivamente (em vermelho) ou negativamente (em verde) nos macrófagos infectados em relação aos controles em um ou mais tempos de infecção. Os três miRNAs em comum nos três tempos de infecção e com expressão positiva foram mmu-miR-34c-5p, mmu-miR-21a-3p e mmu-miR-142-3p. A expressão destes miRNAs mostrou-se consistentemente positiva ao longo da infecção (Figura 28).

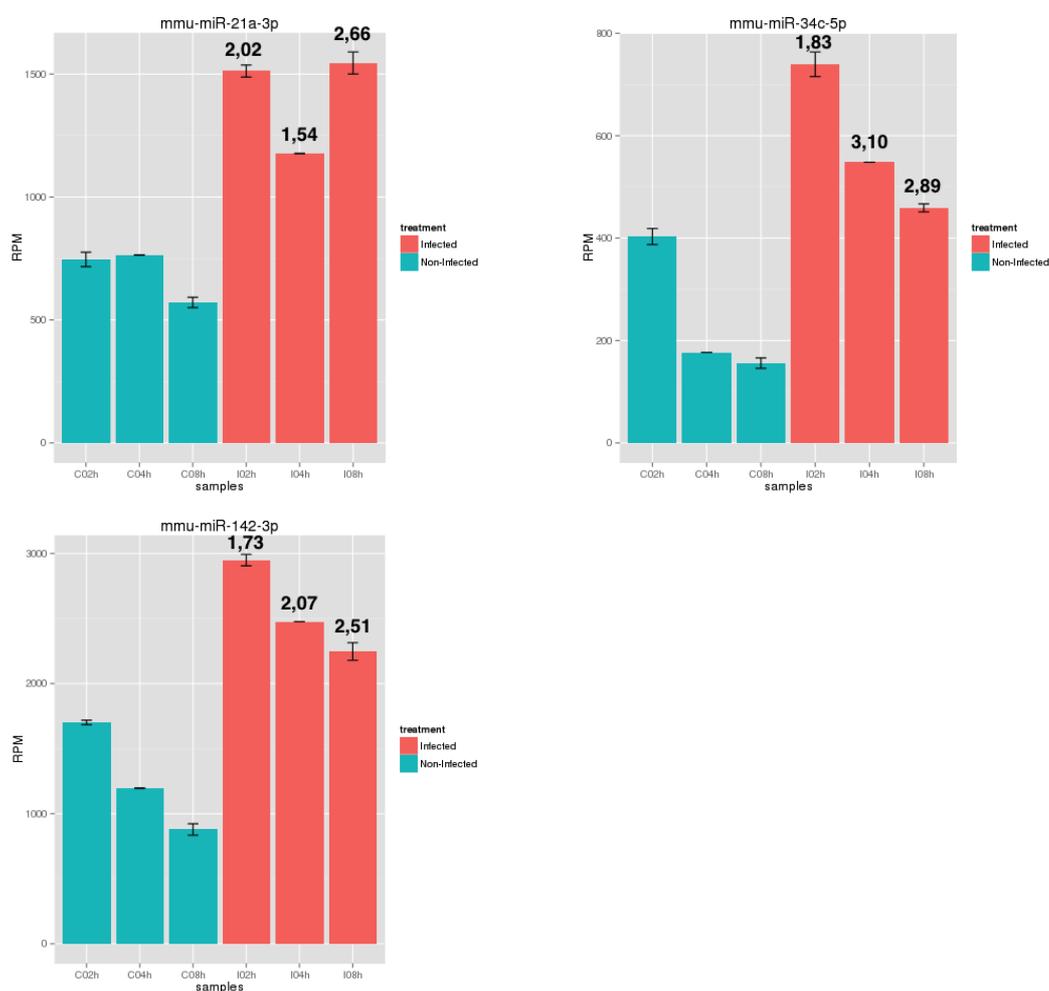


Figura 30 – Gráfico de RPM dos miRNAs mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-34c-5p e mmu-miR-142-3p. Em azul as bibliotecas não infectadas e em vermelho as bibliotecas infectadas. A normalização seguiu a equação 2. Acima de cada barra possui o número de foldchange da biblioteca infectadas em relação a não infectadas

Tabela 3 – MicroRNAs diferencialmente expressos pelo critério de foldChange para seleção.

microRNAs	Tempos de Infecção	Expressão	FoldChange
miR-451a	2h	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	4h	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	
miR-34c-5p	8h	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

5.2.2.2 Seleção dos microRNAs diferencialmente expressos pela distribuição gaussiana do *Foldchange*

A seleção dos microRNAs diferencialmente expressos apenas pelo critério de *foldchange* possui algumas limitações como, o valor de *foldchange* não leva em consideração a expressão dos microRNAs nas amostras infectadas ou não infectadas. Dessa maneira, microRNAs com média de expressão baixa entre as amostras podem gerar valores de *foldchange* elevados. Por isso eliminamos os microRNAs com expressão inferior a 100 *reads* e aumentar a probabilidade da seleção de microRNAs com relevância biológica. No entanto, essa escolha é arbitrária e não temos uma significância estatística associada a escolha do número de *reads* para corte e dos microRNAs diferencialmente expressos. Para diminuir a arbitrariedade da escolha do número de *reads* para corte, avaliamos a expressão normalizada acumulada dos microRNAs e consideramos somente aqueles microRNAs com expressão acima de 1% do total acumulado (Figura X). Observamos que 1/3 dos microRNAs expressos nas bibliotecas possui expressão menor que 1% do total representado. Este resultado indica que estes microRNAs estão em uma região de flutuação de expressão.

Não infectado

Infectado

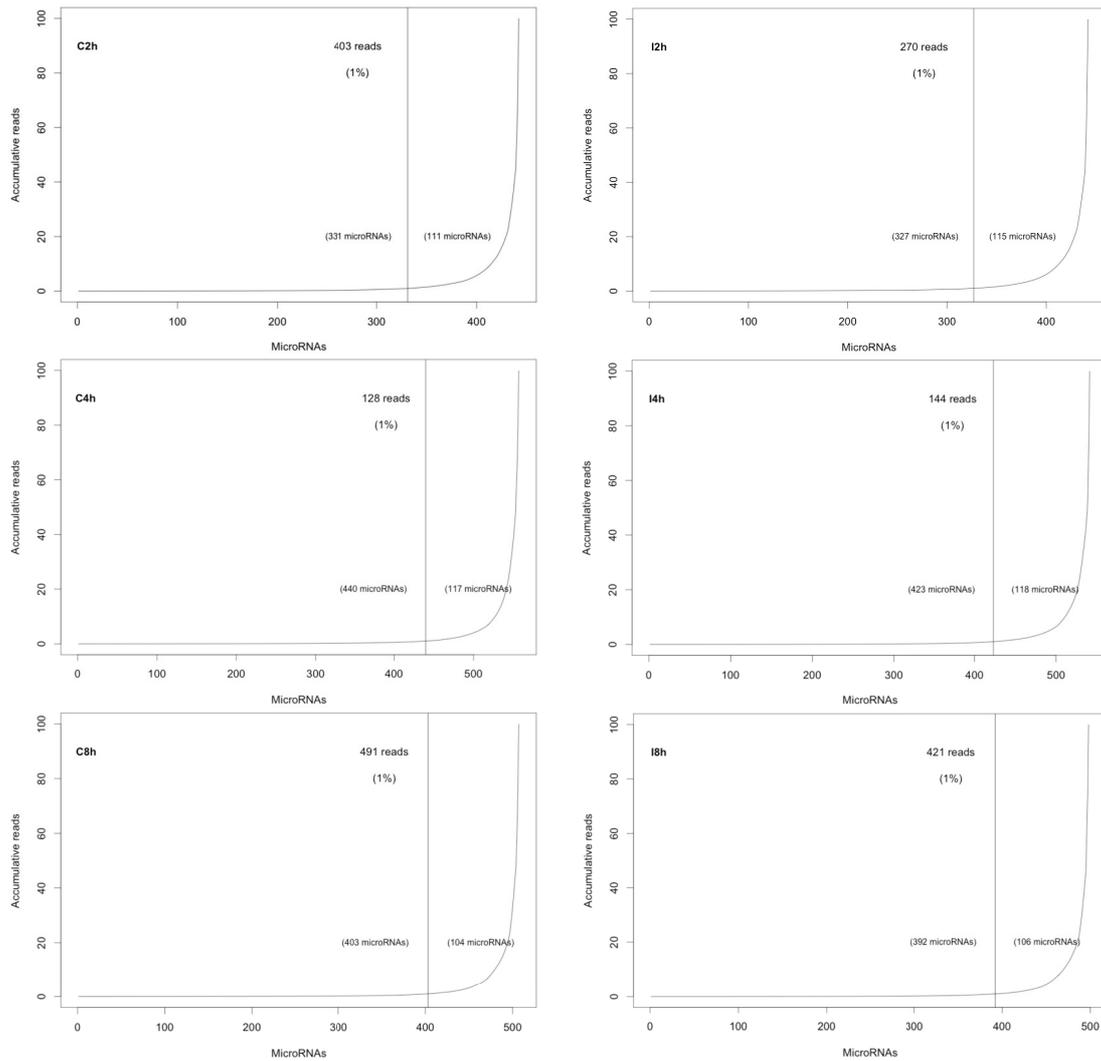


Figura X – Curva da expressão acumulada dos microRNAs expressos nos tempos 2, 4 e 8 horas após infecção.

No tempo de 2 horas após infecção observamos que dos 442 e 442 microRNAs apenas 111 (25%) e 115 (26%) microRNAs foram expressos acima do 1% acumulado e que a expressão mínima encontrada foi de 403 e 270 *reads* para as amostras não infectadas e infectadas, respectivamente. Da mesma maneira, no tempo de 4 horas após infecção observamos que dos 557 e 541 microRNAs apenas 117 (21%) e 118 (21%) microRNAs foram expressos acima do 1% acumulado e que a expressão mínima encontrada foi de 128 e 144 *reads* para as amostras não infectadas e infectadas, respectivamente. Por fim, no tempo de 8 horas após infecção observamos que dos 507 e 498 microRNAs apenas 104 (20%) e 106 (21%) microRNAs foram expressos acima do 1% acumulado e que a expressão mínima encontrada foi de 491 e 421 *reads* para as amostras não infectadas e infectadas, respectivamente.

Tabela 4 – Pré-seleção dos microRNAs pela flutuação da expressão.

Amostras	Total microRNAs	Total microRNAs	Valor mínimo de <i>reads</i> para corte
	expressos	remanescentes	
2h (NI)	442	111 (25,11%)	403
2h (I)	442	115 (26,02%)	270
4h (NI)	557	117 (21,01%)	128
4h (I)	541	118 (21,81%)	144
8h (NI)	507	104 (20,51%)	491
8h (I)	498	106 (21,29%)	421

(NI) Amostra Não Infectada; (I) Amostra Infectada.

Para identificar os microRNAs diferencialmente expressos, normalizamos a expressão dos microRNAs remanescentes em relação ao total mapeado nos microRNAs e calculamos a razão entre a expressão do microRNA na amostra infectada pela amostra não infectada. Definimos pela distribuição gaussiana dos valores de *foldchange*, os microRNAs expressos positivamente e negativamente considerando significância $p\text{-valor} \leq 5\%$. No tempo de 2 horas após infecção obtivemos 3 microRNAs regulados positivamente e 1 microRNA regulado negativamente. No tempo 4 horas após infecção obtivemos 1 microRNAs regulados positivamente e 6 microRNAs regulados negativamente. No tempo de 8 horas após infecção obtivemos 5 microRNAs regulados positivamente e 1 microRNAs regulados negativamente (Tabela 5). **Diagrama venn** A Figura 5 ilustra graficamente a expressão dos microRNAs e os diferencialmente expressos indicados em vermelho para positivamente e verde para negativamente por análise de distribuição dos valores de *foldchange*.

Tabela 5 – MicroRNAs diferencialmente expressos pelo critério de foldChange para seleção.

MicroRNAs	Tempo de Infecção	Expressão	Foldchange	Pvalor
miR-501-3p	2 horas	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 horas	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 horas	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

5.2.2.3 Seleção dos microRNAs diferencialmente expressos pela distribuição da dispersão das *features* representadas pela ferramenta DESeq2

Não métodos anteriores para determinação dos microRNAs diferencialmente expressos observamos que se considerarmos apenas o critério do *foldchange* encontramos 49 microRNAs com expressão diferencial e quando removemos os microRNAs com flutuação de expressão em adição com a distribuição gaussiana dos valores de *foldchange* encontramos 13 microRNAs com expressão diferencial. No entanto, mesmo no critério para remover os microRNAs com flutuação na expressão o limite do número de *reads* para determinar o corte (1% na curva acumulada) foi determinado arbitrariamente.

Optamos por utilizar a ferramenta DESeq2 para a normalização e cálculo dos microRNAs diferencialmente expressos baseado na distribuição binomial negativa. A ferramenta DESeq2 requer réplicas biológicas para determinar a dispersão entre as réplicas e determinar o valor de significância para a diferença encontrada entre as amostras. No entanto, DESeq2 possui funções específicas para tratamento de amostras sem réplica biológica o qual leva em consideração a dispersão na biblioteca inteira invés das réplicas de cada gene. Uma característica interessante nos dados de sequenciamento em larga escala onde não é observado uma diferença evidente quando analisado os dados globalmente, e DESeq2 faz uso dessa característica para calcular a dispersão dos genes e determinar a significância estatística quando a expressão de um gene possui a tendência de expressão diferencial. Contudo, para determinar a diferença de expressão dos microRNAs é necessário utilizar a dispersão da biblioteca inteira com as outras *features* (Figura X).

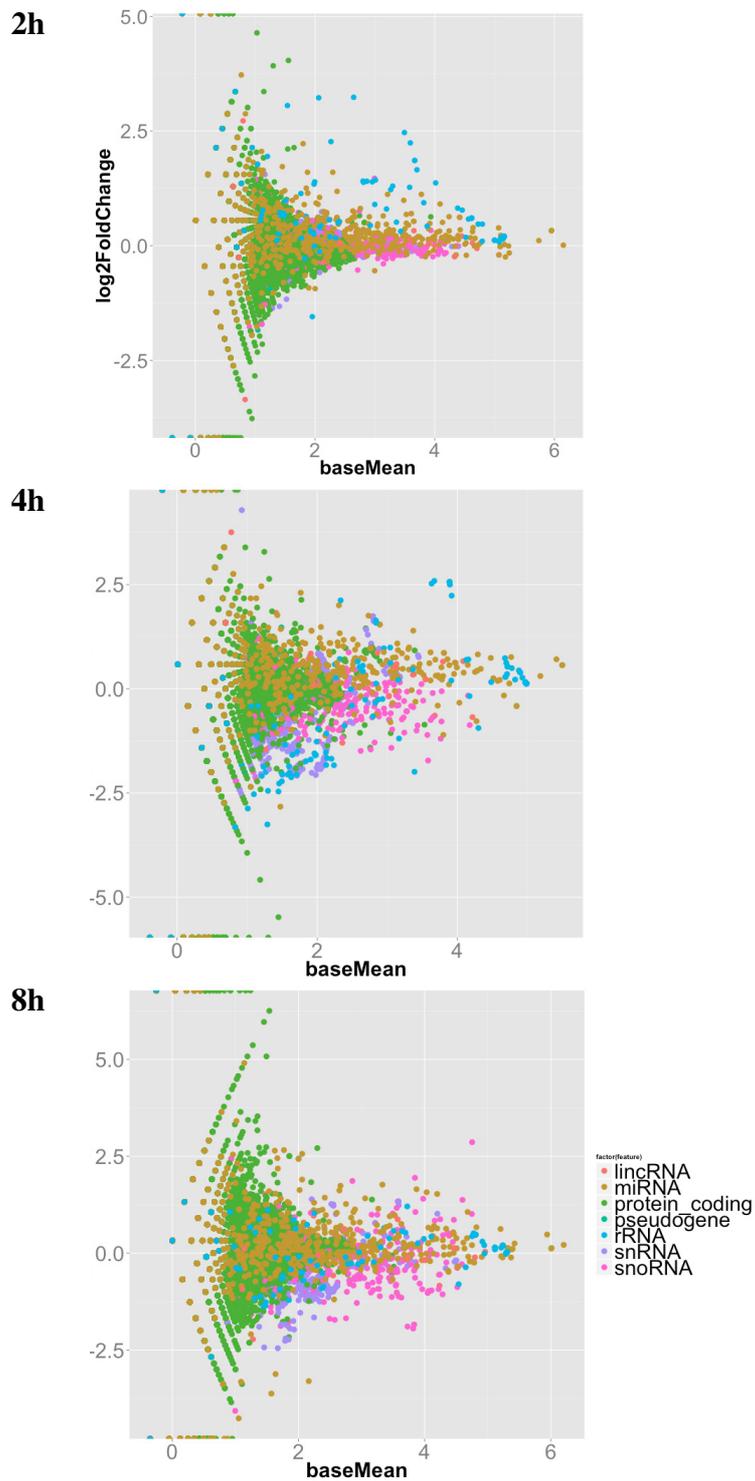


Figura X – Análise da dispersão das features representadas na bibliotecas 2, 4 e 8 hora após a infecção e definição dos microRNAs diferencialmente expressos.

Com o método do DESeq2 para amostras sem replica biológica encontramos 18 microRNAs diferencialmente expressos ao longo da infecção. No tempo de 2 horas foram 2 microRNAs expressos positivamente, no tempo de 4 horas foram 3

microRNAs expressos positivamente e no tempo de 8 horas foram 14 microRNAs expressos positivamente e 2 microRNAs expressos negativamente (Figura W).

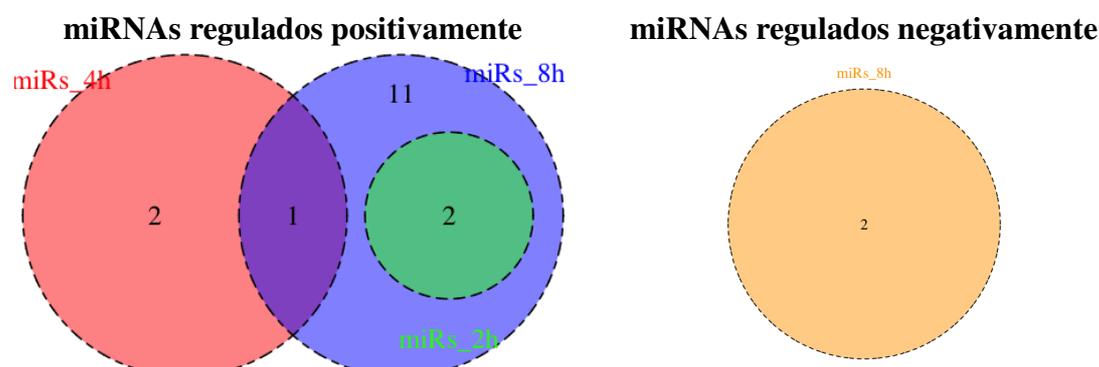


Figura W – Diagrama de venn dos microRNAs diferencialmente expressos com expressão positiva e negativa.

Tabela 6 – MicroRNAs diferencialmente expressos pelo critério de DESeq2 para seleção.

miRNAs	Tempos de Infecção	Expressão	FoldChange	Pvalue
miR-34b-5p*	2 horas	Positiva	3,03	0.041
miR-29b-3p*		Positiva	1,57	0.048
miR-338-5p	4 horas	Positiva	4,00	0.032
miR-451a		Positiva	4,92	0.047
miR-34c-5p**		Positiva	3,36	0.038
miR-34c-5p**		Positiva	3,43	0.013
miR-193a-3p	8 horas	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

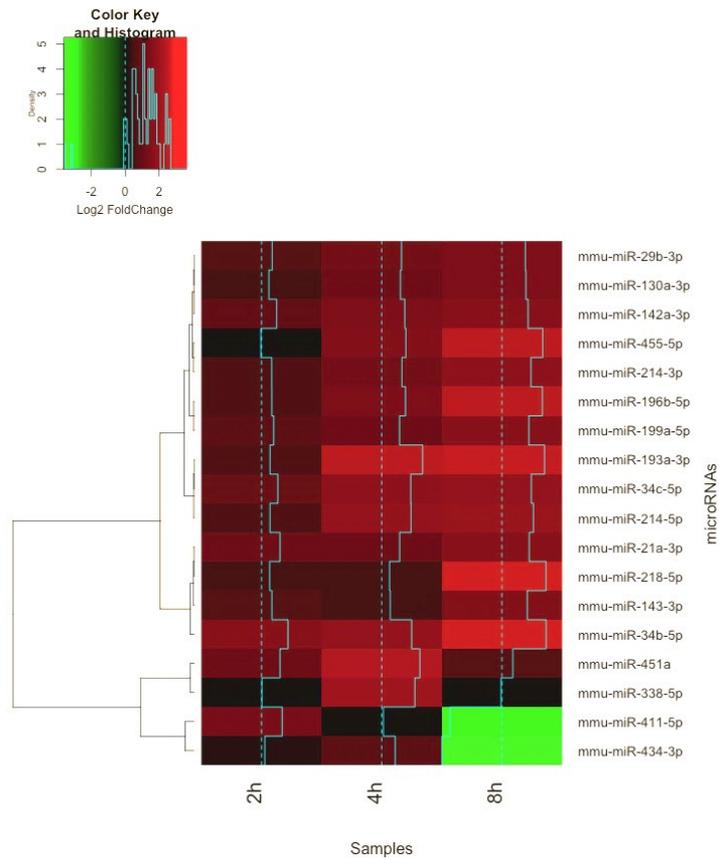


Figura E – Heatmap dos microRNAs diferencialmente expressos ao longo da infecção nos tempos 2, 4 e 8 horas.

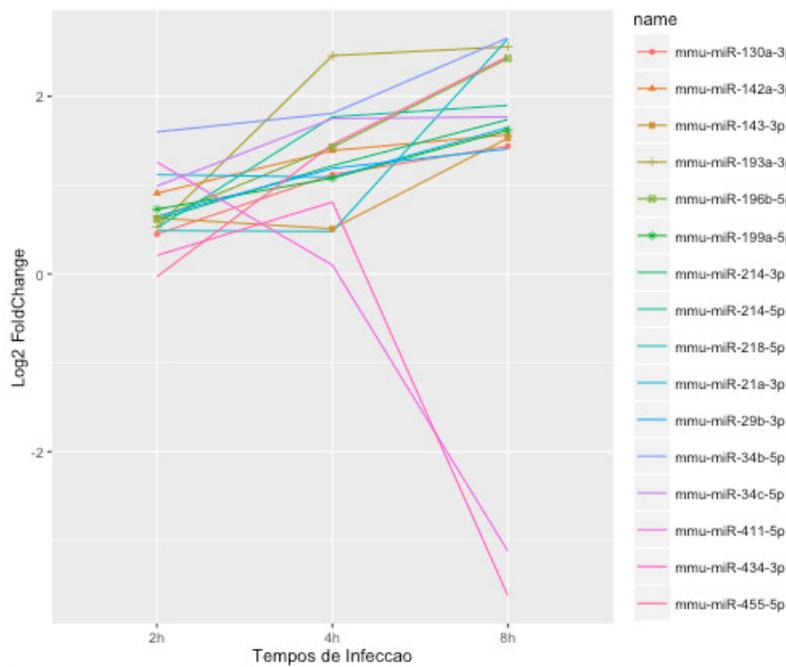


Figura Z – Perfil de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos

5.2.3 Busca por alvos preditos e validados para os microRNAs diferencialmente expressos

Para determinar a função dos 18 microRNAs diferencialmente expressos realizamos a predição de 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). A tabela 7 contem os alvos preditos para microRNA pela ferramenta TargetScan onde leva em consideração a associação da seed do microRNA com a região 3' UTR dos alvos candidatos e contem os alvos validados depositados na base de dados StarBase onde foi realizado a imunoprecipitação da proteína Argonaute e sequenciado os RNAs contidos no complexo RISC, e detectado a presença de microRNAs em conjunto com possíveis alvos.

Tabela 7 – Busca por alvos para os microRNAs diferencialmente expressos.

microRNAs	Alvos preditos (TargetScan*)	Alvos validados (StarBase**)
miR-130a-3p	799	651
miR-142a-3p	307	-
miR-143-3p	431	213
miR-193a-3p	233	99
miR-196b-5p	310	254
miR-199a-5p	516	250
miR-214-3p	6691	453
miR-214-5p	187	-
miR-218-5p	958	252
miR-21a-3p	5452	-
miR-29b-3p	1051	532
miR-338-5p	4519	-
miR-34b-5p	666	369
miR-34c-5p	666	417
miR-411-5p	95	141
miR-434-3p	3806	-
miR-451a	24	66
miR-455-5p	226	-

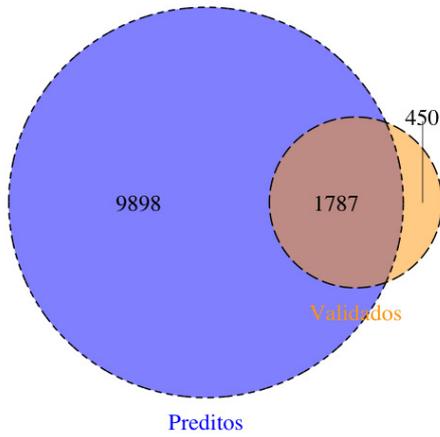
*TargetScan versão 7.1 disponibilizada em Janeiro de 2016;

**StarBase versão 2.0 disponibilizada em Setembro de 2013.

A figura abaixo mostra que a grande maioria dos alvos validados estão contidos nos alvos preditos para os microRNAs regulado positivamente. Resultado interessante que indica que os genes encontrados na base de dados de alvos validados é mais específico do que os alvos preditos. Podemos observar pela quantidade de

alvos preditos em relação aos validados. Além do mais, a predição é dada apenas complementariedade da *seed* do microRNA e 3 UTR dos genes, o que leva a uma quantidade expressiva de genes alvos candidatos preditos. Entretanto, não observamos o mesmo fenômeno com os alvos para os microRNAs regulados negativamente. Possivelmente a interação entre os alvos e os microRNAs regulados negativamente é menos abundante do que os microRNAs regulados positivamente e por isso não observamos uma sobreposição significativa entre alvos preditos e validados.

Alvos para microRNAs regulados positivamente



Alvos para microRNAs regulados negativamente

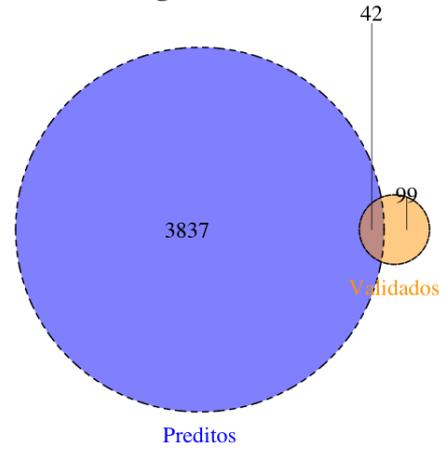


Figura X – Diagrama de venn para os genes alvos preditos e validados para os microRNAs expressos diferencialmente

Figura com a representação de alvos preditos e validados para cada microRNA diferencialmente expressos.

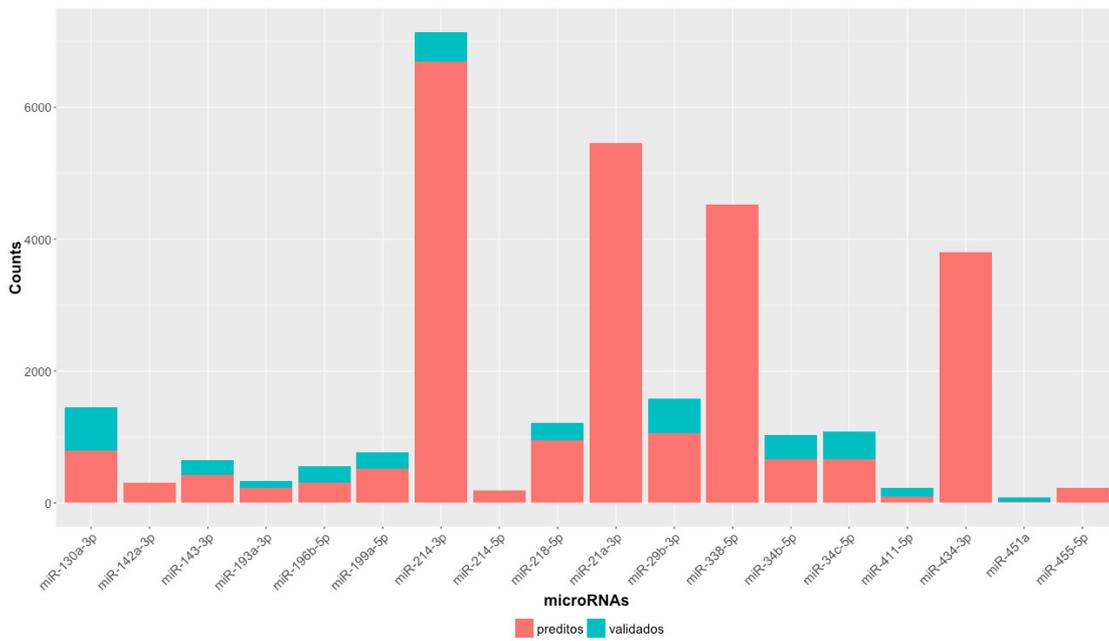
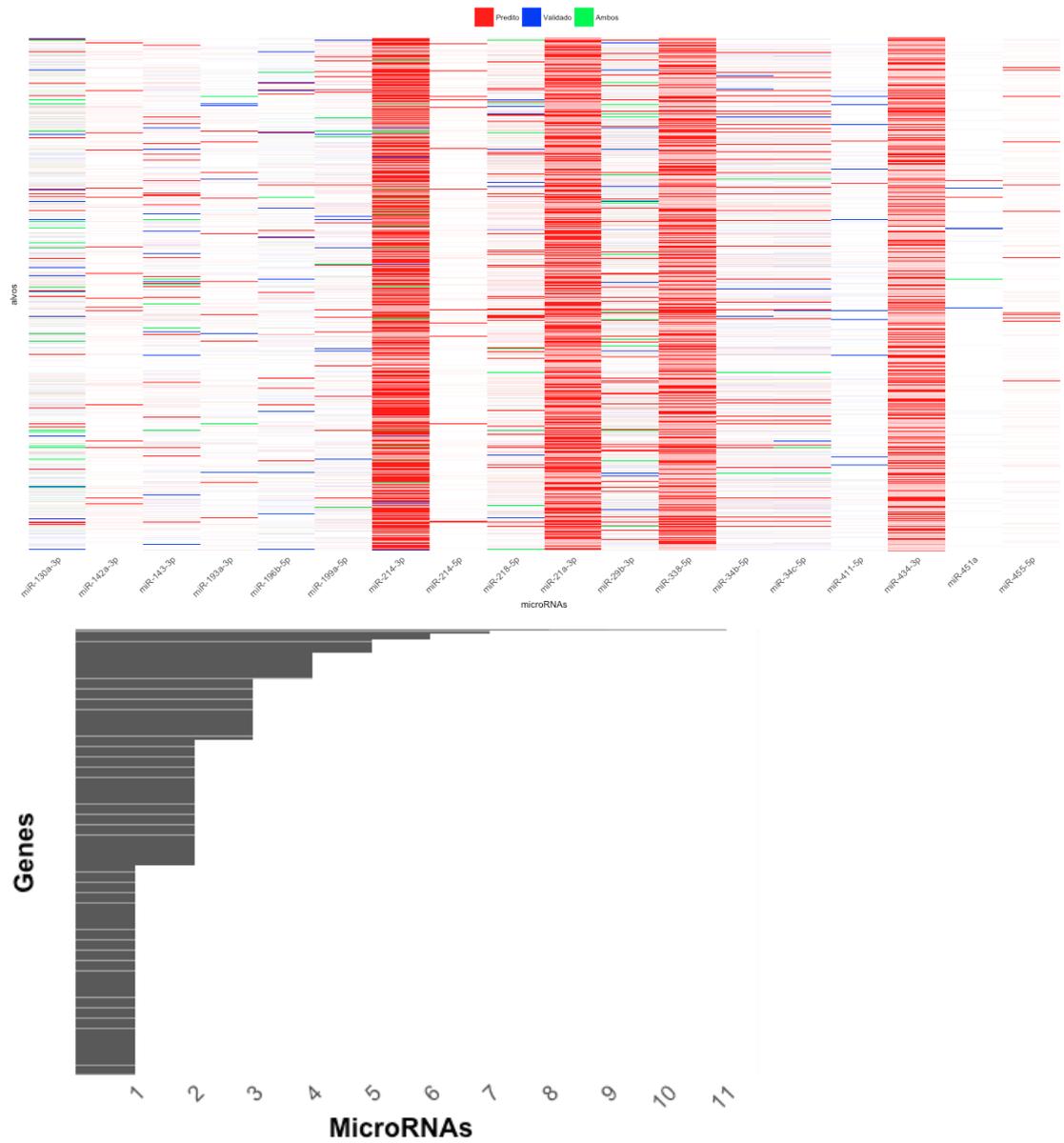


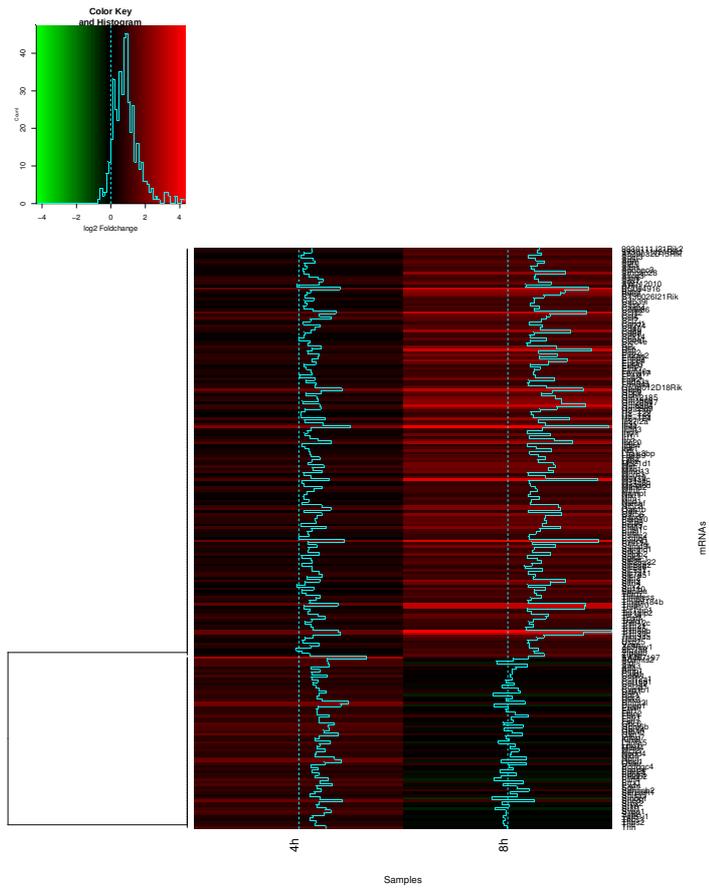
Figura X – Representação dos alvos preditos e validados para os microRNAs diferencialmente expressos

Figura ilustrando alvos preditos, validados ou detectado em ambos vs os microRNAs. Mostrando a rede complexa de regulação mRNA::miRNA, onde um ou mais miRNA pode regular o mesmo mRNA e vice-versa.

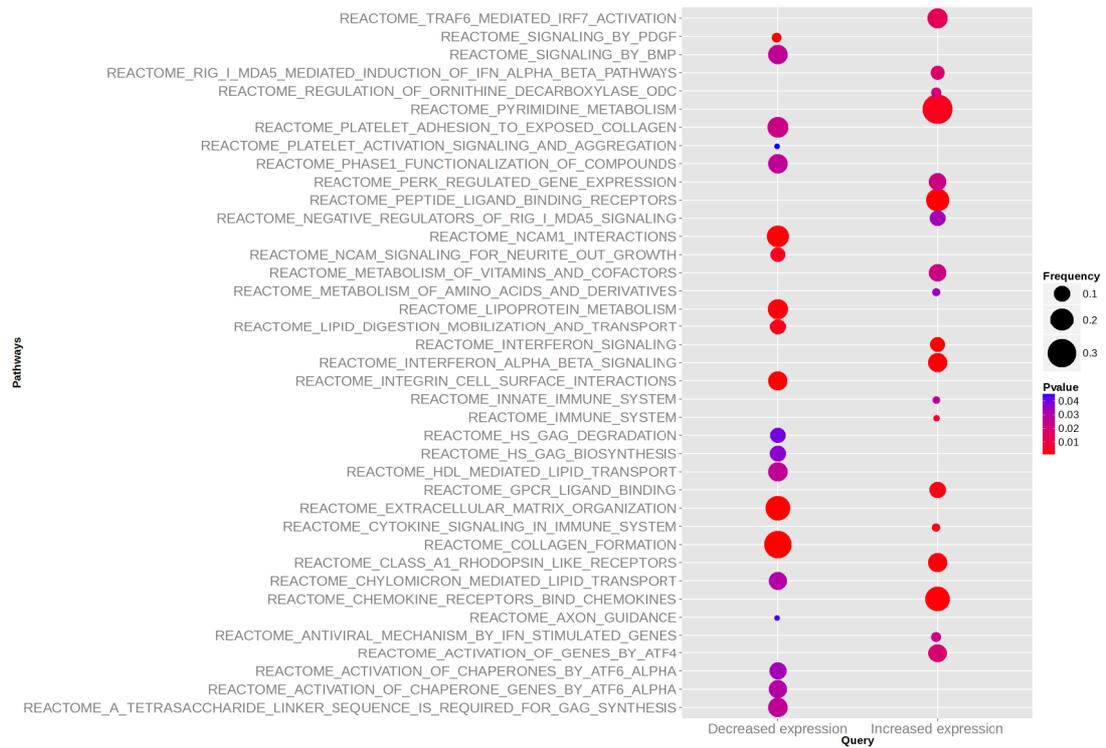
Refazer figura com fontes maiores



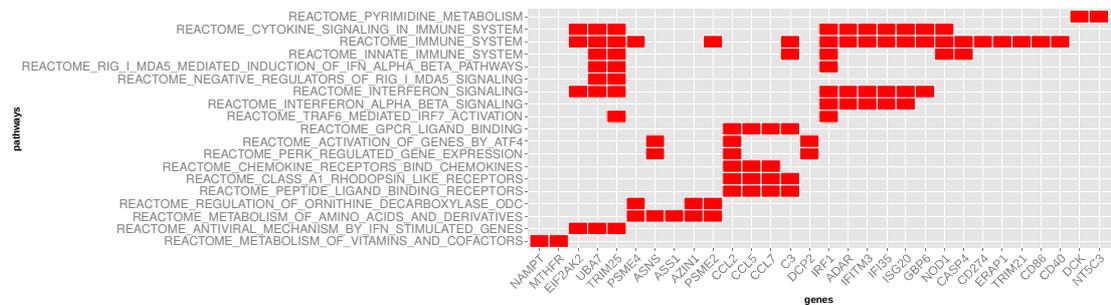
Heatmap dos genes DE no transcriptoma



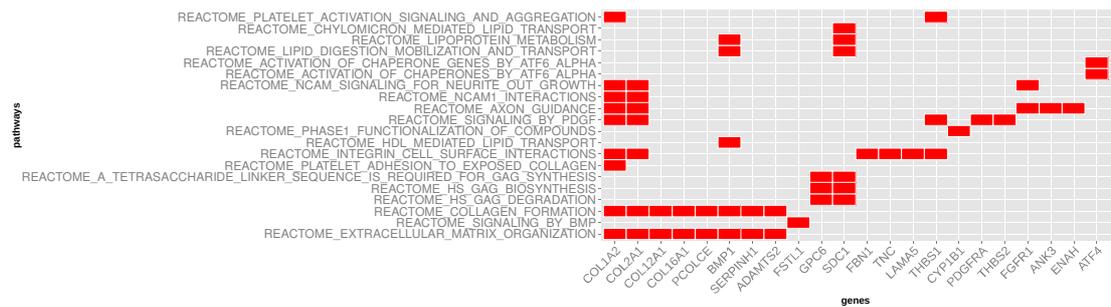
Análise de enriquecimento para os genes expressos positivamente, para o grupo que aumenta a expressão em 8h e para o grupo que diminui a expressão em 8h.



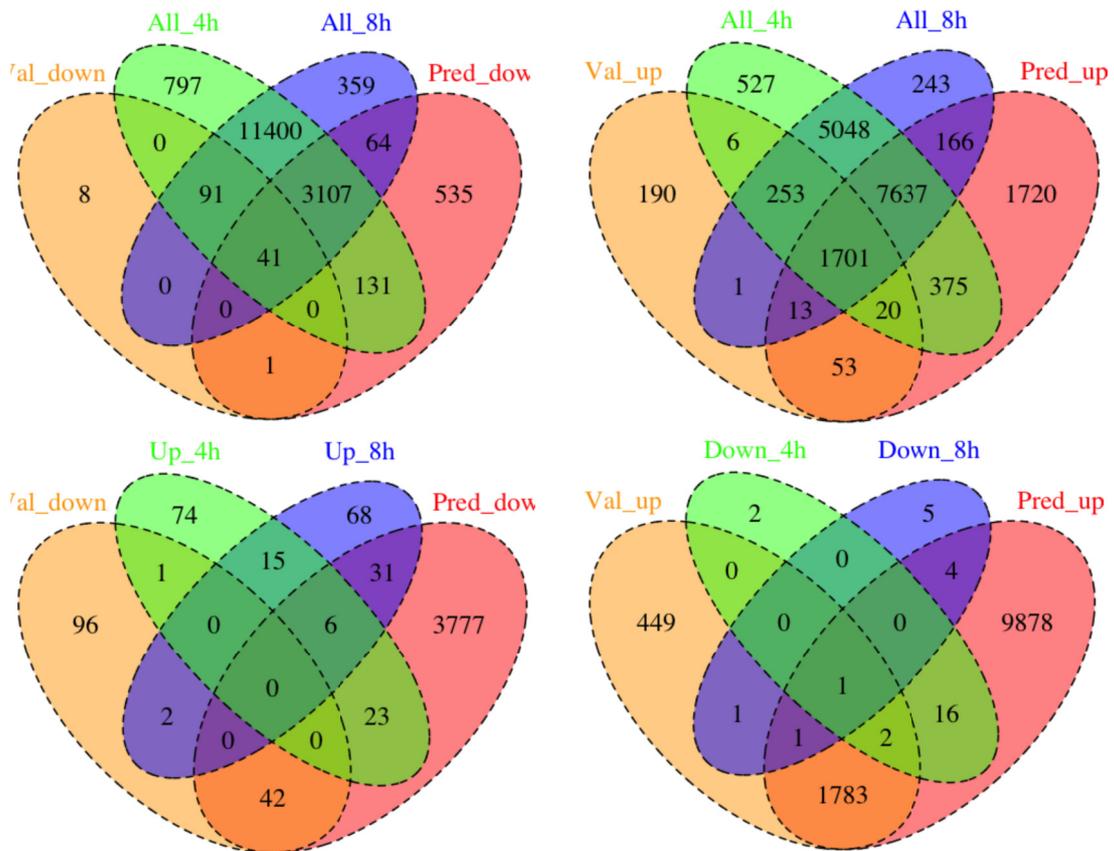
Grupo que aumenta a expressão em 8h



Grupo que diminui a expressão em 8h



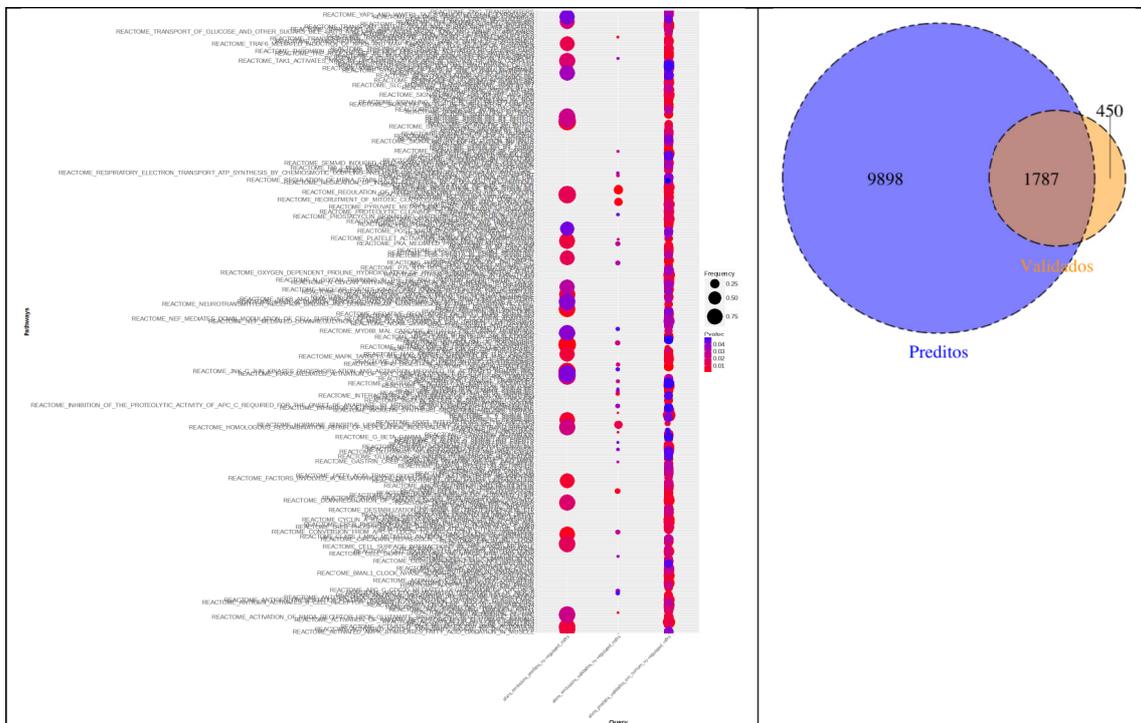
Comparação dos alvos preditos validados e mRNAs expressos no transcriptoma e mRNAs DE.



5.2.5 Análise enriquecimento dos alvos preditos/validados e mRNAs expressos no transcriptoma

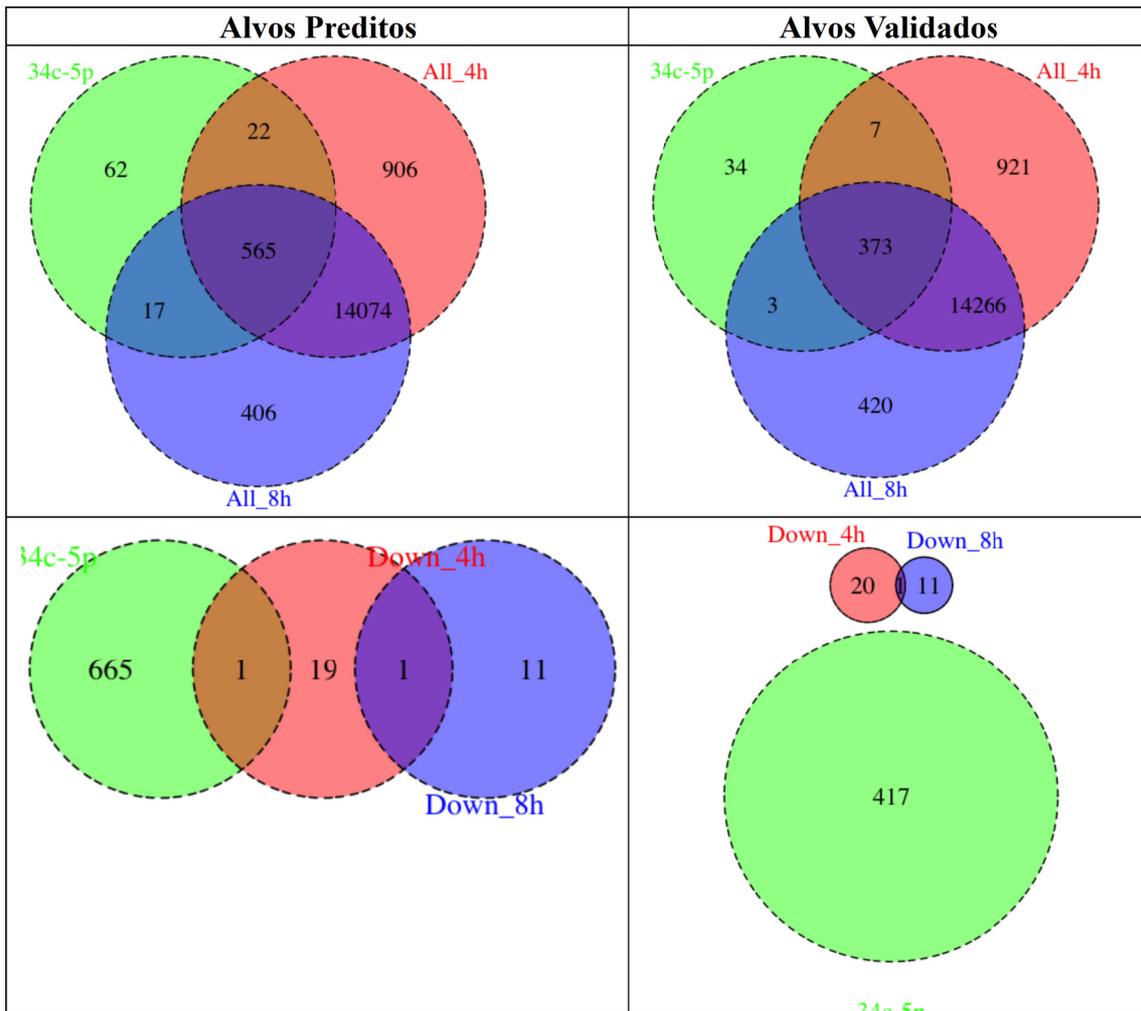
Enriquecimento para os alvos exclusivamente preditos, exclusivamente validados e em ambos dos microRNAs regulados positivamente.

Melhorar fonte e/ou representação do enriquecimento



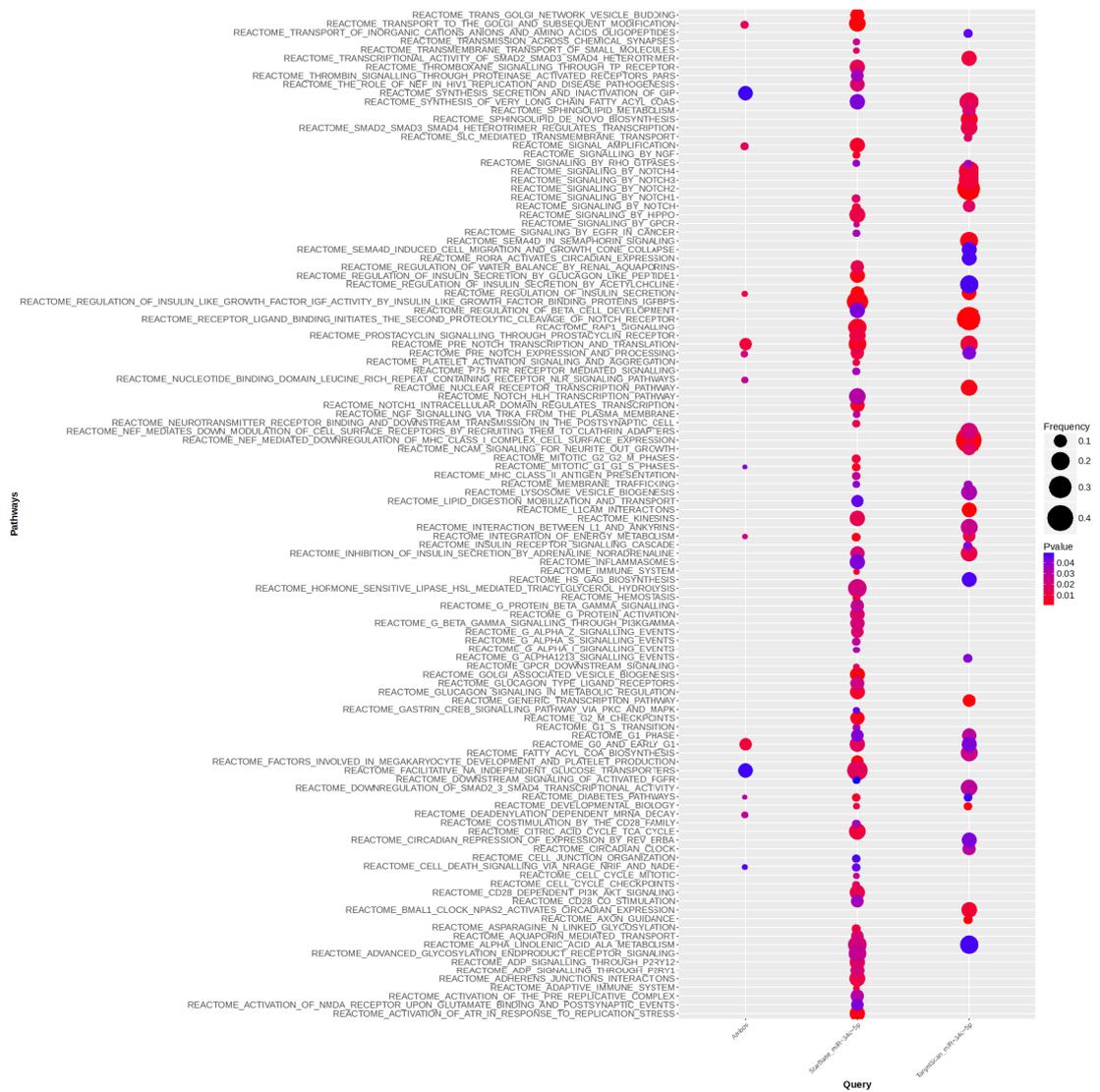
Enriquecimento para os alvos exclusivamente preditos, exclusivamente validados e em ambos dos microRNAs regulados negativamente.

Melhorar fonte e/ou representação do enriquecimento



Enriquecimento para os genes alvos preditos, validados e em ambos expressos no transcriptoma

Melhorar o gráfico



Colocar aqui as vias selecionadas para estudo relacionadas com a infecção e talvez colocar as vias que desenhei no Illustrator.

6 Perspectivas

- Analisar a expressão de mRNA alvos preditos durante a cinética da infecção por *T. cruzi*;
- Avaliação funcional dos 3 miRNAs diferencialmente expressos utilizando oligo antagomirs para diminuir sua expressão em macrófagos e avaliar parâmetros da infecção, como o percentual de infecção, a taxa de crescimento do parasito, a produção de citocinas, a expressão de mRNAs alvos, entre outros;
- Avaliar a expressão dos microRNAs diferencialmente expressos em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos KO TLR9.

7 Bibliografia

AZIMZADEH, J. S.; A., M.-N. RNAi pathway integration in *Caenorhabditis elegans* development. **Functional & integrative genomics**, v. 11, n. 3, p. 389-405, 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p. 281-297, 2004.

_____. 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. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1504-14, Aug 24 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385631> >.

BELLON, M. et al. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. **Blood**, v. 113, n. 20, p. 4914–4917, 2009.

BETTENCOURT, P. et al. Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells: the case of *N-Wasp* and miR-142-3p. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 19, 2013. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760605> >.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014. ISSN 1776-1042 (Electronic) 1252-607X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626257> >.

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. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583285> >.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857– 866, 2006.

CARECCIA, S. et al. A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. **Oncogene**, v. 28, n. 45, p. 4034-40, 2009.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642– 55, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze 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. **Mol Cell**, v. 26, n. 5, p. 745-752, 2007.

Disponível em: < [http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765\(07\)00310-3](http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765(07)00310-3) >. Acesso em: 2014/07/08.

CHU, C. Y.; RANA, T. M. Small RNAs: regulators and guardians of the genome.

Journal of cellular physiology, v. 213, n. 2, p. 412-9, 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, 2007.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, 2010.

CZECH, A. et al. Reversible and rapid transfer-RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress. **PLoS Genet**, v. 9, n. 8, p. e1003767, Aug 2013.

ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009533> >.

DAS, A. et al. Engulfment of apoptotic cells by macrophages. A role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. **J. Immunol.**, v. 192, n. 3, p. 1120 – 1129, 2014.

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

FEJZO, M. S. et al. Amplification Target ADRM1: Role as an Oncogene and Therapeutic Target for Ovarian Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3094-109, 2013.

ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377018> >.

FRANZÉN, O. et al. The Short Non-Coding Transcriptome of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1-11, 2011.

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. **Mol Biochem Parasitol**, v. 171, n. 2, p. 64-73, Jun 2010. ISSN 1872-9428 (Electronic)

0166-6851 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156490> >.

GARCIA-ZEPEDA, E. A. et al. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 12, p. 679-84, Dec 2007. ISSN 0141-9838 (Print)

0141-9838 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042174> >.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 895-906, Dec 2006. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110955> >.

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. 277-88, Mar 13 2013. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498953> >.

GORDILLO, G. M. et al. Dicer knockdown inhibits endothelial cell tumor growth via microRNA 21a-3p targeting of Nox-4. **J Biol Chem**, v. 289, n. 13, p. 9027-38, Mar 28 2014. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497637> >.

GRIMSON, A. et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Mol Cell**, v. 27, n. 1, p. 91-105, Jul 6 2007. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612493> >.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, p. 835-840, 2010.

HALIC, M.; MOAZED, D. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 504-16, Feb 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178743> >.

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, Mar 2013. ISSN 1872-9428 (Electronic) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415751> >.

HANNON, G. J.; ROSSI, J. 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. 673-95, Apr 2010. ISSN 1469-9001 (Electronic) 1355-8382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181738> >.

HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, n. 7148, 2007.

HERMEKING, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2010. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461653> >.

IVANOV, P. et al. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. **Mol Cell**, v. 43, n. 4, p. 613-23, Aug 19 2011. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855800> >.

JANOWSKI, B. A. et al. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 13, n. 9, p. 1545-9993, 2006.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS Biol**, v. 2, n. 11, p. e363, Nov 2004. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502875> >.

JONES, E. M. et al. Amplification of Trypanosoma Cruzi DNA Sequence from Inflammatory Lesions in Human Chagasic Cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, p. 348-357, 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, p. e29, 2010. ISSN 1462-3994 (Electronic) 1462-3994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840799> >.

KERTESZ, M. et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 10, p. 1278-84, 2007.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship Between Trypanosoma cruzi and Human Chagasic Megaesophagus: Blood and Tissue Parasitism. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 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. ISSN 1465-6914 (Electronic) 1465-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261174> >.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans hetero- chronic 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 Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2478, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098824> >.

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 14 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477> >.

LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, 2010.

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, 2014.

MANQUE, P. A. et al. Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1855-62, May 2011. ISSN 1098-5522 (Electronic) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343357> >.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, 2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309180> >.

PEREIRA, M. C. S.; SINGER, R. H.; MEIRELLES, M. N. S. L. Trypanosoma cruzi Infection Affects Actin mRNA Regulation in Heart Muscle Cells. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, n. 3, p. 271-279, 200.

QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 841-2, Mar 15 2010. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20110278> >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101-8, Mar 6 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339568> >.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060061X> >.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, p. 901-906, 2000.

ROY, S. et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction. miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. **Cardiovasc. Res.**, v. 82, n. 1, p. 21-29, 2009.

SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **J Pharm Sci**, v. 101, n. 3, p. 888-94, Mar 2012. ISSN 1520-6017 (Electronic) 0022-3549 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22161779> >.

SHABALINA, S. A.; KOONIN, E. V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. **Trends Ecol. Evol.**, v. 23, n. 10, p. 578-87, 2008.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4862, 1995.

SOBALA, A.; HUTVAGNER, G. Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 2, n. 6, p. 853-62, Nov-Dec 2011. ISSN 1757-7012 (Electronic) 1757-7004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976287> >.

THOMPSON, D. M.; PARKER, R. Stressing out over tRNA cleavage. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 215-9, Jul 23 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632169> >.

ULLU, E. et al. RNA interference: advances and questions. **Biological sciences**, v. 357, n. 1417, p. 65-70, 2002.

VAGO, A. R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891-892, 1996.

VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.

WANG, J. et al. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. 77-83, 2013.

WANG, X. S. et al. MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 21, p. 4992-5004, 2012.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular Mechanisms of RNA Interference. **Annu. Rev. Biophys.**, v. 42, p. 217-39, 2013.

XU, X. et al. Hypoxia induces downregulation of soluble guanylyl cyclase beta1 by miR-34c-5p. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 24, p. 6117-26, Dec 15 2012. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23038777> >.

YANG, X. et al. A possible connection between adhesion regulating molecule 1 overexpression and nuclear factor kappa B activity in hepatocarcinogenesis. **Oncol Rep**, v. 28, n. 1, p. 283-90, Jul 2012. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22576803> >.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

ZHANG, B.; KIROV, S. A.; SNOODY, J. R. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Web Server issue, p. 741-748, 2005.