



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

QEREN HAPUK RODRIGUES FERREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES INDUZIDOS
DURANTE A INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* ATRAVÉS
DE METANÁLISE DE *MICROARRAYS***

Vitória da Conquista, BA

2017

QEREN HAPUK RODRIGUES FERREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES INDUZIDOS
DURANTE A INFECÇÃO POR *trypanosoma cruzi* ATRAVÉS
DE METANÁLISE DE *MICROARRAYS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martins de Freitas
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

A minha família, pelo amor e apoio incondicional, que foram fundamentais para que eu alcançasse mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado esse sonho, me capacitado, e me permitido alcançá-lo, por ter me dado paz e esperança em meio as dificuldades. E ainda por ter colocado pessoas tão generosas no meu caminho para que tudo se realizasse.

Ao meu orientador Leandro, pelo apoio, confiança e paciência em me ensinar. Um exemplo de profissional, com um caráter imensurável, que me ensinou que para pesquisar é necessário coragem e persistência para alcançar êxito.

Aos meus colegas do GeneBio, pelo conhecimento compartilhado, o qual enriqueceram grandemente a minha vida profissional e acadêmica. Guardo todos os ensinamentos e momentos com muito carinho.

Aos colegas e professores da UFBA pelo aprendizado e vivência, especialmente os professores Bruno Bastos e Silvana Silveira, pelo grande desprendimento em contribuir com ensinamentos que sempre foram muito valiosos.

Aos meus pais Jornelino e Cristiane, que foram indispensáveis para que eu concretizasse esse sonho. Sempre acreditaram em mim, muitas vezes mais do que eu mesma e nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu esposo Warlens, pelo seu imenso apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Por sua capacidade de me fazer rir e me trazer paz nos momentos de angústia, e por tornar os meus sonhos, os dele.

À minha irmã Qesya pelo apoio que só uma irmã pode oferecer, e pelos momentos de descontração que me fizeram mais forte. Aos meus avós Louro, Lígia e Joaquim, pelo carinho e incentivo, que com certeza suavizaram a minha caminhada.

À minha família e amigos, os que estão perto e distante, pelo incentivo, carinho e orações, a torcida de cada um me deu ânimo durante a jornada.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

FERREIRA, Q. H. R. **Análise da Expressão dos Genes Induzidos Durante a Infecção por *Trypanosoma cruzi* Através de Metanálise de Microarrays.** 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada que ainda infecta milhões de pessoas na América Latina. Mesmo após tantos anos de descoberta, muito ainda não se sabe sobre o desenvolvimento da patologia, a interação feita pelo protozoário com as células hospedeiras e as respostas imunológicas geradas durante esse processo. O estudo dos genes diferencialmente expressos e as vias que estes regulam positivamente ou negativamente durante esse processo pode auxiliar na confirmação dos dados já publicados na literatura. No presente estudo foi realizada uma metanálise com todos os dados de expressão gênica já depositados no banco de dados GEO/NCBI sobre a infecção por *T. cruzi* em camundongos, ratos e humanos. Os dados sobre DEG obtidos foram analisados através do STRINGDB usando o banco de dados KEGG. Foi possível observar novos indícios sobre a resposta do hospedeiro sobre a infecção por *T. cruzi*, indicando genes frequentemente superexpressos relacionados a inibição da ativação de células T, bloqueio da apoptose durante a infecção, através da liberação de NF- κ B, e impossibilidade da estimulação por interferon através da ação da proteína USP18, bem como sinais para ativação e diferenciação dos linfócitos Th CD4⁺ para uma resposta Th17. As vias do metabolismo foram vistas subexpressas, com possível comprometimento da produção de ATP. Esse trabalho permitiu a confirmação de dados que já estavam bem descritos na literatura, bem como informações recentes que estão sendo debatidas, o que pode levar a uma melhor compreensão da interação parasita hospedeiro e auxiliar na elucidação de algumas questões ainda em debate sobre a patogênese da doença de Chagas.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Expressão gênica. Metanálise.

FERREIRA, Q. H. R. **Analysis of Induced Genes Expression During *Trypanosoma cruzi* Infection Through Meta-analysis of *Microarrays*. 2017. Dissertation (Master in Biosciences)** – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and is considered a neglected disease that still infects millions of people in Latin America. So many years after the description of the disease much remains to be known about the development of the pathology, host-parasite interaction and the immune responses generated during this process. The study of the differentially expressed genes (DEG) and the pathways that these genes positively or negatively regulate during this process can help to confirmation data already published. Here, we performed a meta-analysis using gene expression data already deposited in the GEO/NCBI database on *T. cruzi* infection in mice, rats and humans. The DEG were analyzed through STRINGDB using the KEGG information. It was possible to observe new evidence on host response to *T. cruzi* infection indicating frequently overexpressed genes involved in inhibition of T cell activation, blockade of apoptosis during *T. cruzi* infection through NF- κ B release, and the impossibility of a stimulation by interferon through the action of the USP18. It was also possible to observe signals for activation and differentiation of CD4+ Th lymphocytes for a Th17 response. Metabolism pathways were downregulated, with possible impairment of ATP production. This work allowed the confirmation of data that were already well described in the literature, as well as new data and results being discussed, which may lead to a better understanding of the host-parasite interaction and to help elucidate some issues still under debate about the pathogenesis of Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Chagas Disease. Gene expression. Meta-analysis.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	166
2 REFERENCIAL TEORICO	19
2.1 Doença de Chagas	1919
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas características	200
2.3 Resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção por <i>T. cruzi</i>	222
2.4 Mecanismos de evasão do sistema imune pelo <i>T. cruzi</i> durante a infecção	227
2.5 Genes diferencialmente expressos em análises de <i>microarray</i> durante infecção por <i>T. cruzi</i>	311
2.6 A importância da metanálise.....	333
3 OBJETIVO.....	355
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	366
4.1 Recuperação das amostras dados de expressão gênica.....	36
4.2 Detecção de genes diferencialmente expressos.....	36
4.3 Vias enriquecidas com DEG	37
4.4 Metanálise	37
4.5 Indução da diferenciação dos linfócitos TCD4 ⁺	37
5 REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 1	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A mudança na quantidade de genes diferencialmente expressos ao longo da infecção	63
Figura 2	DEG mais frequentes durante infecção até 12hpi por <i>T. cruzi</i>	66
Figura 3	Genes diferencialmente expressos durante infecção 12hpi até 21dpi por <i>T. cruzi</i> .	68
Figura 4	Genes diferencialmente expressos durante toda a infecção por <i>T. cruzi</i>	69
Figura 5	Via JAK/STAT sendo ativada por citocinas durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	71
Figura 6	Via do NF- κ B sendo ativada pelo reconhecimento de proteínas do <i>T. cruzi</i> pelo receptor <i>Toll-like</i> TLR2.	72
Figura 7	Complexo da fosforilação oxidativa (OXPHOS)	75
Figura complementar 1	Esquema mostrando a disposição da metodologia	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	DEG mais frequentes durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .	64
Tabela 2	Frequência das vias KEGG enriquecidas durante a fase média (12hpi até 21dpi) de infecção por <i>T. cruzi</i>	73
Tabela complementar 1	Descrição do desenho usado na análise de cada GSE utilizado no presente estudo	88
Tabela complementar 2	Frequência das vias KEGG enriquecidas com todos os grupos	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AP-1	Fator de transcrição AP-1
ASC	Proteína adaptadora de CARD
Bid	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
Birc1b	Do inglês - <i>NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein</i>
Birc5	Proteína survivina
CCL	Quimiocina ligante (motivo C-C)
CD11b	Integrina alfa M
CD162	Glicoproteína ligante 1 de P-selectina
CD27	Receptor para o fator de necrose tumoral 7
CD274	Do inglês - <i>Programmed death-ligand 1</i>
CD28	Molécula co-estimulatória de linfócitos
CD45RA	Antígeno comum de leucócitos
CD61	Integrina beta 3
CD68	Do inglês - <i>CD68 Molecule</i>
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
células NK	Células Natural <i>Killer</i>
células Treg	Células T Reguladoras
COL1A1	Do inglês - <i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>
COL1A2	Do inglês - <i>Collagen Type I Alpha 2 Chain</i>
COX-2	Ciclo oxigenase 2
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjutivo
CXCL	Quimiocina ligante (motivo C-X-C)
DC	Células Dendríticas
DEG	Genes diferencialmente expressos
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
DTU	Unidades discretas de tipagem
EEA1	Antígeno-1 do endossomo primário
ERO	Espécies Reativas de Oxigênios
GAS	Sítio Ativado por Interferon Gama

Gp160	Proteína reguladora do complemento de <i>T. cruzi</i>
gp58/68	Receptores de fibronectina/colágeno de <i>T. cruzi</i>
GPR19	Do inglês - <i>G Protein-Coupled Receptor 19</i>
ICAM-1	Molécula de adesão celular - 1
IFI44	Do inglês - <i>Interferon Induced Protein 44</i>
IFIT2	Do inglês - <i>Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 2</i>
IFIT3	Do inglês - <i>Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 2</i>
IFN-β	Interferon beta
IFNAR	Receptor de interferon
IFN-γ	Interferon gama
IFN-α	Interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IκB	Inibidor de NF-κB
IKK	Complexo IκB Quinase
IL	Interleucina
IL12RB1	Receptor da interleucina 12 subunidade beta 1
IL17RA	Receptor A da interleucina 17
ILR	Receptor de interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF9	Do inglês - <i>Interferon Regulatory Factor 9</i> (Fator Regulador 9 do Interferon)
JAK	Janus Kinase
JUN	Do inglês - <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
KEGG	Do inglês - <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L1CAM	Do inglês - <i>L1 Cell Adhesion Molecule</i>
LAMP1	Proteína de associação a membrana lisossomal- 1
LAMP2	Proteína de associação a membrana lisossomal- 2
LIMS2	Do inglês - <i>LIM Zinc Finger Domain Containing 2</i>
MAC	Complexo de Ataque a Membrana
MAPK1	Do inglês - <i>Mitogen Activated Protein Kinases – 1</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno-1)
MAPK9	Do inglês - <i>Mitogen Activated Protein Kinases – 9</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno-9)
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe 1
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe 2

MMP9	Metaloproteinase de matrix 9
MX2	Do inglês - <i>MX Dynamin Like GTPase 2</i>
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NAIP5	Receptor intracelular do tipo Nod
NF-κB	Fator Nuclear <i>kappa B</i>
NFKBIA	Do inglês - <i>NFKB Inhibitor Alpha</i>
NO	Óxido Nítrico
NREP	Do inglês - <i>Neuronal Regeneration Related Protein</i>
OXPHOS	Via da Fosforilação Oxidativa
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCNA	Antígeno nuclear da proliferação celular
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
Rab5	Do inglês - <i>RAB5A, Member RAS Oncogene Family</i>
RE	Reticulo Endoplasmático
SOD	Superóxido Dismutase
STAT	Proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição
TcAPX	Heme-peroxidase dependente do ascorbato do <i>T. cruzi</i>
TcCPX	Tripsubinaxoxase peroxidase do <i>T. cruzi</i>
TcCRIT	Do inglês - <i>Complement C2 receptor inhibition trispanning</i>
TcCRT	Calreticulina do <i>T. cruzi</i>
TcGPXI	Glutationa peroxidase-I do <i>T. cruzi</i>
TcGPXII	Glutationa peroxidase-II do <i>T. cruzi</i>
TcMPX	Peroxidase de tentparedoxina mitocondrial do <i>T. cruzi</i>
<i>Tc-TOX</i>	Proteína formadora de poros transmembrânicos (Tc-TOX)
T-DAF	Fator acelerador de decaimento de Trypanosoma
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TIMP-1	Inibidor tecidual das metaloproteinases 1
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tyk2	Tirosina Quinase 2
USP11	Do inglês - <i>Ubiquitin Specific Peptidase 11</i>
USP18	Do inglês - <i>Ubiquitin Specific Peptidase 18</i>

V α β 3	Receptor de Vitronectina
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, protozoário da família Trypanosomatidae, é endêmica na América Latina e sul do Texas, mas devido à mobilidade humana pode ser encontrada em outros países (COURA e VIÑAS, 2010; RASSI Jr, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Calcula-se que no Brasil existam 1,5 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* e que 376 mil pessoas apresentam cardiomiopatia provocada pela infecção, podendo levar a morte súbita (OMS, 2017b).

Na doença de Chagas ocorre uma grande variação na apresentação clínica. A fase aguda pode se apresentar de forma assintomática ou com os seguintes sinais clínicos: sinal de chagoma ou romaña, febre, dores musculares, dores de cabeça, dificuldade de respirar e dores abdominais. Na fase crônica, onde há baixa parasitemia, 70% dos pacientes não desenvolvem a doença, permanecendo na forma indeterminada. Entretanto, até 30% dos pacientes podem apresentar cardiomiopatia, causa e morte súbita, e 10% apresentam alterações digestivas, neurológicas ou mistas (OMS, 2017b; OMS, 2017c; RASSI Jr, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

Ainda não se sabe com certeza o motivo do desenvolvimento da fase crônica na doença de Chagas, mas tem sido mostrado que a interação do parasita com o sistema imune tem um papel crucial no desenvolvimento da patogênese da doença (RASSI et al., 2017). O *T. cruzi* possui proteínas em sua superfície como as transialidases e mucinas, que são responsáveis pelo reconhecimento do protozoário pelas células hospedeiras, isso faz com que muitas células do sistema imune sejam ativadas, como as células T e macrófagos, produzindo citocinas que aumentam a inflamação levando a uma resposta imune forte na fase aguda, entretanto o *T. cruzi* é capaz de evadir do sistema imunológico e progredir com a infecção (DÍAZ LOZANO et al., 2017).

A ativação do sistema imune começa pelo reconhecimento dessas proteínas de superfície, como as transialidases por receptores do tipo Toll (TLR) (PETERSEN; KRUMHOLZ; BURLEIGH, 2005; PONCE et al., 2012; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 estão presentes em macrófagos e células dendríticas. No início da infecção, *T. cruzi* induz uma intensa resposta inflamatória, que desempenha um papel crucial na patogênese da doença. Macrófagos que fagocitaram o parasita induzem uma cascata de citocinas. Inicialmente produzem interleucina

(IL) -12, que atua sobre as células NK para induzir a produção de interferon (IFN) γ , o que por sua vez aumenta a produção de IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) α , óxido nítrico (NO) e radicais superóxidos (O_2^{\bullet}) no macrófago, contribuindo assim para a eliminação do parasita. Outras citocinas pró-inflamatórias importantes são IL-1, IL-6 e IL-18, essenciais para controlar a infecção por parasitas intracelulares. A IL-12 e a IL-18 produzidas por células dendríticas e macrófagos promovem o desenvolvimento de células Th1 que produzem IFN- γ , aumentando ainda mais a atividade dos macrófagos (AYO et al., 2013; BASSO, 2013).

Mesmo o sistema imune do hospedeiro desenvolvendo uma resposta elaborada tanto inata quanto adaptativa e tendo uma resposta inicial forte por parte dos macrófagos e IFN- γ , o *T. cruzi* ainda é capaz de evadir do sistema imune, por diferentes formas, o que leva a persistência do parasita na célula e por tanto a progressão da doença. Após a fagocitose e a produção de radicais livres pelo macrófago, o *T. cruzi* produz peroxidases e enzimas chamadas de SOD que formam um sistema de desintoxicação contra o peróxido e seus radicais, conseguindo assim escapar das enzimas oxidativas dos macrófagos (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Além de escapar do ataque oxidativo, o *T. cruzi* ainda é capaz de evadir-se do sistema complemento pela produção de proteínas que impedem a montagem das convertases, e ainda ser capaz de induzir a apoptose das células T CD4 +, o que pode levar a uma diminuição na resposta dos macrófagos frente ao parasita (GEIGER et al., 2016; LIDANI et al., 2017).

Nas células somáticas, a invasão por *T. cruzi* ocorre de diferentes formas, independente do caminho, a formação do vacúolo parasitóforo é necessário para o escape do parasita. Quando o vacúolo sofre maturação as enzimas transialidases e Tc-TOX produzidas pelo protozoário são ativas em baixo pH, desestabilizam a membrana e produzem poros, respectivamente, fazendo com que o parasita consiga escapar do vacúolo e residir no citoplasma, onde irá multiplicar-se na forma de amastigota (MORROT et al., 2016). Após o estabelecimento da doença, dado pela multiplicação do parasita nas células somáticas e escape do sistema imune, alguns indivíduos progridem da fase aguda, para a fase crônica, onde podem desenvolver sintomas cardíacos, digestivos e neurológicos (LIDANI et al., 2017).

Estudos mostraram que as células Treg podem participar da entrada da doença na fase crônica da infecção, produzindo citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β que inibem a ação das citocinas pró-inflamatórias levando a susceptibilidade da célula ao parasita (DE ARAÚJO et al., 2011; MENGEL; CARDILLO; PONTES-DE-CARVALHO, 2016).

Outra célula que tem se mostrado importante na progressão para a fase crônica é o linfócito Th2 que produz citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , que podem ajudar a controlar as respostas dos linfócitos Th1 e evitar danos no tecido durante a infecção por *T. cruzi*. As células Th2 também acabam levando a susceptibilidade do hospedeiro frente ao *T. cruzi*, portanto é necessário um equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 (BONNEY et al., 2015). O perfil linfocitário Th17 também tem sido visto na infecção por *T. cruzi*. Estudos mostram que as células Th17 podem desempenham um papel protetor na doença de Chagas (DA MATTA GUEDES et al., 2010; CAI et al., 2016; SOUSA et al., 2017).

No nível celular, inúmeras vias de sinalização mostraram estar envolvidas nesse processo como a via do fator de transcrição NF- κ B. Durante a infecção por *T. cruzi* a ativação da via do NF- κ B, leva a maior expressão de uma série de proteínas reguladas, incluindo as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1. Além disso, a infecção leva à elevação da regulação do iNOS, potencializando a resposta por parte dos macrófagos (HALL et al., 2000). Outra via que tem sido amplamente relatada envolvida no processo da infecção por *T. cruzi*, é a via JAK-STAT, essa via é ativada pelo IFN- γ , que induz a fosforilação da proteína STAT e sua translocação para o núcleo, onde atua como fator de transcrição, levando a transcrição de um mRNA iNOS mais estável, além de outras citocinas importantes no processo de infecção (STAHL et al., 2014a; BERGERON; OLIVIER, 2016). Outras vias e genes têm sido mostrados como relevantes durante o estabelecimento da infecção por *T. cruzi*.

Na busca de genes que podem ser importantes tanto para a evasão como para o estabelecimento da doença, estudos observando a expressão gênica usando a tecnologia *microarray*, foram feitos para a infecção por *T. cruzi*; genes como IFN- γ , NF- κ B, IL-6, IL-8, tem sido amplamente encontrados como diferencialmente expressos, mostrando a relevância desses durante a infecção (CUNHA-NETO et al., 2005; BOTELHO et al., 2011; SILVA et al., 2013). Porém os estudos usando *microarray* apresentam alguns problemas em seus dados como um numero pequeno de amostras e/ou muito diversificadas, ou ate mesmo um grupo controle de quantidade insatisfatória ou inexistente. A metanálise é uma ferramenta importante para agrupar estudos relacionados, validando expressões gênicas descritas nesses trabalhos. Assim podendo aumentar a confiabilidade dos resultados, minimizar esses problemas e oferecer um resultado mais confiável (GOONESEKERE et al., 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

No início do século 20, o médico e cientista brasileiro Carlos Chagas descreveu pela primeira vez a Doença de Chagas (PARENTE et al., 2017). Também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. Considerada uma doença endêmica em pelo menos 21 países da América Latina, tem se espalhado em outras áreas, como a Europa, América do Norte, Japão e Austrália, principalmente devido à migração (CHATELAIN, 2016) (OMS, 2017d). Estima-se que 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, e mais de 70 milhões corram o risco de adquirir a doença. Anualmente mais de 10.000 pessoas morrem a partir de manifestações clínicas da Doença de Chagas, sendo definida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença potencialmente fatal (OMS, 2017d).

A transmissão da doença ocorre principalmente através da inoculação do protozoário no hospedeiro por insetos vetores das várias espécies de triatomíneos. O contágio acontece quando o inseto infectado defeca na lesão provocada durante o repasto sanguíneo, ou quando o protozoário entra em contato com membranas de mucosas intactas. Outros modos de transmissão menos frequentes incluem transfusão de sangue (5-20%) e congênita (0,5%). Raramente a doença pode ser adquirida por transplante de órgão ou acidentes de laboratório (NAVARRETE-SANDOVAL; SERVÍN-ROJAS, 2016). A ingestão de alimentos ou de líquidos contaminados por *T. cruzi* também faz parte dessa baixa estatística, porém, nas últimas décadas, tem-se visto no norte do Brasil novos casos da doença de Chagas, o que tem sido associado a surtos de origem alimentar, podendo ser através de sucos contendo as fezes de triatomíneos silvestres que contenham *T. cruzi* (PARENTE et al., 2017).

A doença possui efetivamente duas fases clínicas. A fase aguda, que dura várias semanas e é geralmente assintomática ou não reconhecida. No entanto, em uma pequena proporção dos casos, esta fase pode causar sintomas graves. A mortalidade durante a fase aguda é rara (<1% dos casos). Na maior parte dos indivíduos, mesmo na ausência de tratamento, a fase aguda resolve espontaneamente. Entretanto, cerca de 30-40% das pessoas infectadas desenvolvem depois de alguns anos a fase crônica. A fase crônica é a forma ativa da doença, envolvendo complicações cardíacas ou gastrointestinais potencialmente fatais. Aproximadamente 20-30% dos indivíduos infectados irão desenvolver irreversivelmente

síndromes cardíacas potencialmente fatais e/ou dilatação do trato gastrointestinal (megacólon ou megaesófago) (MESSENGER; MILES; BERN, 2015; CHATELAIN, 2016; CUCUNUBÁ et al., 2017).

Atualmente, existem apenas dois fármacos comumente usados no tratamento da doença: benznidazol e nifurtimox, ambos mostrando uma eficácia maior nas fases iniciais. O benznidazol tem apresentado uma eficácia de 80% na fase aguda, enquanto que na fase crônica reduz para 20%. O tratamento leva a efeitos secundários frequentemente relatados, levando em muitos casos o abandono do tratamento pelo paciente. Diante disso, o controle químico de insetos vetores, principalmente *Triatoma infestans*, principal vetor da doença, pode ajudar a diminuir os casos, bem como a melhoria socioeconômica e de habitação, fatores que têm mostrado a diminuição da transmissão exitosa de doenças transmitidas por vetores em muitas regiões (PARENTE et al., 2017). Contribui também para a resolução do problema uma melhor elucidação da doença e uma nova abordagem terapêutica.

2.2 *Trypanosoma cruzi* e suas características

O gênero *Trypanosoma* compreende um grande número de espécies e subespécies de protozoários que são capazes de produzir efeitos prejudiciais sobre o hospedeiro (BOTERO et al., 2017). Fazendo parte deste, o *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasita que causa a doença de Chagas. Este parasita tem um ciclo de vida complexo, alternando entre dois hospedeiros diferentes, um inseto vetor Triatomíneo e um mamífero reservatório. Em cada hospedeiro, o parasita desenvolve-se em dois estágios principais de vida: forma proliferativa (denominada epimastigota dentro do inseto e amastigota dentro de células de mamífero) e forma infecciosa (chamada tripomastigota metacíclico no inseto e tripomastigota sanguíneo no hospedeiro mamífero) (CAMPO, 2017).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e possui quatro estágios de desenvolvimento, diferindo em formas infecciosas e não infecciosas. O ciclo se inicia pela ingestão de tripomastigotas pelo inseto hematófago, estas circulam no sangue do hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio do vertebrado, os parasitas mudam novamente para a forma não infectiva epimastigota e se dividem por divisão binária, passando para o intestino médio se transformando na forma não proliferativa e infecciosa, as tripomastigotas metacíclicas. Ao se

alimentar o inseto defeca no hospedeiro e através da lesão da picada o parasita penetra na pele e entra em contato com células. As células tripomastigotas metacíclicas infectam as células do mamífero e se tornam amastigotas, forma replicativa. A forma amastigota se replica dentro da célula do hospedeiro, depois se transforma em tripomastigota sanguínea, forma não proliferativa, mas infectiva. Ao romper a célula do hospedeiro, o parasita cai na corrente sanguínea e infecta novas células, finalizando o ciclo. Nesse momento ao picar esse hospedeiro, o inseto vetor é contaminado, recomeçando o ciclo (PAVANI et al., 2016; RIES et al., 2016).

A infecção pelo *T. cruzi* pode se desenrolar de diferentes formas devido a diversidade da própria resposta imune do hospedeiro, bem como a grande heterogeneidade biológica apresentada pelos diversos isolados do protozoário. Essas linhagens foram classificadas em seis grandes Unidades Discretas de Tipagem (DTU), recentemente renomeadas como *T. cruzi* I-VI, apresentam variedade na distribuição geográfica, nas associações ecoepidemiológicas e nas manifestações clínicas. *T. cruzi* I é a principal causa de doença de Chagas no norte da América do Sul e América Central, nestes pacientes são observadas as formas indeterminada e cardíaca da doença. Entretanto, no lado sul, é visto as DTUs II, V e VI implicadas na doença, a II e V aparentemente seriam mais “patogênicas”, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva (BURGOS et al., 2010; ZINGALES, 2011; HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013).

Estudos têm demonstrado variação do conteúdo total de DNA entre as cepas e clones do *T. cruzi*, revelando numerosos polimorfismos genéticos. Essa alta variabilidade poderia conferir ao parasita a capacidade de invadir um número significativo de tipos de células, bem como ter vários tropismos teciduais, causando os diferentes tipos de condições cardíacas e complicações intestinais associados à doença de Chagas. Calcula-se que o genoma do *T. cruzi* é composto por 12.000 genes, foi possível atribuir funções a 50,8% deles. Aproximadamente 50% do genoma é composto de sequências repetitivas, principalmente de grandes famílias multigênicas e retrotransposons (BARTHOLOMEU et al., 2009; SOUZA et al., 2011; DE PABLOS; OSUNA, 2012; WEATHERLY; PENG; TARLETON, 2016).

Proteínas repetitivas codificadas por essas regiões têm sido mostradas mais fortemente reconhecidas por anticorpos do que proteínas não repetitivas. Estudos mostram, que os antígenos repetitivos de *T. cruzi* demonstraram induzir uma resposta imunitária T-dependente, e em alguns casos T-independente. Além disso, as evidências mostram alto reconhecimento

por anticorpos IgG de pacientes crônicos. Apesar da alta antigenicidade e imunogenicidade, essas proteínas observadas na interação *T. cruzi* hospedeiro, ainda são desconhecidas, sugerindo que as regiões repetitivas dessas proteínas agem como uma forma de evasão da resposta imune (VALIENTE-GABIOUD et al., 2011).

2.3 Resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi*

O controle da infecção pelo *T. cruzi* é complexo, requer a ativação da resposta inata com leucócitos, sistema complemento, e da resposta adaptativa, tanto as células T CD4⁺ como CD8⁺, bem como uma resposta substancial de anticorpos pelas células B. Mesmo a resposta imunológica sendo estimulada para o controle da infecção aguda, algumas vezes o *T. cruzi* não é totalmente erradicado, persistindo no hospedeiro por décadas (STEMPIN et al., 2017). Isso acontece, pois, ao ser infectado o hospedeiro entra na fase aguda, onde possui picos altos de carga parasitaria, e então seu sistema imune é ativado e essa carga cai drasticamente com subsequente controle da infecção. Porém, em alguns pacientes, a doença não é totalmente erradicada e entra na fase crônica, isso acontece devido o parasita possuir inúmeros recursos de evasão do sistema imunológico, podendo assim entrar na fase crônica assintomática ou indeterminada onde o indivíduo possui baixa carga parasitaria, produz anticorpos específicos para os antígenos do *T. cruzi*, e desenvolve uma infecção controlada; ou sintomática, podendo desenvolver problemas cardíacos, digestivos e neurológicos (CHATELAIN, 2016; SANMARCO et al., 2016).

A imunidade inata pode agir frente ao *T. cruzi* de três maneiras para tentar controlar a doença: (1) reconhecimento e destruição dos parasitas por células do sistema imune inato, em particular macrófagos e células dendríticas (DC), (2) ativação de DC e macrófagos que são essências na resposta imune contra o parasita, produzindo citocinas e substâncias de extrema importância para controle da infecção e (3) detecção de infecção por células fagocíticas não profissionais, que são os alvos primários da invasão por *T. cruzi* (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Ao adentrar no local da infecção, *T. cruzi* pode ser internalizado por células fagocíticas. Os macrófagos no local da infecção estão entre os primeiros fagócitos profissionais a entrarem em contato com o parasita (ABEL et al., 2014). O reconhecimento do

parasita acontece através dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que são reconhecidos por receptores imunológicos, tais como TLR, sendo TLR2, TLR4 e TLR9 envolvidos no reconhecimento do *T. cruzi* (PETERSEN; KRUMHOLZ; BURLEIGH, 2005; PONCE et al., 2012; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). O mecanismo clássico proposto para a fase aguda da infecção envolve o reconhecimento do *T. cruzi*, principalmente pelo TLR2 (PETERSEN; KRUMHOLZ; BURLEIGH, 2005; PONCE et al., 2012; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016), desencadeando a síntese de IL-12, TNF- α e quimiocinas por macrófagos, o que atrai células inflamatórias para o local da infecção, processo que desencadeia a síntese de IFN- γ por células NK e células T. O IFN- γ produzido ativa os macrófagos, resultando na morte do parasita (CARDILLO et al., 1996; SATHLER-AVELAR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012; FALLIS, 2013; ABEL et al., 2014).

Durante a fagocitose, o parasita será reconhecido principalmente pelo TLR2, e haverá a formação do fagolisossomo. Genes importantes como Rab5 e catepsina são superexpressos durante esse processo. A fagocitose é um mecanismo de resposta imune inata que as células fagocíticas usam para internalizar grandes partículas, incluindo agentes patogênicos para eliminá-los. A via dos fagossomos é realizada por células fagocíticas especializadas, como os macrófagos. TLR2 é capaz de reconhecer moléculas na superfície do *T. cruzi*, assim regulando a entrada deste em macrófagos através da ativação de PI3K. Ao mesmo tempo, a PI3K induz a ligação de Rab5 ao endossoma precoce que, por sua vez, é essencial para a entrada do *T. cruzi* em macrófagos. As proteínas Rab, quando ativas se ligam a membrana e medeiam a fusão do fagossomo com outras vesículas, incluindo a Rab5. Rab5 liga-se à membrana e serve para ancorar o antígeno endossomal precoce da proteína efetora 1 (EEA1), que coopera com Rab5 no processo de fusão da membrana (FRATTI et al., 2001; MAGANTO-GARCIA et al., 2008).

Dentro do fagolisossomo do macrófago que foi ativado pelo IFN- γ , a NADH oxidase também será ativa, produzindo radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), e junto com a indução da óxido nítrico sintase 2 (iNOS), produtora de óxido nítrico ($\cdot NO$), haverá a produção de componentes centrais no mecanismo de morte oxidativa, dentre eles o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é a reação do $O_2^{\cdot-}$ com o $\cdot NO$, componente fundamental nesse processo e potente oxidante, sua ação pode danificar a célula do parasita diretamente pela peroxidação lipídica (prejudicando a integridade da membrana e sua função), bem como a função mitocondrial o

que pode resultar em morte celular apoptótica ou necrótica. Além do peroxinitrito, outras espécies reativas resultantes desse processo podem ser formadas, tais como hidroxil ($\cdot\text{OH}$), dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$) e carbonato ($\text{CO}\cdot^{-3}$), podendo causar oxidação e nitração de proteínas, lipídios e DNA na célula do *T. cruzi*, levando a mutações e erros de transcrição (ALVAREZ et al., 2011; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; GOES et al., 2016).

A produção de NO pelos macrófagos tem sido apresentada como umas das mais importantes armas do hospedeiro contra o *T. cruzi*, por isso sua ativação pelo IFN- γ é essencial no combate ao protozoário. A nível celular, inúmeras vias de sinalização mostraram estar envolvidas na produção de NO em resposta ao IFN- γ . Destas, as vias de sinalização JAK/STAT e NF- κ B parecem ser as mais importantes (BABIOR, 1984; STAHL et al., 2014b; BERGERON; OLIVIER, 2016). Após o interferon se ligar ao receptor na via JAK-STAT, este pode estar associado a proteínas com domínios tirosinas quinases, chamadas de JAK que são ativadas e fosforilam fatores de transcrição chamados STATs. Uma vez no núcleo, os STATs dimerizados se ligam a sequências reguladoras específicas para ativar ou reprimir a transcrição dos genes alvo (RAWLINGS; ROSLER; HARRISON, 2004).

Foi visto que STAT1, um dos fatores de transcrição dessa via, desempenhou um papel importante na primeira linha de defesa contra tripomastigotas. Quando sua ativação é dirigida por IFN- γ , o STAT1 fosforilado se ligará ao sítio ativado por interferon gama (GAS) presente no promotor óxido nítrico sintase (iNOS) de macrófagos estimulados com IFN- γ . Esta via participa dos efeitos reguladores do IFN- γ sobre o parasitismo de *T. cruzi* (BLANCHETTE; JARAMILLO; OLIVIER, 2003; STAHL et al., 2014a, 2014b). Os IFN de tipo I (IFN- α e IFN- β) também desencadeiam respostas a patógenos intracelulares através da via JAK/STAT, eles se ligam ao seu receptor de IFN (IFNAR) e iniciam a transdução de sinal através de quinases Jak1 e Tyk2 e STAT1 e STAT2, levando a formação de um complexo de transcrição composto por STAT1, STAT2 e IRF9, que irá gerar uma resposta específica estimulada pelo interferon na transcrição de genes pró-inflamatórios (PLATANIAS, 2005; LI et al., 2017).

O NF- κ B é um fator de transcrição que se liga a sequências de DNA específicas induzindo a expressão de diferentes citocinas e quimiocinas, bem como receptores necessários para o reconhecimento imunitário, tais como moléculas MHC, proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e moléculas de adesão I-CAM, VCAM-1 e E-selectina. A via é composta pelas proteínas da família NF- κ B, que normalmente existem como dímeros. Os

dímeros são mantidas numa forma inativa no citoplasma da célula através da interação com uma subunidade inibitória, I κ B (BARKETT; GILMORE, 1999; CHEN; GHOSH, 1999; PAHL, 1999; GHOSH; KARIN, 2002). A ativação ocorre quando IKK fosforila o inibidor I κ B que desacopla de NF- κ B. I κ B então será ubiquitinado e degradado e NF- κ B translocado para o núcleo (ROFF et al., 1996). Nos macrófagos infectados com *T. cruzi*, além da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias o NF- κ B, adicionalmente, ativa a iNOS, que catalisa a produção do microbicida óxido nítrico (STAHL et al., 2014a).

Os linfócitos T recrutados serão principalmente orientados para a diferenciação em Th1, Th17 e/ou Treg (FALLIS, 2013). As citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 secretadas pelo macrófago atuam sobre linfócitos Th0 levando sua diferenciação para um perfil Th1, os quais produzem mais IFN- γ amplificando ainda mais a atividade dos macrófagos (ABBAS ABUL K.; LICHTMAN;; PILLAI, 2011). As células Treg estão entre os mecanismos imunorreguladores da doença de Chagas, são importantes no controle da resposta inflamatória pela expressão de citocinas anti-inflamatórias tais, como IL-10 e TGF- β , e possivelmente pela inibição da atividade citotóxica das células T CD8⁺. É provável que as células Treg empreguem mecanismos distintos para regular a resposta imunológica em pacientes que desenvolvem a forma indeterminada da doença e aqueles que desenvolvem a forma cardiomiopática (SATHLER-AVELAR et al., 2009). A Th17 é responsável pela produção da interleucina (IL)17, citocina pró-inflamatória que contribui para a proteção do hospedeiro contra uma série de patógenos infecciosos induzindo o recrutamento de neutrófilos e a secreção de mediadores inflamatórios. Na infecção por *T. cruzi* a IL-17 parece exercer um papel protetor, principalmente com relação à forma cardíaca (SOUSA et al., 2017).

Além das células fagocíticas, o *T. cruzi* é capaz de infectar diferentes tipos celulares. A invasão a essas células não fagocíticas profissionais pode ocorrer por dois diferentes mecanismos. Um deles ocorre em 20% a 30% dos casos, onde a invasão é dependente da sinalização de Ca²⁺, o influxo de cálcio leva a exocitose lisossomal no local de ligação do parasita/lesão, seguido por eventos de endocitose compensatória a qual carrega o parasita para dentro da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo recém formado se funde aos lisossomos, até que toda o vacúolo seja coberto por marcadores da membrana lisossômica. O outro mecanismo acontece em 70 a 80% dos casos. A invasão ocorre através da invaginação da membrana plasmática seguido de fusão intracelular com lisossomos (YOSHIDA, 2006;

EPTING; COATES; ENGMAN, 2010; FERNANDES; ANDREWS, 2012; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Independente da via de entrada do parasita, a fusão lisossômica é essencial para a progressão da infecção, e um dos motivos são as proteínas LAMP 1 e LAMP 2 que integram a membrana do lisossomo. Estas, são proteínas altamente glicosiladas, ricas em ácido siálico e estima-se cobrir aproximadamente 80% da superfície luminal desta organela. Com a fusão, o vacúolo parasitóforo também fica recoberto internamente por essas proteínas, além de permitir a acidificação do pH dentro do vacúolo (HALL et al., 1992; ALBERTTI et al., 2010; LIA et al., 2017). No ambiente ácido a transialidase, proteína de superfície do parasita é eliminada, tornando-se ativa devido ao baixo pH. A transialidase ativa transfere o ácido siálico das proteínas LAMP para as mucinas, também proteínas de superfície do *T. cruzi*. A desialilação das proteínas LAMP torna a membrana do fagolisossomo mais susceptível à ruptura, então as proteínas Tc-TOX, molécula segregada pelo parasita, também ativas em pH ácido, formam poros na membrana. O parasita escapa do vacúolo e reside no citoplasma da célula hospedeira, se replicando na forma de amastigota (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; GEIGER et al., 2016).

Dentro do citoplasma o protozoário libera proteínas como as transialidasas, que são apresentadas na superfície das células hospedeiras no complexo MHC de classe I. Essas proteínas serão reconhecidas pelas células T CD8⁺ que exercem proteção, provavelmente através da sua atividade citolítica, e a sua produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias que como anteriormente já dito, atuam na ativação de macrófagos e no controle de infecção. A estimulação dos linfócitos T CD8⁺ é principalmente mediada por células dendríticas (VERHASSELT et al., 2002; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

A evolução para a fase crônica da doença de Chagas ainda é alvo de muitos estudos, mas foi visto que a resistência à infecção pode ser caracterizada por uma resposta do tipo Th1 mais precoce e de maior amplitude, sendo que a evolução para a forma crônica caracteriza-se por uma perda na atividade Th1, com uma substituição para a atividade Th2 (KUMAR; TARLETON, 2001). A resposta Th1 forte protege, enquanto uma resposta Th2 aumenta a suscetibilidade à infecção. As células Th1 produzem IFN- γ e TNF- α , que são responsáveis pela estimulação da atividade microbicida dos fagócitos. Do mesmo modo, a IL-12, um indutor da resposta de citocinas do tipo 1, promove a resistência ao *T. cruzi* em modelos

murinos. Em contraste, a IL-10, uma citocina que sua produção é induzida pelas células Th2, tem sido associada à suscetibilidade a *T. cruzi* em vários modelos murinos, pois é conhecido que a IL-10 e IL-4, citocina também produzida pela Th2, antagonizam as ações do IFN- γ . Além disso, algumas estruturas da superfície celular do *T. cruzi* podem ativar o TLR das células fagocíticas de modo que essas expressem TGF- β , IL-10 e a expressão pelo MHC II, o que diminui a inflamação, mas não extingue o parasita. O TGF- β pode suprimir algumas das funções microbicidas dos macrófagos, uma forma que os parasitas criam um microambiente celular favorável para ganhar uma vantagem de sobrevivência. Além disso foi observado que o TGF- β modula o desenvolvimento de cardiomiopatia na doença de Chagas. (PAHL, 1999; CHEN et al., 2001; KUMAR; TARLETON, 2001; NOGUEIRA et al., 2012; FALLIS, 2013; WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016).

2.4 Mecanismos de evasão do sistema imune pelo *T. cruzi* durante a infecção

Mesmo o sistema imune do hospedeiro desenvolvendo uma resposta elaborada tanto inata quanto adaptativa, tendo uma resposta inicial forte por parte dos macrófagos e IFN- γ , o *T. cruzi* é capaz de evadir-se do sistema imune, por diferentes formas, o que leva a persistência do parasita na célula e por tanto a progressão da doença. Nos macrófagos, após a fagocitose há ativação de uma NADPH oxidase, resultando na produção contínua de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e óxido nítrico (NO), que juntos formam o peroxinitrito e intermediários que são prejudiciais ao parasita, porém o *T. cruzi* é capaz de produzir enzimas que neutralizam esses radicais e permitem escapar do ataque dos fagócitos (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

As defensas antioxidantes em *T. cruzi* dependem de um sistema sofisticado, o parasita possui uma rede antioxidante que consiste de várias enzimas e moléculas não enzimáticas distribuídas em diversos compartimentos celulares: o citosol, RE, mitocôndria, e glicossomo. *Trypanosoma cruzi* possui cinco peroxidases (também chamadas de peroxiredoxinas) que operam em seu sistema de desintoxicação de peróxido. A tripsubinoxase peroxidase (TcCPX), a peroxidase de tentparedoxina mitocondrial (TcMPX), a heme-peroxidase dependente do ascorbato (TcAPX), a glutathiona peroxidase-I (TcGPXI) e glutathiona peroxidase-II (TcGPXII), que estão espalhadas pelos compartimentos celulares já citados. Os macrófagos são capazes de produzir radicais como hidroperóxidos orgânicos de cadeia

pequena, espécies reativas de oxigênios (ERO), hidroxil ($\bullet\text{OH}$), dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) e carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), dentre outros. As peroxidases neutralizam os diferentes radicais de diferentes formas (PIACENZA et al., 2013; RADI, 2013; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Além disso, *T. cruzi* contém quatro superóxido dismutases (SOD) contendo ferro, que protegem o parasita dos efeitos citotóxicos diretos de $\text{O}_2^{\bullet-}$, convertendo $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O . E, portanto, inibem a formação de ONOO^- por desintoxicação do superóxido radical. TcSODs A e C neutralizam o $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido na mitocôndria, TcSOD B1 atua no citosol e TcSOD B1-2 atua nos glicossomos. Assim o *T. cruzi* escapa da resposta oxidativa por parte dos macrófagos, produz enzimas que agem em baixo pH desestabilizando a membrana do fagolisossomos e formando poros, escapando do fagolisossomo e se replicando no citoplasma do macrófago. Desde o final da década de 1960 e no início da década de 1970, dois medicamentos foram utilizados para o tratamento de doença de Chagas, o nifurtimox e benznidazol, são fármacos que causam estresse oxidativo celular pela geração final de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Estudos têm mostrado que *in vitro* o *T. cruzi* pode ser resistente aos dois fármacos (PIACENZA et al., 2013; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

O sistema complemento constitui um componente chave da imunidade inata, e fornece a primeira linha de defesa contra muitos patógenos. O complemento é ativado principalmente por três vias: via das lectinas, via clássica e a via alternativa, que levarão a geração de moléculas efetoras, auto-amplificação e a indução de sinalização imune, e para escapar dele o *T. cruzi* produz proteínas que controlam essa resistência. Na superfície do *T. cruzi* há expressão de moléculas de ligação do complemento, como a calreticulina (TcCRT), proteína reguladora do complemento de *T. cruzi* (TcCRP) ou Gp160, *Complement C2 receptor inhibition trispanning* (TcCRIT), gp58/68 e Fator Acelerador de Decaimento de Trypanosoma (T-DAF), que se ligam as proteínas do complemento e impedem a montagem da C3 convertase na superfície do parasita, levando à inibição de sua atividade catalítica e por consequência impedem a montagem do Complexo de Ataque a Membrana (MAC). Dessa forma o *T. cruzi* consegue resistir e estabelecer a infecção (CESTARI; RAMIREZ, 2010; LIDANI et al., 2017).

O *T. cruzi* ainda promove nas células infectadas a liberação de microvesículas que também são conhecidas como vesículas plasmáticas derivadas da membrana. As microvesículas possuem uma estrutura complexa de bicamada lipídica e transportam várias

moléculas derivadas das células, como lipídios, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (por exemplo, miRNAs e mRNAs), que podem ser transferidos e tornar-se funcionais em células alvo. A liberação de vesículas derivadas da membrana plasmática ocorre nos níveis basais, mas pode ser grandemente aumentada por estímulos extracelulares, como uma infecção parasitária. Foi visto que as moléculas de *T. cruzi*, gp82 e a oligopeptidase B podem induzir um aumento transitório de Ca^{2+} intracelular em células hospedeiras e é possível que elas possam estar envolvidas na indução da liberação das microvesículas. As microvesículas derivadas do hospedeiro inibem predominantemente as vias clássicas e da lectina do sistema complemento ao se ligarem a C4b2a (C3 convertase) na superfície do *T. cruzi* aumentando a sobrevivência do parasita e inibindo a ação do sistema complemento (CESTARI et al., 2012; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; GEIGER et al., 2016; LIDANI et al., 2017).

As células T CD8⁺ são capazes de reconhecer as células infectadas com *T. cruzi* através da apresentação de antígenos do parasita pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I (MHC I), criando uma resposta imunológica forte, porém demorada, sendo altamente eficaz para controlar os níveis de parasitas. A medida que a infecção avança, as células T específicas de patógenos parecem reconhecer preferencialmente um pequeno número de epítomos de forma hierárquica, um processo chamado imunodominância. A imunodominância é ditada por vários fatores, incluindo a abundância da proteína de origem, a geração de peptídeos no proteassoma, a afinidade peptídica pelo complexo de MHC no caso de respostas de células T e a composição do repertório de receptores das células T. No *T. cruzi* as transialidases estão entre os principais alvos imunodominantes das TCD8⁺, conhecidos na infecção por *T. cruzi*, devido à alta expressão nas formas infecciosas e do conteúdo antigênico repetitivo. Portanto, essas enzimas foram propostas como alvos de vacina (MARTIN et al., 2006; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Porém, foi visto que a imunodominância na infecção pelo *T. cruzi* por essas moléculas pode permitir um escape do sistema imune, pois por ser uma família de genes altamente polimórficos e de múltiplas cópias produzem potenciais candidatos imunogênicos que podem gerar uma resposta imune não focada. Um outro motivo para essa aparente deficiência da resposta das células TCD8⁺, foi associado a diminuição da moléculas co-estimuladoras CD80 ou CD86, ou a síntese de IL-1, durante a infecção por *T. cruzi*, consequentemente, as

células T específicas são menos estimuladas e tornam-se anérgicas. Foi visto também um aumento da frequência de células totalmente diferenciadas (CD27 (-) CD28(-) CD45RA(-)) na memória de células TCD8⁺ a medida que a doença vai avançando e se tornando crônica, além de uma alta taxa de apoptose, refletindo possivelmente a exaustão no compartimento de células T CD8⁺. A perda de respostas de células T específicas a parasitas durante a infecção crônica, juntamente com a diversidade de tipos de HLA e de cepas do parasita e, portanto, a diversidade também na expressão de epítomos, dificultaram a identificação de epítomos específicos reconhecidos pelas células T CD8⁺ específicas para *T. cruzi* (ALBAREDA et al., 2006; ALVAREZ et al., 2008; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

T. cruzi exibe uma relação complexa com a resposta apoptótica do hospedeiro. A infecção intracelular por este patógeno pode bloquear a morte celular programada em uma variedade de células somáticas, enquanto que a apoptose é ativada seletivamente em células T CD4⁺ que migram para locais de infecção em animais infectados com *T. cruzi* (PETERSEN et al., 2006). Moléculas na superfície da membrana celular do *T. cruzi*, como as transialidases, podem induzir a apoptose nessas células, estas conseguem se difundir na corrente sanguínea durante a fase aguda, mostrando ser um fator de virulência (LEGUIZAMO; MOCETTI, ; MUCCI et al., 2002). Após serem ativados os receptores pelas transialidases por exemplo, o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) será formado, ativando e recrutando a caspase-8, que também cliva Bid para uma forma truncada (tBid), que envolve a via apoptótica mitocondrial para amplificar a resposta, uma vez que as caspases iniciadoras são ativadas através das vias de apoptose extrínsecas ou intrínsecas, medeiam a ativação de caspases efetoras, como a caspase-3, o que leva a apoptose (WILSON, 1998; SHALINI et al., 2015).

O *T. cruzi* ainda é capaz de induzir a apoptose das células T pela expressão e função aumentada de Fas/FasL nas células T CD4⁺, o que leva a eliminação precoce de células T efetoras e escape do parasita. A morte de células TCD4⁺ induzida por *T. cruzi* é uma estratégia do parasita para aumentar seu crescimento celular, portanto, é possível que o parasita utilize a apoptose da célula hospedeira para evitar a resposta imune. O que foi mostrado no tratamento com anti-FasL, que foi capaz de reduzir a apoptose e melhorar a resposta imune do tipo 1, pois as células T produzem mais IFN- γ e os macrófagos mostram um maior controle da infecção intracelular, mostrando causar um efeito protetor na resposta imunológica Além da própria apoptose das células T, o processo de captação de células

apoptóticas por macrófagos infectados com *T. cruzi* está associado à liberação de TGF- β , IL-10 e prostaglandina E₂ (PGE₂). Juntos, esses mediadores desativam os macrófagos, que são a principal linha de defesa contra o parasita e favorecem o crescimento de amastigotas de *T. cruzi* (DOSREIS; LOPES, 2009; LIDANI et al., 2017).

Os macrófagos possuem o receptor de vitronectina (V α β 3) que participa no reconhecimento de células apoptóticas. Foi mostrado que células apoptóticas infectados por *T. cruzi* ao serem reconhecidas pelo V α β 3 e fagocitadas por macrófagos induziram a uma grande quantidade de corpos lipídicos dentro do macrófago, bem como a produção da PGE₂. Em resposta a células apoptóticas os macrófagos produziram níveis significativos de TGF- β , que induz a formação de corpos lipídicos. Localizados nos corpos lipídicos foi encontrado a COX-2 bem como a presença da própria PGE₂, como já descrito, esta favorece a replicação intracelular de *T. cruzi* (D'AVILA et al., 2011). Além disso, as prostaglandinas modulam uma série de funções nos macrófagos, levam à diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da apresentação do antígeno e diminuição da produção de radicais livres nessas células (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012). Assim, a modulação diferencial das vias apoptóticas em células imunes parece ser uma entre as muitas estratégias eficazes usadas pelo *T. cruzi* para promover sua própria sobrevivência e crescimento, limitando a inflamação e a erradicação do parasita. Dessa maneira, o *T. cruzi* consegue evadir tanto a imunidade inata quanto a adaptativa e estabelecer a doença.

2.5 Genes diferencialmente expressos em análises de *microarray* durante infecção por *T. cruzi*

Os *microarrays* são poderosas ferramentas que possuem a capacidade de medir a transcrição de milhares de genes simultaneamente em amostras biológicas. Atualmente, uma das empregabilidades do *microarray* é o estudo da assinatura genética associadas à doença, podendo até ser usado como prognóstico no câncer de mama por exemplo (SLODKOWSKA; ROSS, 2009; ARASAPPAN et al., 2011). A tecnologia do *microarray* foi usada para estudar os genes diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Foram encontrados genes superexpressos em uma determinada fase e subexpressos em outras, genes que participam da divisão como PCNA foram enriquecidos nas fases amastigota e epimastigota, e genes relacionados a invasão, como por exemplo o gene da transialidase mais

expressos nas fases tripomastigota sanguínea e tripomastigota metacíclica (MINNING et al., 2009).

Estudos com *microarray* analisando a expressão gênica no hospedeiro que está sofrendo uma infecção por *T. cruzi* também foram vistos. Durante a fase aguda da doença de Chagas, após 24 horas de infecção o tecido da pele foi analisado e observado, que os genes do interferon do tipo I e os genes ligados a essa via estavam entre os genes mais altamente regulados. Mesmo em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, o grupo de genes estimulados por interferon (ISGs - *Interferon-stimulated genes*) estavam entre os superexpressos. Estes achados apontam para um papel crucial dos IFNs do tipo I e II na condução da resposta transcricional precoce, no local de inoculação do *T. cruzi*, foi observado também que as diferenças das linhagens influenciam o grau de resposta do IFN tipo I. (CHESSLER et al., 2009). Macrófagos derivados da medula óssea infectados por *T. cruzi* 24 horas após a infecção, tiveram regulação positiva de genes induzidos por IFN- β como NF- κ B, IRF1, IRF7, IFIT1, IFIT2 e MyD88. Observou-se também que o perfil de ativação dos macrófagos era de maneira alternativa ativada pelas células Th2, através da citocina IL-4 e a desativação de macrófagos pela citocina IL-10 (ZHANG et al., 2010).

Em uma infecção por *T. cruzi*, de 10 a 18 dias, detectou-se uma maior expressão de genes relacionados ao inflamassoma, incluindo ASC, NAIP5, caspase-1 e IL-1R, nos corações dos camundongos infectados com *T. cruzi* comparados com os camundongos C57BL/6 não infectados, sugerindo que os genes relacionados ao inflamassoma funcionam durante a infecção *in vivo* com *T. cruzi* no tecido cardíaco e pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença (SILVA et al., 2013).

Observou-se, 48 horas após infecção com *T. cruzi*, genes que expressam quimiocinas como CXCL10, CXCL16 e CCL5, bem como genes ligados ao interferon, superexpressos em tecido cardíaco. Já o inibidor de metaloprotease (TIMP-1) e genes que codificam proteínas responsáveis pela comunicação entre as células como Cx43 foram subexpressos, igualmente genes relacionados a apoptose como Birc1b e Birc5 (GOLDENBERG et al., 2009). No tecido cardíaco na fase crônica da doença de Chagas, foi observado uma grande quantidade de macrófagos, visto pela presença de marcadores de membrana de macrófagos CD11b e CD68, uma glicoproteína também presente em macrófagos. Verificou-se também muitos genes que codificam quimiocinas, como de CCL2, CCL8 e CCL7. Genes relacionados a matriz também foram superexpressos, assim como TIMP-1. A expressão de genes que codificam moléculas

de adesão, como glectina-3, ligando de P-selectina (CD162), integrina beta 3 (CD61) e ICAM-1 (CD54), também aumentou nos corações de camundongos chagásico. Genes que modulam a resposta das citocinas IFN- γ e TNF- α , também tiveram sua expressão aumentada (BOTELHO et al., 2011). Em cardiomiócitos de paciente com problemas de insuficiência cardíaca severa, genes ligados ao IFN- γ estão regulados positivamente, enquanto que os genes envolvidos no metabolismo lipídico, fosforilação oxidativa e cadeia de transferência de prótons são seletivamente regulados positivamente em pacientes cardiomiopático com diagnóstico confirmado para *T. cruzi*, mas não em tecido cardiomiopático com epidemiologia negativa para *T. cruzi* (CUNHA-NETO et al., 2005).

2.6 A importância da metanálise

O estudo do perfil de expressão gênica utilizando *microarray* é uma poderosa ferramenta que tem emergido e que permite a medição simultânea de milhares de transcritos de mRNA em uma amostra biológica. Tem sido amplamente utilizado para identificar biomarcadores candidatos e alvos terapêuticos (BROWN; BOTSTEIN, 1999; BAECHLER et al., 2003). Apesar de sua grande promessa, os estudos baseados em *microarray* podem relatar achados que não são reproduzíveis ou apresentarem dados com outros problemas, como por exemplo, validação inadequada, amostras pequenas ou até mesmo controles amostrais insuficientes (JAFARI; AZUAJE, 2006). A combinação de informações de vários estudos existentes pode aumentar a confiabilidade e a generalização dos resultados. Através de técnicas estatísticas pode-se juntar os resultados de estudos independentes, mas relacionados, isso é chamado de "metanálise". (RAMASAMY et al., 2008)(GOONESEKERE et al., 2014).

Durante um estudo de metanálise sobre o desenvolvimento de fibrose avançada em diferentes órgãos, foi detectado processos moleculares conservados sobre a fibrogênese envolvendo o TFG- β e IL-6, participando e ativando vias importantes como a JAK-STAT, PI3K/AKT e induzindo perfil de resposta Th1 (MAKAREV et al., 2016). Outro estudo relacionado a fibrose, estudou os genes diferencialmente expressos durante a fibrose pulmonar idiopática comparando fibroblastos normais cultivados *in vitro*. Entre os 228 transcritos expressos diferencialmente, 49 foram previamente associados com fibrogênese. Dentre esses transcritos, estavam entre os 10 genes superexpressos mais significativos LIMS2, NREP, CTGF e entre os subexpressos IL1R1, IFI44, NFKBIA, genes que são

envolvidos com a transcrição, inflamação e diretamente na formação da fibrose (PLANTIER et al., 2016).

Em outro trabalho a metanálise foi usada para observar os genes diferencialmente expressos em amostras com leucemia promielocítica aguda comparando com amostras normais, obtiveram como resultado 647 DEG superexpressos e 465 subexpressos. Foi observado que genes importantes no desenvolvimento do câncer, como o proto-oncogene JUN, foi superexpresso na análise, além de outros genes envolvidos indiretamente com a patogênese como MAPK1, MAPK9 e AP-1 (JALILI et al., 2017). Usando amostras de tumor de cólon e amostras de tecido da mucosa normal adjacente foi feita a metanálise, com resultado de 286 genes superexpressos e 411 subexpressos. Os resultados das anotações funcionais mostraram que DEG superexpressos estavam envolvidas em funções relacionadas ao ciclo celular, enquanto que os subexpressos, a funções associadas à homeostase. Foi observado também genes importantes para o desenvolvimento do câncer, como COL1A1, COL1A2 e MMP9 (SHEN et al., 2016).

Muitos artigos sobre câncer têm relatados genes importantes no desenvolvimento da doença. Os genes que são relatados de forma frequente têm sido considerados relevantes para o câncer, enquanto que os descritos apenas esporadicamente são tidos como ruído. Embora estas listas sejam úteis para resumir os candidatos biomarcadores atuais, a significância estatística do nível de sobreposição geralmente não é considerada (CHAN et al., 2008), da mesma forma os estudos de *microarray* relacionados ao *T. cruzi* apresentam falhas já descritas. Uma forma de agrupar esses dados é através da metanálise.

A metanálise pode contribuir para melhorar a confiabilidade e generalização dos resultados. A partir dela tem sido produzido novos *insights* biológicos, bem como a identificação de biomarcadores candidatos mais robustos e confiáveis e alvos terapêuticos (CHOW; ALIAS; JAMAL, 2017). Há poucos estudos usando a tecnologia da metanálise, no caso de doenças negligenciadas isso ainda é mais acentuado. Em estudos sobre infecção por *T. cruzi* pode-se ver essa lacuna, a começar pelos estudos usando as análises por *microarray*, são poucos e com poucas amostras. O que reflete em outras áreas de estudo. Por isso a metanálise feita no presente estudo tem muito a agregar na elucidação de questões sobre o desenvolvimento da doença de Chagas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral:

Identificar genes que são diferencialmente expressos em amostras infectadas com *T. cruzi*, bem como as vias enriquecidas e perfil imunológico.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Identificar os genes diferencialmente expressos nas fases inicial, média e tardia da infecção comparando *microarrays* públicos de células/tecidos infectados com *T. cruzi*
2. Identificar as vias enriquecidas com genes diferencialmente expressos nas células infectadas por *T. cruzi*
3. Analisar o perfil inflamatório gerado entre os estudos desde a fase inicial até a fase tardia e o perfil de células T CD4⁺ estimulado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Recuperação das amostras e dados de expressão gênica

Foram selecionadas 13 séries independentes de *microarray* comparando amostras infectadas com *T. cruzi* contra amostras não infectadas (controle). As amostras foram recuperadas do banco de dados GEO/NCBI usando o pacote GEOquery (SEAN; MELTZER, 2007) do Bioconductor/R (GENTLEMAN et al., 2004), e são referidas como series 1-13. As series 1-11 GSE85996(JUIZ et al., 2017), GSE75821 (UDOKO et al., 2016), GSE41089 (SILVA et al., 2013), GSE20087 (ZHANG et al., 2010), GSE18175 (ADESSE et al., 2010), GSE17363 (SOARES et al., 2010), GSE17330 (GOLDENBERG et al., 2009), GSE16416 (MOTT; COSTALES; BURLEIGH, 2011), GSE13791 (COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009), GSE13522 (CHESSLER et al., 2009) e GSE7047 (SHIGIHARA et al., 2008), foram usadas em publicações peer-reviewed, enquanto que as séries GSE57738 e GSE28921 (12 e 13) são compostas de dados de expressão não publicados. As séries recuperadas apresentaram expressão gênica dos organismos *Homo sapiens*, *M. musculus* e *Rattus norvegicus*. As cepas de *T. cruzi* usadas nas infecções dessas amostras recuperadas foram *T. cruzi* K98, *T. cruzi* VD, *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Brazil, *T. cruzi* CL, *T. cruzi* Tulahuen, *T. cruzi* G. As amostras usadas foram, infecção *in vitro* de fibroblastos, macrófagos, músculo liso, cardiomiócitos, HeLa, e infecção *in vivo* de camundongo ou rato, avaliando o tecido do coração, timo, baço, medula óssea e placenta. O tempo de infecção está na faixa de 60 minutos a estudos com 8 meses.

4.2 Detecção de genes diferencialmente expressos

Os genes diferencialmente expressos (DEG) foram detectados usando o pacote limma 3.4 (SMITH, 2005) (RITCHIE et al., 2015) do Bioconductor/R. Foram considerados DEG os genes que apresentaram logFC maior que 1 (superexpressos) ou menor que -1 (subexpressos), e valor p ajustado por taxa de descoberta falsa (False Discovery Rate - FDR) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995)(BENJAMINI, 2010) menor que 0.05. Os estudos foram analisados separadamente criando desenhos experimentais de comparação das amostras infectadas contra amostras controle, sempre criando grupos com mesmo hospedeiro, cepa de *T. cruzi*, e tempo de infecção.

4.3 Vias enriquecidas com DEG

Os DEG foram usados para análise de vias do banco de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (KANEHISA; GOTO, 2000)(KANEHISA et al., 2016), através do STRINGDB (SZKLARCZYK et al., 2015). A busca pelas vias enriquecidas foi realizada usando o identificador UNIPROT de cada DEG. As vias enriquecidas com os genes superexpressos foram consideradas ativadas, as vias enriquecidas com gene subexpressos, foram consideradas desligadas ou diminuídas. Foram consideradas significantes as vias enriquecida com no mínimo menos 5 genes e valor p menor que 0.05.

4.4 Metanálise

As comparações grupo controle vs. infectado foram divididas em três fases para identificar o compartilhamento de DEG entre as amostras infectadas. Fase inicial, até 12 horas depois da infecção, média até 21 dias depois da infecção, e fase final com mais de 21 dias de infecção, sendo que apenas um grupo se adequou nessa fase. Também foi verificado a frequência de DEG compartilhados entre todas as amostras infectadas. Os DEG mais frequentes em cada fase temporal foram recuperados para encontrar a resposta principal induzida pela infecção.

Também foram comparadas as vias enriquecidas entre os estudos, verificando a frequência das vias. A frequência das vias enriquecidas foi realizada nas três fases de tempo descritas e também entre todas as comparações. As vias frequentes foram consideradas como vias importantes por serem uma resposta compartilhada entre as diferentes infecções por *T. cruzi*.

4.5 Indução da diferenciação dos linfócitos T CD4⁺

A indução para diferenciação das células linfócitos T CD4⁺ foi verificada através da presença de DEG codificadores de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, TGF- β , IL-6, IL-1, IL-2, IL-13, IL-5, IL-10, IL-17, IL-18, IL-21) e receptores (IL12R, IL4R, IL23R, IL17R, IL2R, IL6R). A presença desses genes nas diferentes comparações entre amostras controles e infectadas e a presença desses DEG em uma mesma comparação foi avaliada para compreender o tipo de diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ induzida pela infecção por *T. cruzi*.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS ABUL K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. [s.l.: s.n.]v. 7^a ed.
- ABEL, L. C. J.; FERREIRA, L. R. P.; CUNHA NAVARRO, I.; BARON, M. A.; KALIL, J.; GAZZINELLI, R. T.; RIZZO, L. V.; CUNHA-NETO, E. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by trypanosoma cruzi is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. Ccc, 2014.
- ADESSE, D.; GARZONI, L. R.; MEIRELLES, M. D. N.; IACOBAS, D. A.; IACOBAS, S.; SPRAY, D. C.; TANOWITZ, H. B. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of Trypanosoma cruzi. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 846–854, 2010.
- ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A.; ALVAREZ, M. G.; ARMENTI, A. H.; BERTOCHI, G.; TARLETON, R. L.; POSTAN, M. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int Immunol**, v. 18, n. 3, p. 465–471, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431876>>.
- ALBERTTI, L. A. G.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; ANDREWS, N. W.; ANDRADE, L. O. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in Trypanosoma cruzi invasion and intracellular development. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 10, p. 784–789, 2010.
- ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; WEATHERLY, D. B.; ALBAREDA, M. C.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; OLIVERA, C.; ARMENTI, A. H.; TARLETON, R. L.; LAUCELLA, S. A. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8⁺ T cells in chronic Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e288, 2008.
- ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intrapagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627–6640, 2011.
- ARASAPPAN, D.; TONG, W.; MUMMANENI, P.; FANG, H.; AMUR, S. Meta-analysis of

microarray data using a pathway-based approach identifies a 37-gene expression signature for systemic lupus erythematosus in human peripheral blood mononuclear cells. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 65, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/65>>.

AYO, C. M.; DALALIO, M. M. D. O.; VISENTAINER, J. E. L.; REIS, P. G.; SIPPERT, E. Â.; JARDULI, L. R.; ALVES, H. V.; SELL, A. M. Genetic Susceptibility to Chagas disease: An overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

BABIOR, B. M. **The respiratory burst of phagocytes** *Journal of Clinical Investigation*, 1984. .

BAECHLER, E. C.; BATLIWALLA, F. M.; KARYPIS, G.; GAFFNEY, P. M.; ORTMANN, W. A.; ESPE, K. J.; SHARK, K. B.; GRANDE, W. J.; HUGHES, K. M.; KAPUR, V.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2610–5, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BARKETT, M.; GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel / NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6910–6924, 1999.

BARTHOLOMEU, D. C.; CERQUEIRA, G. C.; LEÃO, A. C. A.; DAROCHA, W. D.; PAIS, F. S.; MACEDO, C.; DJIKENG, A.; TEIXEIRA, S. M. R.; EL-SAYED, N. M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407–3417, 2009.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-315X/full/v3/i1/%5Cn.htm>>.

BENJAMINI, Y. Discovering the false discovery rate. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology**, v. 72, n. 4, p. 405–416, 2010.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. **Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach To Multiple Testing** *Journal of the Royal Statistical Society Series B-*

Methodological, 1995. .

BERGERON, M.; OLIVIER, M. Nitric Oxide Output in Macrophages Is γ - Mediated IFN- Trypanosoma cruzi Trypanosoma cruzi-Mediated IFN- \square -Inducible Nitric Oxide Output in Macrophages Is Regulated by iNOS mRNA Stability 1. **J Immunol References**, v. 177, p. 6271–6280, 2016. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/177/9/6271%5Cnhttp://www.jimmunol.org/>>.

BLANCHETTE, J.; JARAMILLO, M.; OLIVIER, M. Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. **Immunology**, v. 108, n. 4, p. 513–522, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2567.2003.01620.x>>.

BONNEY, K. M.; TAYLOR, J. M.; THORP, E. B.; EPTING, C. L.; ENGMAN, D. M. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. **Parasitology Research**, v. 114, n. 3, p. 1167–1178, 2015.

BOTELHO, M.; SOARES, P.; LIMA, R. S. De; ROCHA, L. L.; VASCONCELOS, J. F.; ROGATTO, S. R.; RIBEIRO, R.; IACOBAS, S.; GOLDENBERG, R. C.; IACOBAS, D. A.; BERNARD, H.; CARLOS, A.; CARVALHO, C. De; SPRAY, D. C. NIH Public Access. **System**, v. 202, n. 3, p. 416–426, 2011.

BOTERO, A.; KEATLEY, S.; PEACOCK, C.; THOMPSON, R. C. A. In vitro drug susceptibility of two strains of the wildlife trypanosome, Trypanosoma copemani : A comparison with Trypanosoma cruzi. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 34–41, 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320716301142>>.

BROWN, P.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nat Genet**, v. 21, n. 1 Suppl, p. 33–37, 1999. Disponível em: <[citeulike-article-id:523892%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/4462](http://dx.doi.org/10.1038/4462)>.

BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; VIGLIANO, C.; BISIO, M.; RISSO, M.; DUFFY, T. S.; CURA, C.; BRUSSES, B.; FAVALORO, L.; LEGUIZAMON, M. S.; LUCERO, R. H.; LAGUENS, R.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R.; SCHIJMAN, A. G.; SCHIJMAN, A. G. Molecular Identification of Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 485–495, 2010.

CAI, C. W.; BLASE, J. R.; ZHANG, X.; EICKHOFF, C. S.; HOFT, D. F. Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 10, 2016.

CAMPO, V. A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 23–33, 2017.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28038431>%0A<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320716300574>>.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–34, 1996. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. **Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection***Frontiers in Immunology*, 2016. .

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I.

Trypanosoma cruzi Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102053>>.

CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

CHAN, S. K.; GRIFFITH, O. L.; TAI, I. T.; JONES, S. J. M. Meta-analysis of colorectal cancer gene expression profiling studies identifies consistently reported candidate biomarkers. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, n. 3, p. 543–552, 2008.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Research and Development: Is There Light at the End of the Tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2016.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037016300836>>.

CHEN, F. E.; GHOSH, G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription

factors: structural views. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6845–6852, 1999.

CHEN, L.; WATANABE, T.; WATANABE, H.; SENDO, F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB / c, but protects C57BL / 6 mice through modulating the Th1 / Th2 dichotomy in different directions. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 265–275, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265643>%5Cn<http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4141%28200101%2931%3A1%3C265%3A%3AAID-IMMU265%3E3.0.CO%3B2-L>>.

CHESSLER, A.-D. C.; UNNIKRISHNAN, M.; BEI, A. K.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. a. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 4, p. 2288–2296, 2009.

CHOW, Y.-P.; ALIAS, H.; JAMAL, R. Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 120, 2017. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3103-1>>.

COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 252, 2009. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-252>>.

CUCUNUBÁ, Z. M.; MANNE-GOEHLER, J. M.; DÍAZ, D.; NOUVELLET, P.; BERNAL, O.; MARCHIOL, A.; BASÁÑEZ, M.-G.; CONTEH, L. How universal is coverage and access to diagnosis and treatment for Chagas disease in Colombia? A health systems analysis. **Social Science & Medicine**, v. 175, 2017.

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

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C. N.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and

enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951–961, 2011.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A. M.; MELO, R. C. N. Lipid bodies: Inflammatory organelles implicated in host-trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation**, 2012. .

DA MATTA GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R. S.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, 2010.

DE ARAÚJO, F. F.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANTAS, P. R. Z.; GOMES, J. A. S.; SATHLER-AVELAR, R.; ROCHA, M. O. C.; ELÓI-SANTOS, S. M.; PINHO, R. T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011. .

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in Trypanosoma cruzi and their role in infectivity. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, 2012.

DÍAZ LOZANO, I. M.; DE PABLOS, L. M.; LONGHI, S. A.; ZAGO, M. P.; SCHIJMAN, A. G.; OSUNA, A. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from Trypanosoma cruzi carrying the conserved MASP N-terminal region. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 44451, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep44451>>.

DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 259–262, 2009.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–291, 2010.

FALLIS, A. . Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. **Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: A**

unique strategy that promotes persistenceFEMS Microbiology Reviews, 2012. .

FRATTI, R. A.; BACKER, J. M.; GRUENBERG, J.; CORVERA, S.; DERETIC, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 3, p. 631–644, 2001.

GEIGER, A.; BOSSARD, G.; SERENO, D.; PISSARRA, J.; LEMESRE, J. L.; VINCENDEAU, P.; HOLZMULLER, P. **Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids**Frontiers in Immunology, 2016. .

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. Y. H.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. **Cell**, v. 109, n. 2 SUPPL. 1, p. 81–96, 2002.

GOES, G. R.; ROCHA, P. S.; DINIZ, A. R. S.; AGUIAR, P. H. N.; MACHADO, C. R.; VIEIRA, L. Q. Trypanosoma cruzi Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.

GOLDENBERG, R. C. dos S.; IACOBAS, D. A.; IACOBAS, S.; ROCHA, L. L.; DA SILVA DE AZEVEDO FORTES, F.; VAIRO, L.; NAGAJYOTHI, F.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C. Transcriptomic alterations in Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1140–1149, 2009.

GOONESEKERE, N. C. W.; WANG, X.; LUDWIG, L.; GUDA, C. A meta analysis of pancreatic microarray datasets yields new targets as cancer genes and biomarkers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014.

HALL, B. F.; WEBSTER, P.; MA, a K.; JOINER, K. a; ANDREWS, N. W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by Trypanosoma cruzi: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. August, p. 313–325, 1992.

HALL, B. S.; TAM, W.; SEN, R.; PEREIRA, M. E. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection.

Molecular biology of the cell, v. 11, n. 1, p. 153–160, 2000.

HIGUERA, S. L.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 112, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3641988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

JAFARI, P.; AZUAJE, F. An assessment of recently published gene expression data analyses: reporting experimental design and statistical factors. **BMC medical informatics and decision making**, v. 6, p. 27, 2006.

JALILI, M.; SALEHZADEH-YAZDI, A.; MOHAMMADI, S.; YAGHMAIE, M.; GHAVAMZADEH, A. Meta-Analysis of Gene Expression Profiles in Acute Promyelocytic Leukemia Reveals Involved Pathways. v. 11, n. 1, p. 1–12, 2017.

JUIZ, N. A.; SOLANA, M. E.; ACEVEDO, G. R.; BENATAR, A. F.; RAMIREZ, J. C.; DA COSTA, P. A.; MACEDO, A. M.; LONGHI, S. A.; SCHIJMAN, A. G. Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005436, mar. 2017.

KANEHISA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, 2016.



KANEHISA, M.; GOTO, S. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 27–30, 2000.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/166/7/4596.full>>.

LEGUIZAMO, M. S.; MOCETTI, E. trans -Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Apoptosis in Cells from the Immune System In Vivo. p. 3–7, [s.d.]

LI, W.; HOFER, M. J.; SONGKHUNAWAJ, P.; JUNG, S. R.; HANCOCK, D.; DENYER,

G.; CAMPBELL, I. L. **Type i interferon-regulated gene expression and signaling in murine mixed glial cells lacking signal transducers and activators of transcription 1 or 2 or interferon regulatory factor 9.** [s.l.: s.n.]

LIA, N.; COUTO 1 , F.; PEDERSANE 1 , D.; REZENDE, L.; DIAS, P. P.; CORBANI, T. L.; BENTINI, L. C.; OLIVEIRA, A. C. S.; KELLES, L. F.; CASTRO-GOMES, T.; ANDRADE, L. O. LAMP-2 absence interferes with plasma membrane repair and decreases *T. cruzi* host cell invasion. p. 1–21, 2017.

LIDANI, K. C. F.; DE MESSIAS-REASON, I. J.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A. R. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. April, p. 1–14, 2017. Disponível em:
<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00607/full>>.

MAGANTO-GARCIA, E.; PUNZON, C.; TERHORST, C.; FRESNO, M. Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 is Required for *Trypanosoma cruzi* Internalization and Replication in Macrophages. **Traffic**, v. 9, n. 8, p. 1299–1315, 2008.

MAKAREV, E.; IZUMCHENKO, E.; AIHARA, F.; WYSOCKI, P. T.; ZHU, Q.; BUZDIN, A.; SIDRANSKY, D.; ZHAVORONKOV, A.; ATALA, A. Common pathway signature in lung and liver fibrosis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, p. 1–7, 2016. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27267766>>.

MARTIN, D. L.; WEATHERLY, D. B.; LAUCELLA, S. A.; CABINIAN, M. A.; CRIM, M. T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, S. H.; ROSENBERG, C. S.; COLLINS, M. H.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, R. L. CD8+ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 8, p. 0731–0740, 2006.

MENGEL, J.; CARDILLO, F.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Chronic Chagas' disease: Targeting the interleukin-2 axis and regulatory T cells in a condition for which there is no treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–4, 2016.

MESENTER, L. A.; MILES, M. A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 8, p. 995–1029, 2015. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2015.1056158>>.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*.

BMC Genomics, v. 10, n. 1, p. 370, 2009. Disponível em:

<<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-370>>.

MORROT, A.; VILLAR, S. R.; GONZÁLEZ, F. B.; PÉREZ, A. R. **Evasion and immunendocrine regulation in parasite infection: Two sides of the same coin in chagas disease?** *Frontiers in Microbiology*, 2016. .

MOTT, G. A.; COSTALES, J. A.; BURLEIGH, B. A. A Soluble Factor from *Trypanosoma cruzi* Inhibits Transforming Growth Factor- β -Induced MAP Kinase Activation and Gene Expression in Dermal Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e23482, set. 2011.

MUCCI, J.; HIDALGO, A.; MOCETTI, E.; ARGIBAY, P. F.; LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3896–901, 2002.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NAVARRETE-SANDOVAL, R. H.; SERVÍN-ROJAS, M. Bug Smash, Bug Splash: A Case Report of an Unusual Transmission of American Trypanosomiasis with a Brief Review of the Literature. **American Journal of Case Reports**, v. 17, p. 993–996, 2016. Disponível em:

<<http://www.amjcaserep.com/abstract/index/idArt/900539>>.

NOGUEIRA, L. G.; SANTOS, R. H. B.; IANNI, B. M.; FIORELLI, A. I.; MAIRENA, E. C.; BENVENUTI, L. A.; FRADE, A.; DONADI, E.; DIAS, F.; SABA, B.; WANG, H. T. L.; FRAGATA, A.; SAMPAIO, M.; HIRATA, M. H.; BUCK, P.; MADY, C.; BOCCHI, E. A.; STOLF, N. A.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853, 1999.

PARENTE, C. C.; BEZERRA, F. S. M.; PARENTE, P. I.; DIAS-NETO, R. V.; XAVIER, S. C. C.; RAMOS, A. N.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LIMA, M. M. Community-Based Entomological Surveillance Reveals Urban Foci of Chagas Disease Vectors in Sobral, State of Ceará, Northeastern Brazil. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. e0170278, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170278>>.

PAVANI, R. S.; DA SILVA, M. S.; FERNANDES, C. A. H.; MORINI, F. S.; ARAUJO, C. B.; FONTES, M. R. de M.; SANT'ANNA, O. A.; MACHADO, C. R.; CANO, M. I.; FRAGOSO, S. P.; ELIAS, M. C. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of Trypanosoma cruzi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005181, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984589>%0Ahttp://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005181>.

PETERSEN, C. A.; KRUMHOLZ, K. A.; BURLEIGH, B. A. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by Trypanosoma cruzi. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6974–6980, 2005.

PETERSEN, C. A.; KRUMHOLZ, K. A.; CARMEN, J.; SINAI, A. P.; BURLEIGH, B. A. Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1580–1587, 2006.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTÍNEZ, A.; RADI, R. Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 7, p. 723–34, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458250>>.

PLANTIER, L.; RENAUD, H.; RESPAUD, R.; MARCHAND-ADAM, S.; CRESTANI, B. Transcriptome of Cultured Lung Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis : Meta-Analysis of Publically Available Microarray Datasets Reveals Repression of Inflammation and Immunity Pathways. 2016.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375–86, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864272>>.

PONCE, N. E.; CANO, R. C.; CARRERA-SILVA, E. A.; LIMA, A. P.; GEA, S.; AOKI, M.

P. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 2, p. 145–155, 2012.

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant **Journal of Biological Chemistry**, 2013. .

RAMASAMY, A.; MONDRY, A.; HOLMES, C. C.; ALTMAN, D. G. Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1320–1332, 2008.

RASSI, A.; MARIN, J. A.; RASSI, A.; NETO; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28225900>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5319366>.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281–1283, 2004.

RIES, J.; KOMAREK, A.; GOTTSCHALK, J.; BRAND, B.; AMSLER, L.; JUTZI, M.; FREY, B. M. A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 415–417, 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/?doi=10.1159/000446264>>.

RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B.; WU, D.; HU, Y.; LAW, C. W.; SHI, W.; SMYTH, G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015.

RODRIGUES, A. A.; SAOSA, J. S. S.; DA SILVA, G. K.; MARTINS, F. A.; DA SILVA, A. A.; DA SILVA SOUZA NETO, C. P.; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V; DA SILVA, C. V. IFN-?? plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi* : Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

ROFF, M.; THOMPSON, J.; RODRIGUEZ, M. S.; JACQUE, J.; BALEUX, F.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; HAY, R. T. Role of I κ B γ Ubiquitination in Signal-induced Activation of NF- κ B in Vivo *. v. 271, n. 13, p. 7844–7850, 1996.

SANMARCO, L. M.; VISCONTI, L. M.; EBERHARDT, N.; RAMELLO, M. C.; PONCE, N. E.; SPITALE, N. B.; VOZZA, M. L.; BERNARDI, G. A.; GEA, S.; MINGUEZ, A. R.; AOKI, M. P. IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. **Frontiers in immunology**, v. 7, n. December, p. 626, 2016.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066435>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5179535>>.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: What must be understood? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 246–251, 2009.

SEAN, D.; MELTZER, P. S. GEOquery: A bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1846–1847, 2007.

SHALINI, S.; DORSTYN, L.; DAWAR, S.; KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell death and differentiation**, v. 22, n. 4, p. 526–39, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4356345&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SHEN, X.; YUE, M.; MENG, F.; ZHU, J.; ZHU, X.; JIANG, Y. Microarray analysis of differentially-expressed genes and linker genes associated with the molecular mechanism of colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 12, n. 5, p. 3250–3258, 2016.

SHIGIHARA, T.; HASHIMOTO, M.; SHINDO, N.; AOKI, T. Transcriptome profile of Trypanosoma cruzi-infected cells: Simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 715–722, 2008.

SILVA, G. K.; COSTA, R. S.; SILVEIRA, T. N.; CAETANO, B. C.; HORTA, C. V.; GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. D.; ANDRADE, W. a; DE NIZ, M.; GAZZINELLI, R. T.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 beta Response and Host

Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373–3383, 2013.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966627>%5Cn<http://www.jimmunol.org/content/191/6/3373.full.pdf>%5Cn%3CGo to ISI%3E://WOS:000324206900055>.

SLODKOWSKA, E. a; ROSS, J. S. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 9, n. 5, p. 417–422, 2009.

SMITH, G. K. limma: Linear Models for Microarray Data. **Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor**, n. 2005, p. 397–420, 2005.

SOARES, M. B. P.; DE LIMA, R. S.; ROCHA, L. L.; VASCONCELOS, J. F.; ROGATTO, S. R.; DOS SANTOS, R. R.; IACOBAS, S.; GOLDENBERG, R. C.; IACOBAS, D. A.; TANOWITZ, H. B.; DE CARVALHO, A. C. C.; SPRAY, D. C. Gene Expression Changes Associated with Myocarditis and Fibrosis in Hearts of Mice with Chronic Chagasic Cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 416–426, ago. 2010.

SOUSA, G. R.; GOMES, J. A. S.; DAMASIO, M. P. S.; NUNES, M. C. P.; COSTA, H. S.; MEDEIROS, N. I.; FARES, R. C. G.; CHAVES, A. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O. C. The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0172833, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0172833>>.

SOUZA, R. T.; LIMA, F. M.; BARROS, R. M.; CORTEZ, D. R.; SANTOS, M. F.; CORDERO, E. M.; RUIZ, J. C.; GOLDENBERG, S.; TEIXEIRA, M. M. G.; DA SILVEIRA, J. F. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

STAHL, P.; RUPPERT, V.; SCHWARZ, R. T.; MEYER, T. *Trypanosoma cruzi* evades the protective role of interferon-gamma-signaling in parasite-infected cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014a.

STAHL, P.; SCHWARZ, R. T.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; MEYER, T. *Trypanosoma cruzi* parasites fight for control of the JAK-STAT pathway by disarming their host. **Jak-Stat**, v. 3, n. 4, p. e1012964, 2014b. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21623996.2015.1012964>>.

STEMPIN, C. C.; ROJAS MARQUEZ, J. D.; ANA, Y.; CERBAN, F. M. GRAIL and Otubain-1 are Related to T Cell Hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005307, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005307>>.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

UDOKO, A. N.; JOHNSON, C. A.; DYKAN, A.; RACHAKONDA, G.; VILLALTA, F.; MANDAPE, S. N.; LIMA, M. F.; PRATAP, S.; NDE, P. N. Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2016.

VALIENTE-GABIOUD, A. A.; VEAUTE, C.; PERRIG, M.; GALAN-ROMANO, F. S.; SFERCO, S. J.; MARCIPAR, I. S. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 672–679, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.011>>.

VERHASSELT, Â.; CONNAN, F.; OVERTVELT, L. Van; ANDRIEU, M.; CHOPPIN, J.; VERCRUYSSSE, V.; GOLDMAN, M.; HOSMALIN, A.; VRAY, B.; CP, Â. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to speci @ c CD8 + T lymphocytes. v. 14, n. 10, p. 1135–1144, 2002.

WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. **Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways** **Frontiers in Microbiology**, 2016. .

WEATHERLY, D. B.; PENG, D.; TARLETON, R. L. Recombination-driven generation of the largest pathogen repository of antigen variants in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 729, 2016. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3037-z>>.

WILSON, M. R. Apoptosis: unmasking the executioner. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 8, p. 646–

652, 1998.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, 2006. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652006000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

ZHANG, S.; KIM, C. C.; BATRA, S.; MCKERROW, J. H.; LOKE, P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, 2010.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

CAPÍTULO 1