



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Análise bioinformática de miRNAs putativos em sequências de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma humano

Estudante: Marina Dias Marques – 17/0051137

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Machado Hecht

MARINA DIAS MARQUES

Análise bioinformática de miRNAs putativos em sequências de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma humano

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Machado Hecht

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

- Madre Teresa de Calcutá

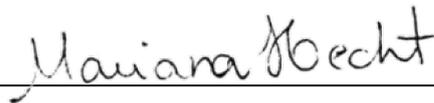
Dedico este trabalho a todas as mulheres do mundo, que jamais nos falte oportunidades e reconhecimento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Dias Marques

Análise bioinformática de miRNAs putativos em sequências de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma humano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.



Profa. Dra. Mariana Machado Hecht
Universidade de Brasília



Ester Cardoso Paes Rose Gonzales
(Membro avaliador)

AGRADECIMENTOS

À natureza e toda sua energia que nos rodeia, aos seus mistérios e à sua ciência.

Aos meus pais, Marcos Wilson e Maria Custódia, que sempre acreditaram em mim e investiram intensamente não apenas na minha graduação, mas na minha formação como ser humano. Obrigada por todo carinho e apoio, vocês são meu porto seguro, amo vocês para sempre.

Ao meu namorado e melhor amigo, João Victor Antunes, que sempre foi colo para meus momentos de ansiedade e sempre me fez ver a luz no final do túnel. Cheguei ao fim de mais uma jornada na minha vida e minha gratidão é imensa, pois olho para o lado e tenho meu parceiro de vida toda junto comigo, obrigada por estar aqui mais uma vez, te amo muito.

A minha professora orientadora, doutora Mariana Hecht, que desde meu segundo semestre no curso vem me abrindo diversas portas. Meu interesse pela ciência possui muita influência sua, sou muito grata por admirar tanto minha orientadora.

A minha mãe científica e minha amiga, Nayra Suélen, que inicialmente era para apenas me auxiliar num projeto científico, porém cultivamos uma amizade incrível. Obrigada pelo apoio e por toda ajuda durante meus anos de pesquisa na graduação, é muito gratificante saber que sou rodeada de mulheres incríveis como você - que é uma de minhas inspirações. Sinto falta dos nossos dias no laboratório, prometo marcar de almoçarmos juntas mais vezes.

Aos meus amigos que compõem comigo o quarteto mais insuportável da FS: Carlito Junior, Edson Aliel e Fernanda Baldomir. Obrigada pelas fofocas, pelos grupos, pela ajuda nas matérias, por compartilhar o riso e o choro. É com grande aperto no coração que escrevo esses agradecimentos, pois sei que nossos dias almoçando juntos no chão do Cora Coralina chegaram definitivamente ao seu fim, mas sei que a vida há de nos juntar novamente.

Às minhas queridas amigas: Anna Katharina Barbosa, Andressa Sant'Anna e Kimberly Miranda. Sei que não tivemos a amizade mais inabalável de todas, mas é com muito carinho que sempre as carregarei no coração. Espero poder agradecer cada uma pessoalmente em breve, em especial à Anna que sempre esteve comigo independente da situação e sempre foi muito presente na minha vida - você é muito especial para mim, te valorizo e te adoro!

Aos meus amados amigos que a UnB me trouxe: Paulo José e Eduardo Guimarães. Apesar de ficarmos tempos sem entrar em contato, toda vez que conversamos é como se nos conhecêssemos há 10 anos, inacreditável.

Ao meu grupo não científico: Giovana Kim, Lucas e Bruno dos Reis, Franco Diniz, Gabriel Balduino, Tamara Taveres e Fabrícia Guggiana. Nossa conexão é inexplicável e palavras são insuficientes para demonstrar o quão especial vocês são para mim. Obrigada por absolutamente tudo, sinto que somos indestrutíveis.

A minha irmã de consideração, Giovanna Vilasboa, que desde pequena foi minha melhor companhia. Apesar de seguirmos em caminhos diferentes, nossa ligação ainda existe e está mais forte do que nunca, e espero que continue assim.

Às minhas AmigAnvisas: Ana Beatriz Perez, Sonia Ariane, Uilma Moura e Victória Azevedo. Quem diria que um estágio traria presentes tão preciosos para a minha vida. Obrigada pelas fofocas, pelas festinhas na COIFA e pelos desabafos, o tempo de estágio acaba, mas a nossa amizade prevalecerá, tenho certeza.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que cruzaram o meu caminho durante esse período da minha vida, que foi a graduação. Dizem que mudamos a cada encontro, pois acooplamos um pedacinho de cada pessoa durante a nossa jornada. Gostaria de agradecer pelo pedaço que cada um deixou em mim, inclusive você que está lendo esse trabalho. Espero que o pedaço que deixei em você seja especial também, guarde com carinho.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC) e já existe a comprovação de que esse protozoário é capaz de transferir parte de seu material genético para o genoma do hospedeiro. Este estudo buscou realizar uma avaliação bioinformática de miRNAs putativos em sequências de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma humano, uma vez que essa integração poderia dar origem a novas moléculas, entre elas os miRNAs, responsáveis pelo silenciamento pós-transcricional de proteínas. Desta forma, esse mecanismo poderia estar intimamente relacionado à patogênese da DC. Para tal investigação, foram analisadas sequências de integração do kDNA depositadas no genBank para a identificação de miRNAs putativos por meio do MiRBase. Em seguida, foram avaliados os possíveis alvos do miRNA por meio do MiRDB e, por fim, o Enrichr foi usado para identificar possíveis vias em que o miRNA estaria atuando, enquanto o RNAfold foi utilizado para previsão de sua estrutura. Nossos resultados demonstraram que a integração do kDNA no genoma do hospedeiro humano possui potencial de originar novas moléculas, entre elas miRNAs, capazes de gerar alterações genéticas que podem estar intimamente correlacionadas com a patogênese da DC, o que ajudaria a elucidar a fisiopatologia da doença. Além disso, esses miRNAs ainda podem ser utilizados como biomarcadores e alvo farmacêutico da DC, abrindo um novo horizonte para o diagnóstico e tratamento dessa enfermidade.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, microRNA, bioinformática

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas' disease (CD), a hemoflagellate protozoa that is able of transferring part of its genetic material to the host's genome. This study performed a bioinformatic evaluation to identify putative miRNAs in *T. cruzi* kDNA sequences integrated into the human genome, since this integration could give rise to new molecules, including miRNAs, required by the post-transcriptional silencing of proteins. Theoretically, this mechanism could be related to the pathogenesis of CD. For this investigation, the kDNA integration sequences deposited in GenBank were analyzed for the identification of putative miRNAs through MiRBase. Next, possible miRNA targets were obtained through MiRDB analysis and, finally, Enrichr algorithm was used to identify the possible pathways in which miRNA is acting, while RNAfold was used to predict its structure. Our results demonstrated that an integration of kDNA into the human host genome has the potential to generate new molecules, including miRNAs, capable of generating genetic changes that may prompt CD pathogenesis. Furthermore, these miRNAs can still be used as biomarkers and pharmaceutical target of CD, opening a new horizon for the diagnosis and treatment of this disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, microRNA, bioinformatics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	20
Figura 2.....	25
Figura 3.....	30
Figura 4.....	31
Figura 5.....	34
Figura 6.....	34
Figura 7.....	35
Figura 8.....	41
Figura 9.....	41
Figura 10.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	36
Tabela 2	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CSB	Regiões conservadas (<i>conserved sequence blocks</i>)
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK3	<i>Extracellular signal-regulated kinase 3</i>
gRNA	RNA guia
IgG	Imunoglobulina G
KCNQ5	Membro 5 da Subfamília Q do Canal de Potássio Controlado por Voltagem (<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 5</i>)
kDNA	DNA do cinetoplasto
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLRAP1	Proteína 1 do adaptador de receptor de lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1</i>)
MAPK6	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 6</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)

nt	Nucleotídeos
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open Region Frame</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chainreaction</i>)
pré-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primário
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNF138	<i>Ring Finger Protein 138</i>
rRNA	RNA ribossomal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Doença de Chagas.....	16
1.1.1. Aspectos Gerais.....	16
1.1.2. Transmissão e manifestações clínicas.....	17
1.1.3. Diagnóstico e Tratamento.....	18
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2.1. Aspectos Gerais e ciclo biológico.....	19
1.2.2. O DNA do cinetoplasto (kDNA).....	21
1.3. Patogênese.....	21
1.3.1. Teorias da Patogênese.....	21
1.3.2. Integração do kDNA no genoma do hospedeiro.....	23
1.4. MicroRNA.....	24
1.5. Justificativa.....	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivo específicos.....	28
3. METODOLOGIA	30
3.1. GenBank.....	30
3.2. miRBase.....	31
3.3. miRDB.....	32
3.4. Enrichr.....	32
3.5. RNAfold.....	33

4. RESULTADOS	33
4.1. Coleta de dados no GenBank (NCBI)	33
4.2. Avaliação de das sequências no miRBase.....	34
4.3. Identificação dos possíveis alvos dos miRNA encontrados no miRDB.....	36
4.4. Avaliação das possíveis vias de atuação dos miRNAs no Enrichr	38
4.5. Previsão das estruturas dos miRNAs.....	40
5. DISCUSSÃO	42
5.1. Sequência FM207374.1	45
5.2. Sequência FM207207.1	48
5.3. Considerações Finais	49
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Aspectos gerais

A doença de Chagas (DC) foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiano das Chagas, que anunciou a detecção do protozoário causador da doença, o *Trypanosoma cruzi*, em humanos em um relato minucioso e bastante completo. Esse descreveu diversos aspectos da doença e de seu agente etiológico, tais como a anatomia patológica, epidemiologia, etiologia, patogenia, profilaxia, sintomatologia, formas clínicas e meios de transmissão da DC (WHITE, 2008).

Mesmo depois de mais de 110 anos de sua descoberta, essa enfermidade permanece sem cura na fase crônica e seu tratamento é bastante limitado. Até hoje, a DC é considerada um dos maiores problemas de saúde pública na América Latina, sendo que os principais fatores determinantes para sua existência, expansão e estabelecimento são o subdesenvolvimento; a falta de prioridade política (falta de atenção no atendimento médico, no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e de novos medicamentos) e a pobreza (falta de saneamento básico, habitações precárias e próximas a matas). Tais fatores conferem a essa enfermidade o título de doença tropical negligenciada (DIAS et al., 2013; WESTPHALEN; BISUGO; ARAÚJO, 2012).

Estima-se que a DC acometa cerca de 6 milhões de pessoas no mundo inteiro, principalmente no Brasil, México e Argentina (WHO, 2017), gerando um ônus anual de cerca de 7,2 bilhões de dólares (CONNERS et al., 2016). Assim, os países da América Latina são considerados regiões endêmicas da doença. Porém, devido à globalização e a intensificação de rotas migratórias, esse problema vem estendendo-se também em regiões não-endêmicas, existindo relatos de casos no Japão, Estados Unidos, Europa, Austrália e Canadá (ANGHEBEN et al., 2011; BERN et al., 2011; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015; WESTPHALEN; BISUGO; ARAÚJO, 2012).

1.1 2 Transmissão e Manifestações clínicas

A principal e mais conhecida forma de transmissão do *T. cruzi* é a via vetorial, que ocorre por meio da contaminação da pele lesionada ou de mucosas do hospedeiro vertebrado com fezes eliminadas por insetos triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros, durante o repasto sanguíneo (ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005; TARTAROTTI; OLIVEIRA-AZEREDO; CERON, 2004). Além da via vetorial, a transmissão pode se dar de forma congênita, que ocorre de mãe infectada para o feto (BISIO et al., 2011); oral, que consiste na ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (YOSHIDA, 2008); por meio de transfusão de sangue e transplante de órgãos contaminados (CASTRO, 2009; KUN et al., 2009) e, em menor escala, por meio de acidentes laboratoriais ou hospitalares ao manipular amostras com a presença do parasito (DIAS; NETO, 2011), além de haver a comprovação experimental da transmissão por via sexual (RIBEIRO et al., 2016).

As manifestações clínicas da DC vão depender da fase da doença em que o indivíduo se encontra. São elas duas, a aguda e a crônica, que podem se apresentar tanto de forma indeterminada quanto de forma sintomática, o que confere a essa enfermidade um largo espectro clínico.

Logo após a infecção, o indivíduo adentra na fase aguda, caracterizada por uma alta parasitemia e, na maioria dos casos, se manifesta de maneira assintomática. Entretanto, alguns pacientes apresentam um quadro de sintomas leves e inespecíficos, como febre e mialgia, o que dificulta seu diagnóstico antecipado (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Sintomas mais característicos também podem aparecer, apesar de mais raros, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romana, relacionados a uma hipersensibilidade tardia aos antígenos do protozoário (FORSYTH et al., 2016; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Ademais, quadros mais graves nessa fase já foram relatados, podendo os pacientes apresentar miocardite, edema, adenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Em seguida, é estabelecida a fase crônica, a qual também é normalmente

assintomática, porém cerca de 30-40% dos infectados podem manifestar sintomas mais graves décadas depois da infecção inicial, sendo que 95,5% desses casos resultam em comprometimento cardíaco(dentre eles, 38,5% sofrem de morte súbita), e 7,5% apresentam desordens gastrointestinais (BERN et al., 2011; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Curiosamente, essa fase da doença é caracterizada por uma baixa parasitemia e alta concentração de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Dentre os sintomas mais comuns na forma cardíaca da doença, é possível pontuar a característica cardiomiopatia chagásica, que consiste no aumento do tamanho do coração do infectado devido a sua fibrose e hipertrofia, resultando em arritmias, bloqueios atrioventriculares e na miocardiopatia e, por consequência, é provável o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, manifestada em cerca de 56% dos doentes, sendo esse o quadro mais grave da DC (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; TEIXEIRA et al., 2011a). No que tange a forma digestiva, esta possui como manifestações bem descritas o aumento do esôfago (megaesôfago) e do intestino grosso (megacólon), regularmente gerando dificuldade na deglutição e constipação (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

1.1 3 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da DC na fase aguda geralmente é concluído ao se detectar o parasito no sangue, o que é possível devido à alta parasitemia característica. Comumente, essa detecção é feita em lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Na fase crônica, o ideal é que se detecte anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, usualmente pelas técnicas sorológicas de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta, uma vez que essa fase apresenta uma baixa concentração de parasitos (BERN, 2015). Outra forma de diagnóstico que ganhou bastante destaque devido à sua alta sensibilidade é a técnica molecular de reação de polimerase em cadeia (PCR), indicada

para a detecção precoce e tardia da infecção. Porém, existem algumas limitações da técnica para sua aplicação rotineira, como seu alto custo, o que restringe seu uso a laboratórios especializados (HAGSTRÖM et al., 2019; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006).

Em relação ao seu tratamento, atualmente existem dois medicamentos disponíveis no mercado, o benzonidazol e o nifurtimox. Além de ser um tratamento limitado, esses dois agentes apresentam importantes efeitos adversos, como parestesia e anorexia, e não apresentam eficácia comprovada na fase crônica da doença (COSTA et al., 2018; DE PONTES et al., 2010; WILKINSON et al., 2008). Tal cenário ilustra a larga necessidade de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos e para amplificar o conhecimento acerca da patogênese dessa doença (RIBEIRO et al., 2020).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Aspectos gerais e ciclo biológico

O *T. cruzi* é o agente etiológico da DC. É um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e pertencente à família Trypanomastidae. Ele pode se apresentar no hospedeiro vertebrado na forma de amastigota (forma intracelular e replicativa) e como tripomastigota (extracelular circulante); no triatomíneo, pode se apresentar como epimastigota (multiplicativa) e tripomastigota metacíclico (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) (SOARES SOBRINHO et al., 2007; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Uma característica morfológica importante desse protozoário é a presença de uma mitocôndria tubular única, onde se encontra o cinetoplasto, uma estrutura em formato de disco que possui uma rede de DNA extranuclear denominada de DNA do cinetoplasto (kDNA).

O ciclo biológico do parasito se inicia quando o mesmo é ingerido pelo inseto vetor no instante do repasto sanguíneo em animais infectados. A forma ingerida é a tripomastigota sanguínea que, no organismo do triatomíneo, se diferencia em epimastigotas, as quais migram para o intestino do inseto, se multiplicam por divisão

binária e, por fim, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. Posteriormente, essa forma é eliminada nas fezes do invertebrado no momento em que ele realiza o repasto sanguíneo em um mamífero não infectado. A infecção ocorre quando o protozoário entra em contato com sua mucosa, por feridas já existentes ou pela lesão formada no momento da picada. Quando no hospedeiro vertebrado, esses parasitos invadem suas células e se diferenciam em formas amastigotas para dar início a sua replicação por divisão binária. Uma vez que as células se encontram abarrotadas de amastigotas, os protozoários se diferenciam em tripomastigotas e, em sequência, essa célula se rompe e libera o parasito na corrente sanguínea e nos vasos linfáticos, permitindo seu acesso a outras localidades do organismo. O ciclo se reinicia quando o inseto vetor ingere formas sanguíneas novamente, como ilustra a Figura 1 (BERN, 2015; MACHADO, 2012; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

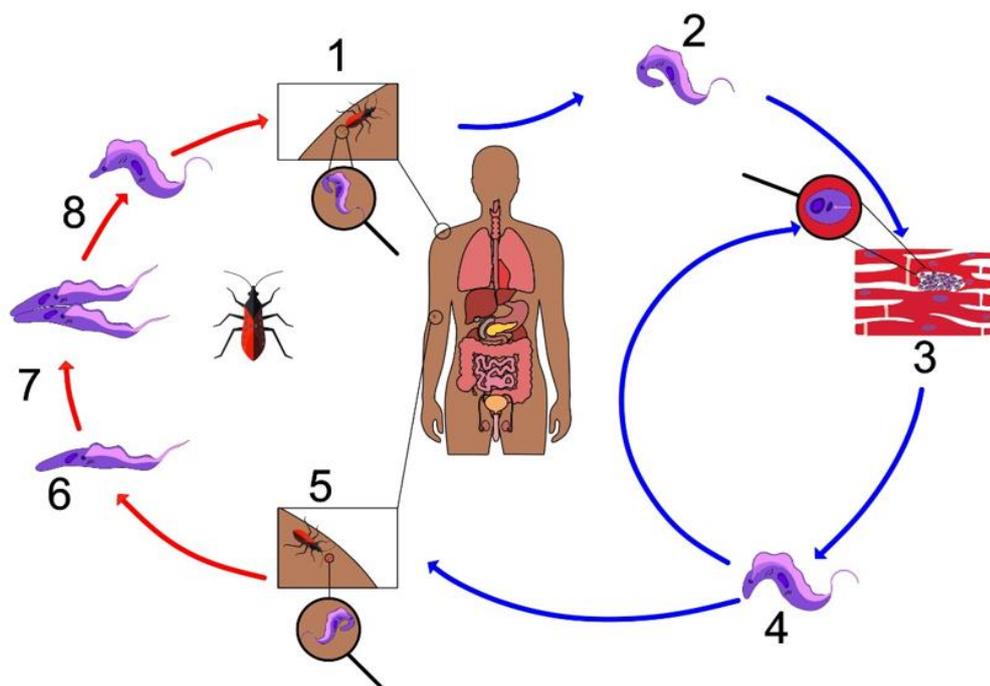


Figura 1– Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. As setas em vermelho indicam os estágios no triatomíneo e as setas azuis indicam os estágios no hospedeiro humano. **1)** O vetor infectado faz o repasto sanguíneo e libera tripomastigotas metacíclicas pelas fezes, próximo ao local da lesão resultante da picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro por meio dessa lesão ou através de membranas de mucosas intactas. **2)** Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células perto do local de inoculação e se diferenciam em amastigotas intracelulares. **3)** Amastigotas se multiplicam por fissão binária. **4)** Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e são liberados na circulação. **5)** Os tripomastigotas infectam diversas células e se transformam em amastigotas intracelulares em locais novos de infecção. **6)** Tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino do vetor. **7)** Os parasitos se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino médio. **8)** Tripomastigotas metacíclicos infecciosos no intestino posterior. (Adaptado de CDC, 2018).

1.2.2 O DNA do cinetoplasto(kDNA)

A peculiar mitocôndria dos tripanossomatídeos abriga moléculas circulares de DNA que podem concentrar entre 15% a 30% do DNA total do parasito (DE SOUZA, 2003; FIDALGO; GILLE, 2011). A arquitetura desse DNA extranuclear – conhecido como DNA do cinetoplasto, ou simplesmente kDNA – é complexa, sendo ele composto por dezenas de maxicírculos (20 a 40kb) e cerca de 15.000 minicírculos (1,4kb), organizados em uma rede de anéis concatenados e condensados (SIMPSON, 1973; TEIXEIRA et al., 2011a). Com relação a suas funções, os maxicírculos possuem genes encarregados pela codificação de proteínas mitocondriais, como genes de proteínas do complexo respiratório (responsáveis pela produção de energia) e de rRNAs (KLINGBEIL; ENGLUND, 2004), e os minicírculos atuam na codificação de RNAs guias (gRNAs), responsáveis pelo auxílio na editoração dos transcritos dos maxicírculos (JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDÃO, 2005). O processamento do mRNA por editoração consiste na inserção ou deleção de resíduos de uridinas na maioria dos transcritos em sítios bastante específicos, o que forma novas fases de leitura aberta, as ORFs (do inglês, *open region frames*) (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009).

De interesse, o minicírculo estrutura-se em quatro regiões conservadas intercaladas com quatro regiões hipervariáveis. As regiões conservadas, ou CSBs (*conserved sequence blocks*), são ricas em CA e são consideradas específicas para a replicação, transcrição e recombinação, além de serem de extrema importância para a transferência lateral de sequências de kDNA para o núcleo da célula do hospedeiro (HECHT et al., 2010).

1.3 Patogênese

1.3.1 Teorias da patogênese

A patogênese da DC ainda não é integralmente elucidada. A grande dificuldade

relacionada a esse tópico está em definir a patogenicidade desde o momento inicial da infecção até os mecanismos que levam às lesões graves nos tecidos na fase crônica da doença (TEIXEIRA et al., 2011a). Atualmente, duas principais teorias possuem destaque, sendo elas a persistência do *T. cruzi* no organismo do paciente chagásico crônico e a autoimunidade, que sugere a rejeição de células do próprio hospedeiro, culminando em um processo inflamatório e dano tecidual (BONNEY et al., 2019; DE BONA et al., 2018).

A teoria da persistência do parasito defende que o protozoário possui papel ativo na manifestação da doença, mesmo quando se encontra em pequenas concentrações no organismo. A presença do *T. cruzi* nos tecidos afetados levaria ao dano no momento em que o parasito se multiplica, resultando na ruptura mecânica das células parasitadas e exposição de antígenos, sustentando uma resposta imunológica adaptativa e originando os infiltrados inflamatórios presentes nas lesões. Esta teoria, entretanto, apresenta uma fragilidade, uma vez que ela não é capaz de explicar o porquê de na fase aguda da doença, quando há uma alta parasitemia, pacientes raramente irem a óbito ou apresentarem manifestações severas, enquanto na fase crônica, quando há uma baixa carga parasitária, é que se observa o comprometimento cardíaco e intestinal. De importância, o processo inflamatório não ocorre com tanta frequência nas proximidades físicas de ninhos de amastigotas no tecido lesionado (BONNEY; ENGMAN, 2008; BONNEY et al., 2019; DE BONA et al., 2018).

A teoria da autoimunidade sugere hipóteses para explicar o desenvolvimento da doença quando há a ausência de parasitos ou uma baixa parasitemia (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006), que ocorreria em decorrência da rejeição das células próprias do tecido do hospedeiro pelo seu sistema imune (TEIXEIRA et al., 2011a). Entre as hipóteses, sugere-se a existência de processos resultantes do mimetismo molecular (GIRONÈS; CUERVO; FRESNO, 2005), mecanismo de ativação policlonal (KIERSZENBAUM, 1999), ativação *bystander* (LEON; ENGMAN, 2003) e mecanismos decorrentes da integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro humano (HECHT et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011a).

Apesar de todas as controvérsias, estudos recentes propõem que a evolução da DC seja um evento dinâmico, onde vários elementos relacionados ao parasito e ao hospedeiro interagem ao longo tempo para desencadear as manifestações clínicas observadas nas fases mais tardias da infecção (SANTI-ROCCA et al., 2017; WESLEY et al., 2019). Provavelmente, o desenvolvimento dessa enfermidade envolve mais de um desses mecanismos propostos, de forma sinérgica, e essa associação poderia gerar e agravar suas manifestações clínicas (BONNEY; ENGMAN, 2008).

1.3 2 Integração do kDNA no genoma do hospedeiro

A presença de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro humano já foi demonstrada, comprovando a possibilidade de trocas genéticas entre parasito e hospedeiro. Estudos anteriores confirmaram a possibilidade de transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma de mamíferos e aves. Utilizando-se do modelo refratário de galinhas, foi possível respaldar a ideia de que a integração do kDNA está associada à miocardiopatia da DC (NITZ et al., 2004). O modelo consiste em galinhas que receberam o *T. cruzi* ainda em período embrionário e foi capaz de demonstrar que aves provenientes dos ovos que foram infectados retiveram minicírculos de kDNA em seus genomas e, mesmo na ausência de parasitos, desenvolveram cardiopatia semelhante à chagásica, o que fortalece a teoria de que a integração do kDNA no genoma do hospedeiro estaria estreitamente relacionada com a patogênese da DC (NITZ et al., 2004; PEREIRA, 2019; TEIXEIRA et al., 2011b).

Muito além da simples confirmação dessa possibilidade de transferência horizontal, fora demonstrado também que o kDNA possui um sítio preferencial para essa integração, o elemento transponível LINE-1 humano (HECHT et al., 2010; SIMÕES-BARBOSA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011a, 2011b) e que tal integração pode ocorrer em *loci* específicos que codificam proteínas com importantes funções, como genes que codificam MHC de classe 1 (HECHT et al., 2010). De interesse, a transferência genética lateral pode resultar na criação de quimeras genômicas, resultando na síntese proteínas

e miRNAs quiméricos (SIMÕES-BARBOSA et al., 1999; THOMAS; SCHAACK; PRITHAM, 2010).

Acredita-se que, por conta da formação novas moléculas, que possuem capacidade de implicar na alteração na expressão gênica ou até mesmo no silenciamento de genes, esse mecanismo estaria intimamente relacionado ao desenvolvimento da DC, uma vez que as teorias da persistência parasitária e da autoimunidade intrinsecamente não são capazes de elucidar tal mecanismo (TEIXEIRA et al., 2011b).

1.4 MicroRNA

Os microRNAs (miRNAs) são fundamentais para a regulação da expressão gênica em seres humanos. Eles são RNAs endógenos não-codificantes, com tamanho aproximado de 20 a 22 nucleotídeos, que atuam como silenciadores pós-transcricionais ao inibir a tradução de mRNAs alvo (CALDELARI et al., 2013; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). A biogênese dessas pequenas moléculas inclui sua transcrição no núcleo da célula, exportação para o citoplasma e posterior processamento e maturação, sendo que a maior parte dos miRNAs são transcritos em regiões do genoma diferentes daquelas conhecidas por codificar proteínas, inclusive podendo se localizar em regiões de íntrons (AMARAL et al., 2010; LEE et al., 2006). O mecanismo de regulação dos miRNAs consiste no pareamento de bases parcialmente complementares na região 3'UTR entre o miRNA e o mRNA em questão, e o resultado desse pareamento imperfeito é a degradação do mRNA ou a repressão da tradução do alvo (FABIAN; SONENBERG, 2012; HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011). Decorrente de seu tamanho reduzido e por conta de sua não necessidade de pareamento completo para agir, um único miRNA é capaz de regular diversos mRNAs, responsáveis por variadas funções no organismo (BRENNECKE et al., 2005; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

Sua origem tem início com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, que resulta em um transcrito longo de miRNA primário, denominado de pri-miRNA. Esse

produto possui uma estrutura de *hairpin* que é clivada ainda no núcleo celular pela enzima Drosha, uma RNase III, e seu cofator DGCR8, que resulta no pré-miRNA, molécula precursora do miRNA maduro. Posteriormente, a exportina-5, que necessita de seu co-fator Ran-GTP, fará o transporte desse pré-miRNA para o citoplasma da célula, onde a Dicer, uma segunda RNase III, irá processar esse pré-miRNA, dando origem a um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse miRNA de fita dupla é incorporado a um complexo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), composto essencialmente por proteínas Argonautas. Por fim, apenas uma das fitas desse miRNA permanecerá no complexo RISC para controle da expressão gênica, como demonstra a Figura 2 (BERNSTEIN et al., 2001; LEE et al., 2003, 2004; LUND et al., 2004). A expressão adequada das RNases III, proteínas Argonautas, entre outros componentes da maquinaria de biogênese dos miRNAs, é de suma importância, uma vez que sua desregulação está relacionada ao aparecimento de diversos cânceres humanos e desajustes endócrinos, podendo dar origem a novos distúrbios ou até mesmo agravar enfermidades pré-existentes (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

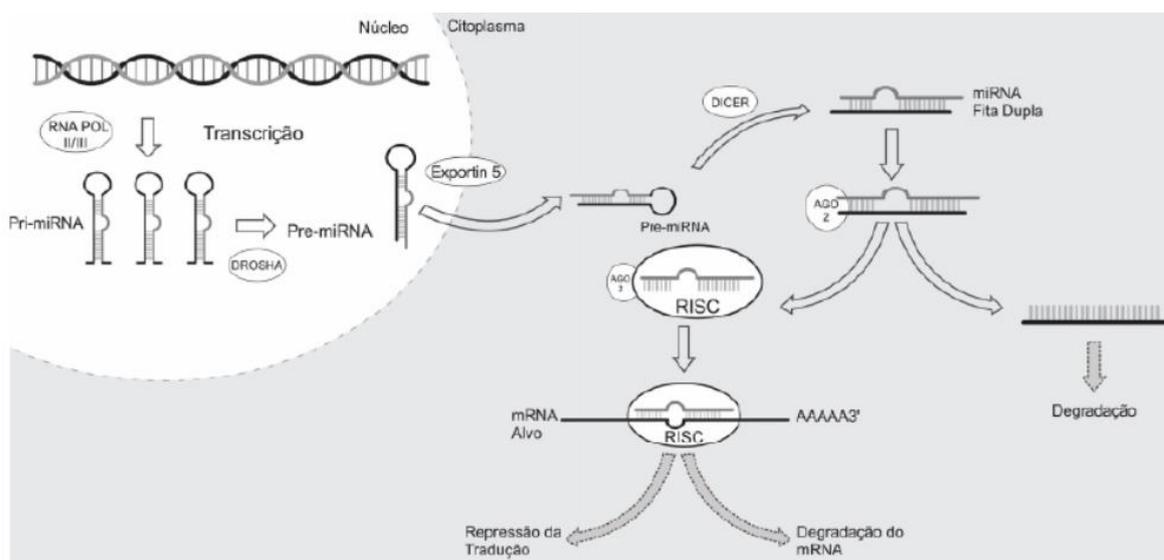


Figura 2 – Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs. A RNA polimerase II faz a transcrição do pri-miRNA. A Drosha cliva os grampamentos, formando o pré-miRNA, que é transportado ao citoplasma e é associado ao complexo Exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pelo Dicer, resultando na perda de sua configuração de grampo. É formado um miRNA de fita dupla, que é associado à proteína Argonauta 2, e um

das fitas é acoplado ao complexo RISC, responsável por reprimir a expressão do gene-alvo, ao passo que a outra fita é degradada. O complexo RISC-miRNA liga-se ao mRNA-alvo, fazendo com que sua tradução seja reprimida ou promovendo sua degradação (Imagem de CAMPOS, 2011).

De interesse, o importante papel dos miRNAs no sistema imunitário já foi demonstrada por conta de sua atividade regulatória em respostas inflamatórias (O'CONNELL; RAO; BALTIMORE, 2012). Ademais, estudos recentes já demonstraram que patógenos, como parasitos, bactérias e vírus, podem conduzir mudanças na expressão do perfil de miRNAs no organismo do hospedeiro (CULLEN, 2011; EULALIO; SCHULTE; VOGEL, 2012). Sabendo dessa possibilidade, levanta-se a hipótese de que a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro poderia levar a alteração da expressão de miRNAs, impactando na expressão ou na formação de novos genes ou no silenciamento de genes já existentes no hospedeiro, contribuindo assim para o desenvolvimento da patogênese da DC. Apesar de ser uma teoria com largo embasamento teórico e grande potencial de contribuição na elucidação dos mecanismos que levam as manifestações clínicas da DC, essa hipótese nunca foi investigada.

1.5 Justificativa

Em 1909, o médico sanitário brasileiro Carlos Chagas descobriu a doença de Chagas (DC), elucidando suas manifestações clínicas e seu agente etiológico: o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Hodiernamente, essa enfermidade acomete cerca de 6 milhões de pessoas no mundo, levando a mais de 10.000 mortes por ano (WHO, 2017).

Estudos recentes mostram que a composição genética do *T. cruzi* possui algumas peculiaridades, dentre elas a presença do DNA do cinetoplasto, o kDNA. Esse é um DNA extranuclear em larga quantidade formado por uma rede de moléculas circulares conhecidas como minicírculos e maxicírculos, que compõem a mitocôndria do *T. cruzi* (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009; FIDALGO; GILLE, 2011; TEIXEIRA et al., 2011a). Em relação a suas funções, os maxicírculos de *T. cruzi* possuem genes responsáveis pela codificação de proteínas mitocondriais, dentre eles genes de proteínas

do complexo respiratório e de rRNAs (KLINGBEIL; ENGLUND, 2004); já os minicírculos possuem funcionalidade na codificação de gRNAs que são responsáveis pelo auxílio na editoração dos mRNAs dos maxicírculos mitocondriais (JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDÃO, 2005).

Uma das dificuldades existentes acerca da DC é elucidar a sua exata patogênese. Acredita-se em uma provável sinergia entre alguns fatores descritos em teorias atuais, sendo eles a persistência do parasito e os mecanismos de autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2008), nos quais se incluem o mimetismo molecular, a ativação policlonal e a ativação *bystander*. Ademais, variados estudos discorrem sobre o papel da integração do kDNA no genoma do hospedeiro nas manifestações clínicas da DC (HECHT et al., 2010; NITZ et al., 2004; SIMÕES-BARBOSA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011a).

De interesse, fora demonstrado que o kDNA possui um sítio preferencial no genoma de humanos, o elemento transponível LINE-1, o que poderia promover a mobilização de sequências de kDNA integradas para outros sítios do genoma. Assim, essas trocas gênicas entre parasito-hospedeiro podem estar relacionadas com a patogênese da DC, uma vez que a integração pode levar a criação de novos miRNAs ou de proteínas quimeras, que podem resultar na alteração na expressão gênica ou até mesmo no silenciamento de genes (HECHT et al., 2010; NITZ et al., 2004; SOUSA, 2012).

Em relação à regulação da expressão gênica em seres humanos, é de conhecimento prévio a importância do papel dos microRNAs (miRNA) – RNAs endógenos não-codificantes que atuam como silenciadores pós-transcricionais (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). Sabendo disso, levanta-se a hipótese de que a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro poderia levar a alteração da expressão de miRNAs, resultando na expressão ou na formação de novos genes ou no silenciamento de genes já existentes no hospedeiro, processo que poderia estar intimamente relacionado com a patogênese da DC.

Com base no exposto, este trabalho objetiva realizar uma análise bioinformática

acerca da presença de miRNAs putativos em sequências de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma humano e seus possíveis alvos. Esta hipótese nunca foi estudada anteriormente e possui grande potencial para contribuir na elucidação da patofisiologia da DC.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Identificação de miRNAs putativos gerados a partir da integração do kDNA no genoma humano.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se há identidade entre as sequências quimeras kDNA-hospedeiro e miRNAs humanos
- Identificar, *in silico*, os possíveis alvos de interação
- Identificar, por bioinformática, as possíveis vias de atuação do miRNA
- Realizar a previsão de estruturas

3. METODOLOGIA

A análise bioinformática passou por cinco bancos de dados biológicos, sendo a sequência da avaliação ilustrada no fluxograma da Figura 3 e descrita mais profundamente nos subtópicos dessa secção:

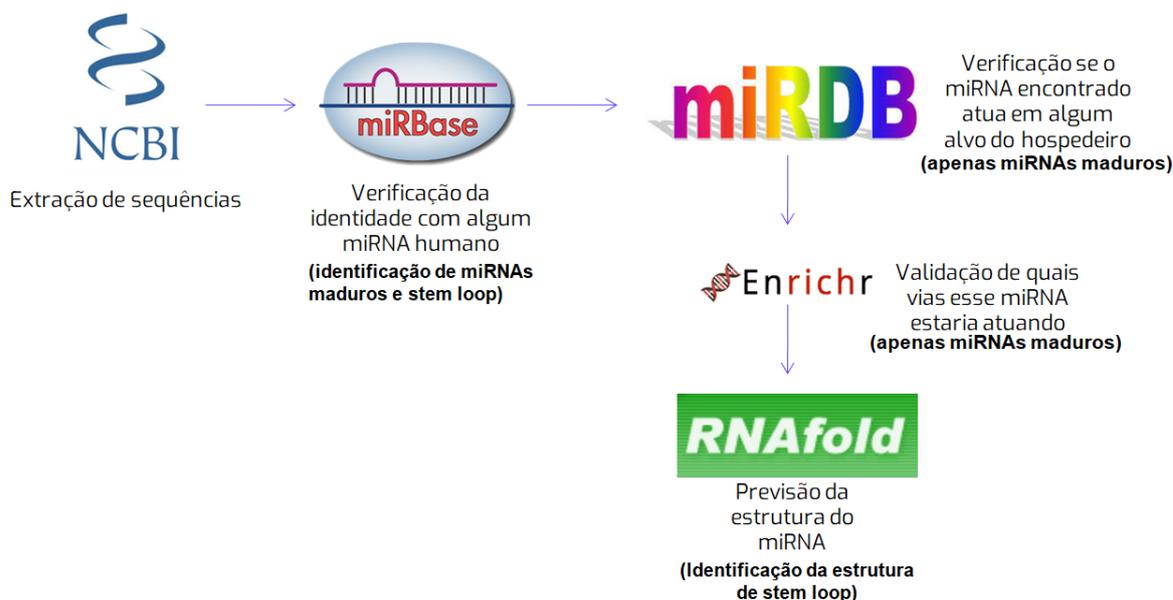


Figura 3–Representação esquemática da metodologia empregada.

3.1 GenBank

A plataforma GenBank consiste em um banco de dados produzido e mantido pela *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que reúne diversas sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis. A partir dessa plataforma, foi feita a extração de sequências de *Homo sapiens* que apresentavam integração do kDNA do *T. cruzi*, no qual primeiramente foi realizada a busca pelos termos “*Homo sapiens kDNA integration*”, ou seja, apenas sequências de pacientes humanos, porém apenas 28 sequências foram encontradas. Como já foram realizadas pesquisas anteriores acerca da integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma humano e muitas sequências foram identificadas, suspeitava-se que mais resultados deveriam ser encontrados, por isso foi realizada uma segunda busca, mas agora os termos buscados foram “*(HOMO SAPIENS KDNA) AND "Homo sapiens"[porgn: __txid9606]*” e 305

sequências foram encontradas, como demonstra a Figura 4. A busca foi realizada em setembro de 2020.

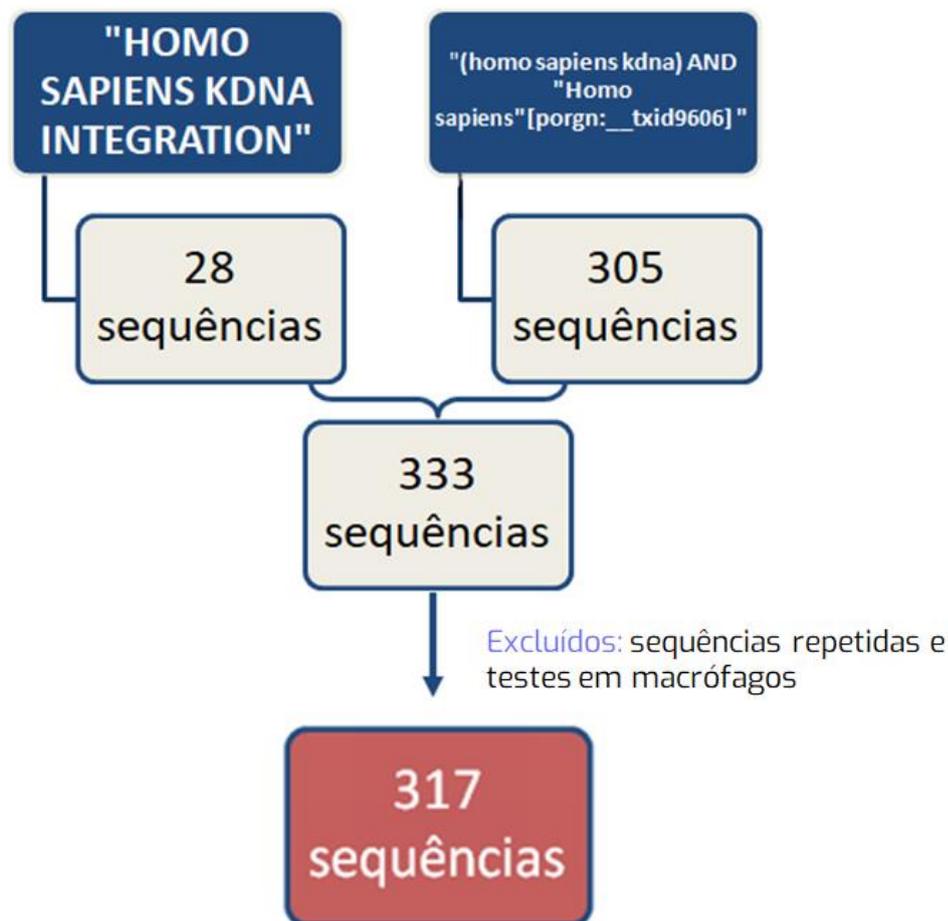


Figura 4– Fluxograma dos resultados obtidos no GenBank. Os descritores “HOMOSAPIENS KDNA INTEGRATION” ou “(HOMOSAPIENS KDNA) AND “Homosapiens”[porgn: __txid9606]” foram utilizados para busca das sequências de interesse no Genbank, resultando em 317 sequência elegíveis.

3.2 miRBase

Todas as sequências obtidas da busca do GenBank seguiram para a próxima plataforma – o miRBase, para identificação de possíveis miRNAs presentes na sequência submetida e o grau de identidade dessas moléculas com algum miRNA humano.

A análise no miRBase, que é um banco de dados biológico que atua como um arquivo de sequências de miRNAs, foi feita da seguinte forma: inicialmente, todas as sequências provenientes do GenBank foram analisadas quanto o grau de identificação com possíveis

miRNAs humanos (maduro ou *stem loop*). Para facilitar a visualização do grau de identidade entre as moléculas, foi montada uma planilha no Excel contendo os valores de *E-value*, *Score*, *Query* e *ID*. Apenas miRNAs com *E-value* menor que 1,0 e tamanho entre 17e 33 nucleotídeos (nt) foram considerados para posterior análise no miRDB, ou seja, apenas miRNAs maduros.

Para os miRNAs *stem loop*, que são sequências maiores, foi realizada uma outra etapa: a análise do alinhamento entre a sequência submetida (UserSeq) e a sequência já presente do banco de dados. Caso o *stem loop* depositado no banco de dados originasse um miRNA maduro dentro da sequência correspondente, a sequência submetida passava novamente pela análise no miRBase, porém agora a procura do miRNA maduro correspondente. Caso houvesse a correspondência, o miRNA maduro era selecionado para análise no miRDB.

3.3 miRDB

Utilizando-se apenas miRNAs maduros, seguiu-se a análise no miRDB – que é um banco de dados para previsão de possíveis alvos de atuação do miRNA. A busca foi feita a partir de uma análise customizada (“custom predictions”), em que os parâmetros selecionados foram a espécie humana e o tipo de submissão foi a sequência de miRNA anteriormente identificada no miRBase da sequência de integração. Apenas genes com *Score* acima de 98 foram considerados.

3.4 Enrichr

O Enrichr foi utilizado para determinação das vias em que os genes provenientes da análise no miRDB atuam. A análise foi feita por meio da submissão dos códigos de cada gene no site do Enrichr, no qual todos os genes resultantes foram analisados na mesma busca. Foram levados em consideração os resultados das categorias GO Biological Process 2021, GO Molecular Function 2021, GO Cellular Component 2021 e Jensen DISEASES. Considerou-se os resultados com menor p-value – ponto de corte < 0,05; por

serem mais significantes.

3.5 RNAfold

Por fim, foi utilizado o RNAfold, uma plataforma que faz a previsão de estruturas secundárias de RNA de fita simples ou de sequências de DNA. Apenas as sequências de *stem loop* das etapas anteriores foram analisadas no RNAfold, pois essa plataforma possui a limitação de não reconhecer RNAs lineares, como é o caso do miRNA maduro. Essa última etapa foi realizada para a validação das estruturas dos miRNAs, uma vez que o miRBase já traz em sua análise a estrutura do miRNA correspondente da pesquisa. Assim, foi feita uma comparação entre as estruturas obtidas do RNAfold e indicadas pelo miRBase.

4. RESULTADOS

4.1 Coleta de dados no GenBank (NCBI)

As buscas no Genbank resultaram em 333 sequências contendo trechos de kDNA de *T. cruzi* integradas em DNA humano. Porém, optamos por excluir sequências provenientes de testes *in vitro* e sequências repetidas entre as duas buscas, resultando na eliminação de 16 sequências. Após as exclusões, as 317 sequências identificadas no GenBank seguiram para a análise no miRBase. A Figura 5 exemplifica uma das sequências extraídas do GenBank.

```

1  tgttggtgtt gagacagagt ctcggtctct caccaggct ggagtgcaat ggcgtgattt
61  tggctcactg gaacctccgc ctcccgggtt caagcaattc tcctgcctca gcctcccaag
121 tagctgggat taagggtgcc tgttaccgtg cctggctaata tttttgtgct tttagtagaa
181 acagggtttc accatgttgg ccagggttgg tccaactcct gacctcaggt gatccaccgc
241 cctcagcccc gcaaagtgct gggattacag gtgcacgccca acaggcctag ctaatttttg
301 ttttttagt agagatggag tttcaccatg ttggccagga tggctcaaaa ctctgacct
361 caggggatcc acccgctat cctccaaaag tgctgggatt acaggcgtga gccaccacat
421 ccggcttgat aactcttatt tttttgtaga gatggaatct cactatgttg cccaggctga
481 tcttgaactc ctggcctcaa gcaatcctcc cggaccccc tcccaaaacc ataatgtacg
541 gatgagatgc atgaattttc cggcccaaac ttgaacgccc ctcccaaac cataatgtac
601 gggtgagatg catgaatttt cggcccaaaa agttgacacc aacccaatc gaacc

```

Figura 5–Integração de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano. Sequência FM207374.1, 655 bp, DNA linear PRI 01-APR-2010. Definição: Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplastminicircle DNA, patient 1458_44, clone 233E. Destacado em marrom, a sequência de integração do *T. cruzi* no genoma do Homo sapiens.

4.2 Avaliação das sequências no miRBase

As 317 sequências selecionadas foram reunidas em uma planilha Excel e foram analisadas no miRBase para identificação de possíveis miRNAs na espécie humana, tanto maduros quanto na conformação de *stem loop*. Considerando o parâmetro estabelecido ($E\text{-value} < 1,0$), 55 sequências foram consideradas significativas e 73 miRNAs foram reconhecidos nas porções das sequências que continham o kDNA. Destas, 12 correspondiam a miRNAs maduros e 61 correspondiam a miRNAs na conformação de *stem loop*. A Figura 6 exemplifica análise feita para a sequência FM207293, onde se identificou um miRNA maduro de 19 nts.

A)

```

AAAGGCCCTCCCAAACCAATATTTACGAATTTCCATACCTCATAATCCGTAACCATAACACAAACAC
AATCATACAACCCATTAAACCAATATATAAACTGTAATATAACTCTAATATACAAACTTAAACCACTA
CCAACTGTAACCTCACACGATATAAACTCACATACATCATCTTAAACATATTCAATAAGTTATATCACCA
ATATTCTACTAATCCACTAACCTCCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTACTTGAAATGCACTAAG
GAGGTTCAATTATTTAAAAGAACTTTGATA

```

B)

UserSeq	103	cuguaauuaacucuaauu	121
hsa-miR-2054	1	cuguaauuaauuuuuuuuu	19

Figura 6 - Identificação de miRNA maduro em sequência contendo integração de kDNA de *Trypanosoma cruzi*: A) Sequência (FM207293) retirada do GenBank. Em laranja, trecho correspondente ao DNA do *Trypanosoma cruzi*. Em preto, trecho correspondente ao DNA humano. Em azul, miRNA maduro

identificado; **B)** Alinhamento entre sequência submetida (UserSeq) e o miRNA depositado no banco de dados (miRBase), hsa-miR-2054;

A Figura 7 ilustra a identificação de miRNA na conformação de *stem loop* na sequência selecionada - FM207374.1. Note que tal sequência é maior (32 nts) e contém o trecho correspondente ao miRNA maduro, indicando que poderia corresponder a um miRNA funcional.

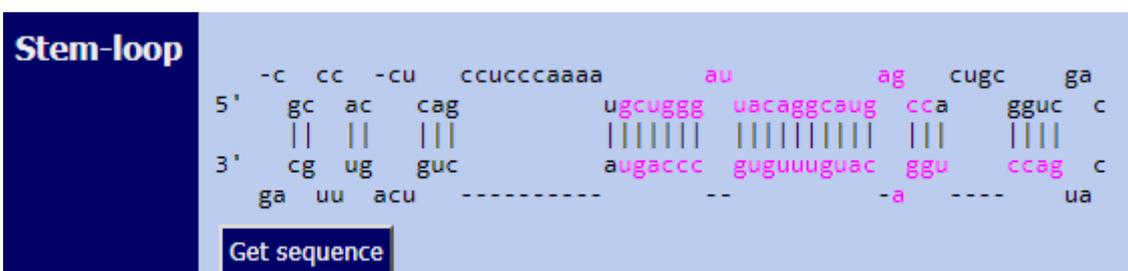
A)

```
GACGGCCCCTCCCAAACCAATATTTACGAACTTCCATACCTCATACTCCGTAACCATAACACAAACAC
AATCATAAACCCTTAACCAAATATATAAAGTGAATATAACTCTAATTATACAAACTTAAACCACCTA
CCAAACTGTAACTCACACGATATAAAGTCAATACATCATCTTAAGCATATTCAATAAGTTATATCACCA
ATATTCTACTAATCCACTAACCTTCTTATATCACACCAACCCCAATCGAACCTACACCAACCCCAATCGA
ACCAACCTACCAACTATCAATCAATTCATTCTTACAATTCTTATTATCAGCCAGGCATAGTAGTTCATGC
CTGTAATCCTAGCACTTTGGGGACTGTAGACCGGAGAACGTGGTTTTGGGAGGGGCGGTCAAATTTGG
GCCCGAGAAATCATGCATCTCCCCGTACATTATAGTTTTGGGAGGGGCGGTCAAATTTGGCCGGAA
AATTCATGCATCTCCCCGTACATTATGGTTTTGGGAGGGGCGTTC
```

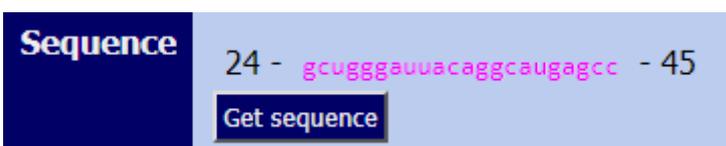
B)

```
Query: 342-374      hsa-mir-619: 16-48      score: 129      evaluate: 0.003
UserSeq           342  aguaguucaugccuguaauccuagcacuuuggg  374
                ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
hsa-mir-619      48   aguggcucaugccuguaauccagcauuuuggg  16
```

C)



D)



```

Query: 20-40          hsa-miR-619-5p: 1-21          score: 87          evalue: 0.062
UserSeq              20 guucaugccuguaauccuagc 40
                    | | | | | | | | | | | | | | | | | |
hsa-miR-619-5p      21 gcucaugccuguaauccagc 1

```

Figura 7 - Identificação de miRNA na conformação de *stem-loop* em sequências quimeras de kDNA-DNA humano. A) Sequência (FM207374.1) retirada do GenBank. Em laranja, trecho correspondente ao DNA do *Trypanosoma cruzi*. Em preto, trecho correspondente ao DNA humano. Em azul, miRNA maduro identificado; **B)** Alinhamento entre sequência submetida (UserSeq) e o miRNA depositado no banco de dados (miRBase), hsa-mir-619 MI0003633; **C)** Sequência correspondente ao miRNA na conformação de *stem loop* e **D)** o miRNA maduro que ele origina - hsa-miR-619-5p MIMAT0026622.

4.3 Identificação dos possíveis alvos dos miRNAs encontrados no miRDB

O algoritmo miRDB, que visa identificar os possíveis alvos de atuação do miRNA, só realiza a análise de sequências de 17 até 33nts, isto é, só realiza a análise de miRNAs maduros. Dos 12 miRNAs maduros com *e-values* significativos no miRBase, 5 foram excluídos por apresentarem sequências muito curtas. Já os miRNAs em *stem loop* que possuíam *e-values* significativos foram reavaliados quanto à presença de miRNAs maduros contidos na estrutura do *stem loop*, possibilitando a seleção de 12 sequências. Desta forma, um total de 19 sequências foram analisadas no miRDB (Tabela 1). Para cada sequência de miRNA, foram considerados apenas os escores mais significativos obtidos no miRDB, com um *baseline* de 98.

Tabela 1 - alvos identificados dos miRNAs encontrados no miRDB

Código da sequência	miRNA identificado (maduro ou stem loop)	<i>e-value</i>	Principais resultados do miRDB	Score
FM207251.1	Stem loop	0.38	KRR1 SCN1A NCK1 C11orf87	99 99 99 99
FM207374.1	Stem loop	0.003	KCNQ5 MAPK6	100 100
FM207302.1	Stem loop	0.67	-	<97
FM207410.1	Stem loop	0.92	BRWD3 SCAI BTF3L4 TCF4 TBL1XR1 [...]	100 100 100 100 100 [...]

FM207409.1	Maduro	0.52	SCAI	100
			PRDM11	100
			CTDSPL2	100
			GDAP2	100
			ATAD5	100
			PUM2	100
			NEDD1	100
FM207369.1	Maduro	0.92	YOD1	99
FM207352.1	Stem loop	0.85	ARHGEF7	100
			TANC2	100
			GRID2	100
FM207293.1	Maduro	0.83	FRMD4B	99
			LRRC8D	99
			PACRGL	99
FM207288.1	Stem loop	0.79	ARHGEF7	100
			TANC2	100
			GRID2	100
FM207263.1	Stem loop	0.68	TULP3	100
			GRHL1	100
			SLC24A2	100
			ROCK2	100
			PRDM11	100
			FAM122B	100
			CACNB4	100
			PPIL4	100
			AHR	100
			SETD3	100
			IQSEC1	100
			ACBD5	100
			SLC4A7	100
			PRRC2C	100
			PCDH8	100
			L3MBTL3	100
			BCL6	100
			ACKR3	100
			SPEN	100
			LEMD3	100
			RUFY3	100
FM207256.1	Stem loop	1e-07	-	<97
FM207256.1	Stem loop	3e-07	-	<97
FM207219.1	Maduro	0.33	SCAI	100
			PRDM11	100
			CTDSPL2	100
			GDAP2	100
			ATAD5	100
			PUM2	100
			NEDD1	100
FM207217.1	Stem loop	0.53	ARHGEF7	100
			TANC2	100
			GRID2	100
FM207207.1	Stem loop	5e-10	RNF138	99
FN397829.1	Maduro	0.88	FRMD4B	99
			LRRC8D	99
			PACRGL	99
FN397826.1	Maduro	0.88	FRMD4B	99
			LRRC8D	99
			PACRGL	99
FN397823.1	Maduro	0.88	FRMD4B	99
			LRRC8D	99
			PACRGL	99

Foi possível verificar que os miRNAs putativos poderiam atuar em diversos alvos celulares, como ARHGEF7, TANC2, LRRC8D, PACRGL, KCNQ5, MAPK6 e RNF138. Considerando apenas os escores mais elevados, verificamos que cada miRNA reconhecia uma média de 4,6 alvos.

Vale ressaltar que diferentes miRNAs podem atuar sobre um mesmo alvo, bem como um mesmo miRNA pode atuar em alvos distintos. Como exemplo desta última situação, destaca-se a sequência FM207410.1, a qual possuía mais de 300 alvos com *score* igual a 100, inviabilizando a análise dessa sequência devido ao excesso de informação.

4.4 Avaliação das possíveis vias de atuação dos miRNAs no Enrichr

Das 19 sequências resultantes da análise do miRDB, 4 foram excluídas (uma sequência por apresentar excesso de informações, impossibilitando sua análise, e as outras três por apresentarem *score*<97), logo, as 15 sequências resultantes (7 maduros e 8 *stem loops*) seguiram para avaliação pelo Enrichr a partir da análise dos *gene symbols* dos possíveis genes afetados pela integração dentro das seguintes categorias: GO Biological Process 2021 (processo biológico), GO Molecular Function 2021 (função molecular), GO Cellular Component 2021 (componente celular) e Jensen DISEASES (doenças associadas). Foram considerados os resultados com menor *p-value* e foi montada uma planilha no Excel para melhor visualização dos resultados.

As análises possibilitaram verificar que uma gama de vias de sinalização pode estar sendo potencialmente afetada (Tabela 2). Destacam-se os processos biológicos de fosforilação, de regulação negativa da via de sinalização ERBB, regulação positiva da via de sinalização RIG-I, importação transmembrana de GMP-AMP cíclico através da membrana plasmática, via de anelamento de fita simples (SSA) e no componente celular de ligação de DNA de fita simples.

Tabela 2 - Vias de atuação dos miRNAs identificadas no Enrichr

Sequências	Processo Biológico	Função Molecular	Componente Celular	Doenças Associadas
FM207251.1 (uuucucuuag uacuccuca)	Regulação da resposta de proteína não dobrada mediada por PERK (GO:1903897)	Atividade do canal de sódio dependente de voltagem (GO:0005248)	Complexo de canal de sódio dependente de voltagem (GO:0001518)	Fibroxioma maligno
FM207374.1 (guucaugccug uaauccuagc)	Fosforilação (GO:0016310)	Atividade de fosfatase de proteína quinase dependente de calmodulina (GO:0033192)	Componente celular intrínseco da membrana de densidade pós-sináptica (GO:0099146) e Componente integral da membrana de densidade pós-sináptica (GO:0099061)	Hipomelanose de Ito e a Síndrome de Proteus
FM207410.1 (aacaaaaucac aguua)	-	-	-	-
FM207409.1 (aatatacaacat actacct)	Regulação positiva da via de sinalização RIG-I (GO:1900246)	Ligação de mRNA (GO:0003729)	Membrana nuclear (GO:0031965)	Doença arterial coronariana
FM207369.1 (cagataacacca acccac)	Desubiquitinação ligada à proteína K29 (GO:0035523)	Atividade desubiquitinase específica de Lys63 (GO:0061578)	-	-
FM207352.1 (aacuguaccac cacuaccaca)	Regulação negativa da via de sinalização ERBB (GO:1901185)	Atividade do receptor do neurotransmissor envolvida na regulação do potencial de membrana pós-sináptica (GO:0099529)	Membrana de rede tubular densa de plaquetas (GO:003109)	Carcinoma
FM207293.1 (ctgtaataactc taatt)	Importação transmembrana de GMP-AMP cíclico através da membrana plasmática (GO:0140361)	Ligante de oxisterol (GO:0008142)	Complexo de canal iônico (GO:003470)	Acrodermatite enteropática
FM207288.1 (aacuguaccac cacuaccaca)	Regulação negativa da via de sinalização ERBB (GO:1901185)	Atividade do receptor do neurotransmissor envolvida na regulação do potencial de	Membrana de rede tubular densa de plaquetas (GO:003109)	Carcinoma

		membrana pós-sináptica (GO:0099529)		
FM207263.1 (guuauauacag auuaaaua)	Regulação negativa da transcrição modulada por ácido nucleico (GO:1903507)	Atividade de canal de cálcio (GO:0005262)	Organela intracelular não limitada por membrana (GO:0043232)	Carcinoma
FM207219.1 (aatatacaacat actacct)	Regulação positiva da via de sinalização RIG-I (GO:1900246)	Ligação de mRNA (GO:0003729)	Membrana nuclear (GO:0031965)	Doença arterial coronariana
FM207217.1 (aacuguaccac cacuaccaca)	Regulação negativa da via de sinalização ERBB (GO:1901185)	Atividade do receptor do neurotransmissor envolvida na regulação do potencial de membrana pós-sináptica (GO:0099529)	Membrana de rede tubular densa de plaquetas (GO:003109)	Carcinoma
FM207207.1 (ucucacuaugu ugcccag)	Reparo de DNA dupla-fitavia anelamento de simples-fita (GO:0010792) (GO:0045002)	Ligação de DNA de fita simples (GO:0003697)	-	-
FN397829.1 (ctgtaatataactc taatt)	Importação transmembrana de GMP-AMP cíclico através da membrana plasmática (GO:0140361)	Ligação de oxisterol (GO:0008142)	Complexo de canal iônico (GO:0034702)	Acrodermatite enteropática
FN397826.1 (ctgtaatataactc taatt)	Importação transmembrana de GMP-AMP cíclico através da membrana plasmática (GO:0140361)	Ligação de oxisterol (GO:0008142)	Complexo de canal iônico (GO:0034702)	Acrodermatite enteropática
FN397823.1 (ctgtaatataactc taatt)	Importação transmembrana de GMP-AMP cíclico através da membrana plasmática (GO:0140361)	Ligação de oxisterol (GO:0008142)	Complexo de canal iônico (GO:0034702)	Acrodermatite enteropática

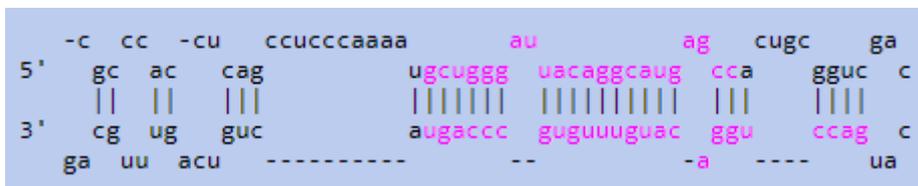
4.5 Previsão das estruturas dos miRNAs

Para confirmação da estrutura predita no miRBase, as oito sequências (UserSeq) de miRNAs *stem loop* foram submetidas a análise pelo algoritmo RNAfold. De interesse,

o RNAfold possui a limitação de não reconhecer RNAs lineares, como é o caso do miRNA maduro.

Apenas duas sequências analisadas tiveram a estrutura de *hairpin* confirmadas, como mostram as figuras 8 e 9. Nestas figuras, observa-se a comparação da estrutura gerada pelo RNAfold e a estrutura disponibilizada no mirBase. Tal resultado é importante pois as estruturas de *hairpin* que darão origem ao miRNA maduro no organismo, ou seja, ao miRNA funcional.

A)



B)

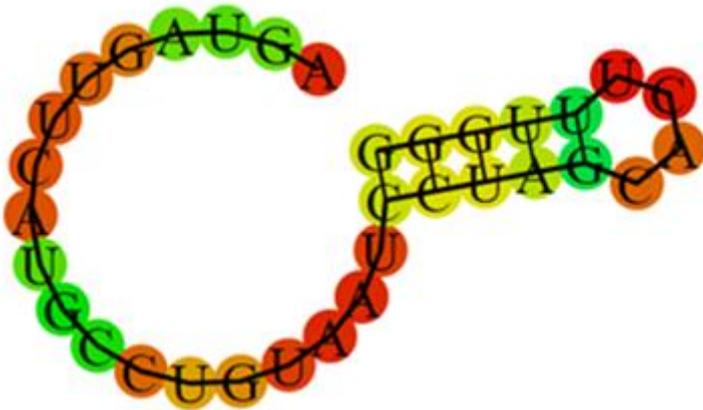
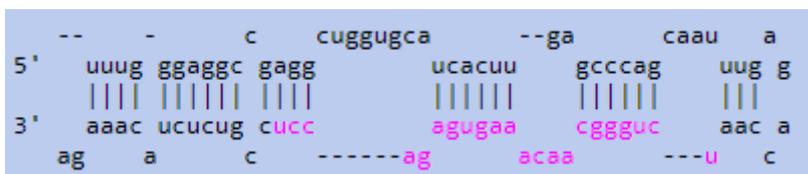


Figura 8–Estruturada sequência FM207174.1 (AGTAGTTCATGCCTGTAATCCTAGCACTTTGGG) obtida a partir do A)miRBaseouB)RNAfold

A)



B)



Figura 9 - Estrutura da sequência FM207207.1 (TTTTGTAGAGATGGAATCTCACTATGTTGCCAGGCTGATCTTGAACCTCCTGGCCTCAAGCAATCCTCCGACCCCCCTCCAAA) obtida a partir do A) miRBase ou B) RNAfold

5. Discussão

Várias teorias foram criadas para explicar os danos teciduais observados em hospedeiros infectados pelo *T. cruzi*, sendo as teorias da persistência do parasito e a da autoimunidade as mais aceitas pela comunidade científica (BONNEY et al., 2019; DE BONA et al., 2018; GUIMARO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2011a; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Em relação ao surgimento de respostas autorreativas, a transferência de minicírculo de kDNA do *T. cruzi* para o genoma hospedeiro já foi demonstrada e associada diretamente ao desenvolvimento de lesões cardíacas (NITZ et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2011b).

Os mecanismos responsáveis pelo surgimento da patologia associada à integração do kDNA ainda precisam ser elucidados, havendo a possibilidade de que essa integração possa levar à criação de novos miRNAs capazes de alterar a expressão gênica, ocasionar o silenciamento de genes ou, até mesmo, promover o surgimento de proteínas quimeras (HECHT et al., 2010; NITZ et al., 2004; SOUSA, 2012).

No presente estudo, avaliamos, por meio da análise bioinformática, a identificação de miRNAs putativos gerados a partir da integração do kDNA no genoma humano. A busca no GenBank possibilitou a identificação de 317 sequências que continham trechos de kDNA inseridos no DNA de pacientes humanos. Tais sequências albergavam, na porção

oriunda do parasito, 73 miRNAs putativos significativos, reforçando a hipótese de que os trechos de kDNA podem gerar novas moléculas moduladoras do genoma hospedeiro.

A esse respeito, sabe-se que miRNAs podem se originar em sequências nucleares de origem mitocondrial (NUMTS), reprimindo a expressão de determinados genes (POZZI; DOWLING; SLOAN, 2019). Ademais, não devemos perder de vista que a integração do kDNA pode levar ao silenciamento de miRNAs existentes na sequência de LINE-1 (OHMS; LEE; RANGASAMY, 2014; PEDERSEN; ZISOULIS, 2016), sítio preferencial de integração dos minicírculos (HECHT et al., 2010).

Os elementos LINE-1 possuem a capacidade de se “copiar e colar” em outras regiões do genoma, e mutações induzidas por LINE-1 podem resultar em plasticidade e instabilidade genômica. Suas retrotransposição e integração são capazes de promover diversidade genética, porém, em contrapartida, suas funções reprimidas podem desembocar no surgimento de doenças (OHMS; LEE; RANGASAMY, 2014; PEDERSEN; ZISOULIS, 2016; SYMER et al., 2002). Evidências na literatura científica apontam que miRNAs podem ter origem em elementos transponíveis (FILSHTEIN et al., 2012; ROBERTS; CARDIN; BORCHERT, 2014), inclusive miRNAs originados de LINE-1 já foram evidenciados por Ohms et. al, 2014. Portanto, a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro humano ainda poderia silenciar os miRNAs presentes em LINE-1, acarretando a instabilidade genômica do hospedeiro e no desenvolvimento de diversas manifestações clínicas consequentes da infecção pelo protozoário. De interesse, há evidências de que deficiência de miRNA (mais especificamente miRNA-155) é capaz de exacerbar a infecção por *T. cruzi* (JHA et al., 2020)

Também já foi relatado que miRNAs exógenos, como os adquiridos na alimentação, podem influenciar as vias celulares de um organismo (AGAPITO-TENFEN et al., 2018; SHU et al., 2015; ZHANG et al., 2012), demonstrando capacidade de modular diversos processos biológicos críticos, tais como a apoptose, a diferenciação e proliferação celular. Assim, a desregulação dessas moléculas está intimamente relacionada com o surgimento de diversas doenças, como o câncer e doenças

coronarianas (PENG; CROCE, 2016; SMALL; OLSON, 2011; ZHANG et al., 2012), corroborando com nossos resultados do Enrichr.

Além de possuírem grande aplicabilidade como biomarcadores de doenças, os miRNAs também podem ser utilizados no diagnóstico de infecções, uma vez que investigações já apontaram que o RNA exógeno de vírus e parasitos podem ser detectados no conjunto de dados de seqüenciamento, mesmo que tal fim sirva apenas para fins de pesquisa (KAUR et al., 2018; MANZANO-ROMÁN; SILES-LUCAS, 2012; ZHENG et al., 2017).

Neste trabalho, os miRNAs com *e-values* mais significativos na análise do miRBase foram submetidos a uma avaliação de seus alvos no miRDB. Destaca-se a redundância de atuação dos miRNAs, no qual um único miRNA pode atuar em diversas vias e uma mesma via pode ser regulada por vários miRNAs (BRENNECKE et al., 2005; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). Tal característica foi ilustrada por Shu et al., 2015, com relação ao bta-miR-487b em humanos, que atua em diversos genes, podendo esses genes estar relacionados a uma via comum. Essa redundância se faz necessária no organismo, pois, caso um miRNA sofra alguma intercorrência, a via não fica comprometida, já que outros miRNAs regulam a mesma via (BRENNECKE et al., 2005).

Nossos dados revelaram que diferentes seqüências deram origem a um mesmo miRNA, como foi o caso das seqüências FN397823.1, FN397826.1, FN397829.1, originando o miRNA maduro hsa-miR-2054. Essas seqüências foram originadas em diferentes pacientes, porém, caso comprovadas que tal resultado possa acontecer em um mesmo paciente, a integração poderia gerar consequências mais relevantes no hospedeiro, uma vez que as vias em que esse miRNA atua sofreria regulação de três novos miRNAs. Outra situação que chama atenção é a da seqüência FM207207.1, que gera o miRNA *stem-loop* hsa-mir-1285-2 e origina o miRNA maduro hsa-miR-1285-3p, pois esse miRNA atua em vias de reparo do DNA, que são de suma importância para o funcionamento do organismo, e variações nessa via poderiam desembocar em situações de instabilidade genômica de difícil restauração. Porém, por ser o único miRNA

identificado com atuação nessa via, pode ser que não gere um impacto tão grande quanto o estimado. A confirmação de tal hipótese requer estudos mais aprofundados acerca da atuação desse miRNA isoladamente nas vias de reparo e suas consequências.

Por fim, após todas as análises nos bancos de dados previamente escolhidos, foram selecionados duas sequências que cumprem todas as exigências estabelecidas e chamaram atenção por provavelmente gerar miRNAs funcionais: a sequência FM207174.1, que origina o *stem-loop* hsa-mir-619; e a FM207207.1, que dá origem ao *stem loop* hsa-mir-1285-2. A avaliação bioinformática já foi utilizada em trabalhos anteriores e o uso dos bancos de dados utilizados bem aceito na comunidade científica, apesar de todas as limitações, como mostram Chen e Wang (2019), Kozomara et. al (2019) e Xie et al., (2021).

5.1 Sequência FM207374.1

A sequência FM207374.1 origina um miRNA similar ao *stem-loop* hsa-mir-619, que resulta no miRNA maduro hsa-miR-619-5p (guucaugccuguaauccuagc). A análise no MiRDB do miRNA hsa-miR-619-5p apontou que o mesmo atua nos genes KCNQ5 e MAPK6 e a análise no Enrichr acusou sua atuação no processo biológico de fosforilação, na função celular de atividade de fosfatase de proteína quinase dependente de calmodulina, no componente celular intrínseco da membrana de densidade pós-sináptica e de componente integral da membrana de densidade pós-sináptica e pode estar relacionado aos processos que levam a doenças como a hipomelanose de Ito e a Síndrome de Proteus.

Com relação ao resultado do MiRDB, é interessante destacar que o gene KCNQ5, também conhecido como membro 5 da subfamília Q do canal de potássio controlado por voltagem, é um gene capaz de codificar proteínas e possui vias relacionadas, como a transmissão através de sinapses químicas e o entranhamento circadiano (SCHROEDER et al., 2000). Já o gene MAPK6, também conhecido como Mitogen-Activated Protein Kinase 6, ou ERK3 (*extracellular signal-regulated kinase 3*), também é um gene capaz de

codificar proteínas, porém entre suas vias relacionadas destacam-se a via da IL-2 e a sinalização da dor neuropática em neurônios do corno dorsal (DE LA MOTA-PEYNADO; CHERNOFF; BEESER, 2011).

Já com relação aos resultados apresentados pelo Enrichr, destaca-se a fosforilação, uma modificação pós-traducional bastante recorrente nas vias de sinalização e que desempenha um papel fundamental numa vasta gama de eventos celulares, como a ativação de determinadas proteínas – que antes permaneciam inativas e não exerciam sua função (FERRAZ, 2017). Possivelmente, todos os processos celulares são afetados por meio da fosforilação e seu espectro de atuação abrange uma imensa diversidade de eventos, incluindo diferenciação, mobilidade, divisão, metabolismo, movimentação de organelas, apoptose, transporte de membranas, contração muscular, imunidade, aprendizado e memória (BRINKWORTH; BREINL; KOBE, 2003; UBERSAX; FERRELL, 2007).

De interesse, as proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de outras proteínas geralmente por meio da transferência de um grupo fosforila de ATP para treonina, serina ou resíduos de tirosina (SILVA et al., 2009). A proteína quinase dependente de calmodulina é regulada indiretamente por um sinal de transdução e possui como característica em sua estrutura dois domínios globulares que contém, em cada um, dois sítios de ligação ao cálcio, ligados por uma alfa-hélice flexível. A ligação com o cálcio é capaz de induzir uma mudança conformacional na calmodulina, o que leva a exposição dos resíduos hidrofóbicos que promovem a interação no complexo cálcio/calmodulina com inúmeras proteínas (SODERLING, 1999; SODERLING; STULL, 2001). Com isso, nota-se que a origem do miRNA maduro a partir do *stem loop* da sequência FM207374.1 seria capaz de atuar em diversas proteínas e influenciar em uma série de processos biológicos.

Além do exposto, esse miRNA seria capaz de atuar em componentes intrínsecos ou integrais da membrana de densidade pós-sináptica e o comprometimento dessa membrana é capaz de resultar em distúrbios na sinapse neuronal, que podem causar

sintomas neurológicos ou psiquiátricos, além de causar doenças, como a Miastenia Gravis, na qual os neurotransmissores são normais, mas os receptores são não funcionais (LOPES et al., 1998). Com relação a essas manifestações, vale lembrar que a DC digestiva está relacionada ao comprometimento neuronal por conta da lesão de plexos nervosos intramurais por conta do parasitismo das camadas musculares vizinhas, o que repercute na função motora (SANCHEZ-LERMEN et al., 2007) e, além disso, pesquisas utilizando o modelo refratário de aves mutadas com kDNA demonstraram que esses animais desenvolveram fraqueza muscular (NITZ et al., 2004), o que corrobora com a hipótese de que esse miRNA poderia atuar em vias que estão relacionadas com as manifestações clínicas da DC.

Curiosamente, o Enrichr apontou como possíveis doenças associadas a ação desse miRNA a hipomelanose de Ito e a Síndrome de Proteus. A hipomelanose de Ito é uma síndrome neurocutânea multissistêmica rara, caracterizada por apresentar distúrbios cutâneos, cromossômicos e neurológicos, decorrente de uma alteração de mielinização, provavelmente com herança autossômica dominante, ligada ao cromossomo X. A síndrome pode estar presente desde o nascimento ou apresentar-se nos primeiros anos de vida e possui como sintomas a incontinência pigmentar acromiante (manchas mais claras quando comparadas com o tom normal da pele), lesões de pele despigmentadas lineares ou irregulares, pneumonias de repetição e atraso do desenvolvimento psicomotor (ALMEIDA et al., 2001; SEIXAS, 2020). A doença ainda pode estar relacionada a anormalidades músculo esqueléticas, neurológicas, oftalmológicas, má formação cardíaca congênita, urológicas e genitais, hipotonia e hidrocefalia significativa (FITAS; CORDEIRO, 2015; GARCIA, 2015).

Já a Síndrome de Proteus é uma síndrome rara, hamartomatosa e também de origem genética. Ela é caracterizada por malformações decorrentes do crescimento exacerbado e multifocal dos tecidos, que determinam gigantismo parcial dos membros, tumores subcutâneos, nevos pigmentados, macrocefalia e visceromegalias, mas com desenvolvimento cognitivo normal (BIESECKER et al., 1999; SENE; OLIVEIRA;

CHOJNIAK, 2013). Nesses resultados, chama atenção a manifestação de visceromegalias na Síndrome de Proteus, tal como acontece com a DC na fase crônica. Seriam necessários estudos mais focados na correlação dessas duas doenças, porém pode-se levantar a hipótese de que essas manifestações poderiam ter uma origem em comum: a alteração do miRNA originado da sequência FM207374.1.

5.2 Sequência FM207207.1

A sequência FM207207.1 origina um miRNA similar ao *stem-loop* hsa-mir-1285-2, que resulta no miRNA maduro hsa-miR-1285-3p (ucucacuauguugcccag). A análise no MiRDB do miRNA hsa-miR-1285-3p apontou que o mesmo atua no gene RNF138 e a análise no Enrichr acusou sua atuação no processo biológico de via de anelamento de fita simples (SSA) e no componente celular de ligação de DNA de fita simples.

Com relação ao resultado do MiRDB, é interessante destacar que o gene RNF138 (*Ring Finger Protein 138*) é um gene capaz de codificar proteínas e possui como vias relacionadas o processamento e apresentação de antígenos mediados por MHC de Classe I e o Sistema Imunológico Inato. Entre as doenças associadas a esse gene destaca-se a ataxia episódica (ISMAIL et al., 2015).

Já com relação aos resultados apresentados pelo Enrichr, destaca-se a via de reparo SSA, que requer repetições homólogas para unir as extremidades de quebra de dupla fita (DSB), e esse processo pode ser relativamente mutagênico, pois pode ocorrer um rearranjo de deleção entre as repetições que flanqueiam o DSB, levando a perda de informação genética (BHARGAVA; ONYANGO; STARK, 2016; SANTOS, 2015). Vale lembrar que a conformação de fita dupla do DNA é um aspecto central da estabilização e proteção do genoma, por preservar essa molécula da degradação química e enzimática, formação de estruturas secundárias e ativação metabólica. A função das proteínas de ligação ao DNA de fita simples é fazer o sequestro e processamento do DNA de fita simples quando ele é exposto em condições como na replicação ou na transcrição (ASHTON et al., 2013). Tais resultados se fazem importantes, pois já foi observado que

existem diferenças nas lesões DSB de células infectadas com *T. cruzi* e não infectadas e na expressão do sistema de reparo, o que poderia ter uma correlação com a alteração do miRNA resultante da sequência FM207207.1 (ROSE et al., 2021).

5.3 Considerações finais

Em teoria, a origem dos miRNAs– em especial dos provenientes das sequências FM207374.1 e FM207207.1, que dão origem a *stem-loops* com estruturas previstas pelo *RNAfold* e capazes de gerar miRNAs funcionais de acordo com a análise bioinformática – é bastante provável de ocorrer. Assim, a integração do kDNA no genoma do ser humano resultaria em uma nova sequência genética no núcleo de uma célula. Em meio a sequência quimérica, estaria o trecho correspondente ao miRNA *stem-loop*. Então, a RNA polimerase II faria a transcrição dessa sequência, originando o pri-miRNA, que possui estrutura de *hairpin*. Ainda no núcleo celular, a enzima Drosha cliva os grampos da estrutura formada, originando o pré-miRNA, que é transportado ao citoplasma e é associado ao complexo Exportin-5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pelo DICER, originando um miRNA de fita dupla, perdendo sua configuração de grampo. Uma das fitas desse miRNA é acoplado ao complexo RISC, que será responsável por reprimir a expressão de genes-alvo, ao passo que a outra fita é degradada. Enfim, o miRNA maduro estaria formado e o complexo RISC-miRNA seria capaz de se ligar ao mRNA-alvo, fazendo com que sua tradução seja reprimida ou promovendo sua degradação (Figura 10). Como nessa hipótese a expressão dessas moléculas é defeituosa, tal mecanismo seria responsável pela desregulação de diversas vias.

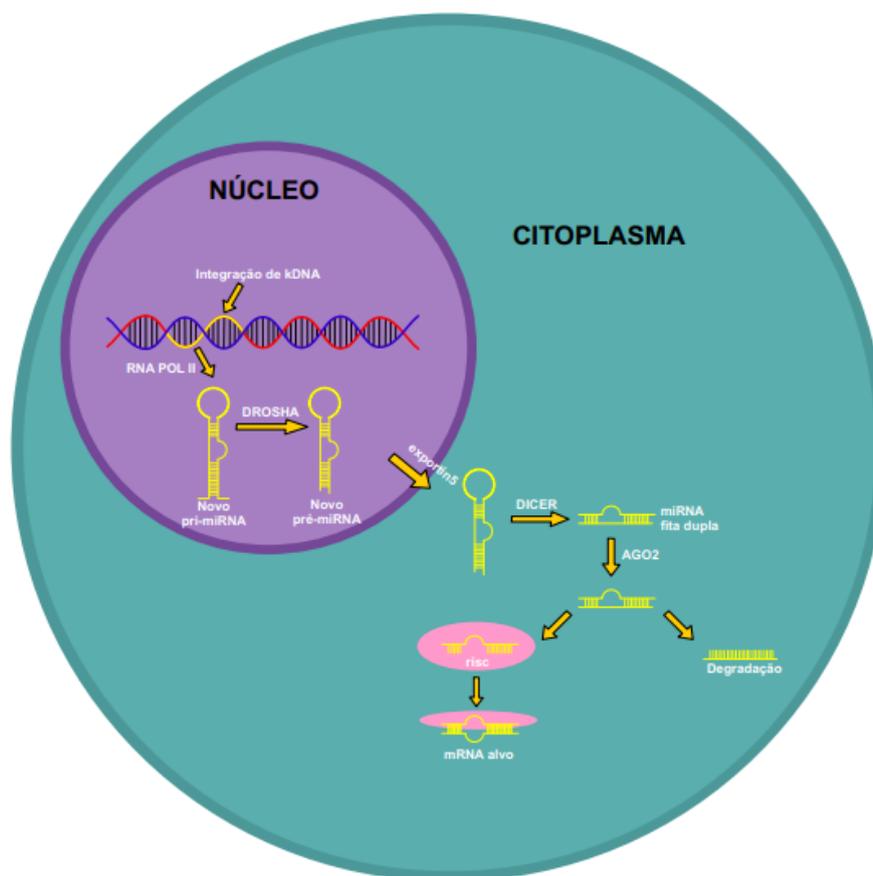


Figura 10 - Mecanismo de origem dos miRNAs gerados a partir da integração do kDNA

A atuação de miRNAs nas vias encontradas nesse trabalho podem explicar a manifestação de sintomas comuns entre as doenças apontadas e a DC, como as visceromegalias no caso da Síndrome de Proteus, além de abrir uma gama de possibilidades para explicar como se dá a patogênese da DC (ZHANG et al., 2012).

É de grande importância destacar que, caso o papel dos miRNAs na patogênese da DC seja completamente elucidado, pode-se pensar em uma nova possibilidade para o tratamento da doença, uma vez que imitadores ou inibidores de miRNAs (anti-miRNAs) vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de combater doenças por meio da regulação gênica guiada por RNA (PEDERSEN; ZISOULIS, 2016). Os miRNAs gerados por conta da integração do kDNA no genoma do hospedeiro ainda podem servir de biomarcadores para o diagnóstico da DC (HAGSTRÖM et al., 2019; KAUR et al., 2018; ZHENG et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível fazer a determinação de identidade entre as sequências quimeras kDNA-hospedeiro e miRNAs humanos, a identificação *in silico* dos possíveis alvos de interação, a identificação por bioinformática das possíveis vias de atuação do miRNA e a previsão de estruturas dos miRNAs por meio da análise em cinco bancos de dados biológicos: GenBank, miRBase, miRDB, Enrichr e RNAfold, que, por fim, possibilitaram a identificação de miRNAs putativos gerados a partir da integração do kDNA no genoma humano.

Conclui-se que a integração do kDNA no genoma do hospedeiro humano tem o potencial de gerar novas moléculas, entre elas miRNAs, capazes de fazer o silenciamento pós-transcricional de proteínas e atuar em diversas vias metabólicas e regulatórias, gerando alterações genéticas que podem estar intimamente correlacionadas com a patogênese da DC, o que ajudaria a elucidar a fisiopatologia da doença. Além disso, esses miRNAs ainda podem servir como alvo farmacêutico e biomarcadores da DC, abrindo um novo leque para o tratamento e diagnóstico dessa enfermidade.

Apesar de o trabalho reunir evidências significativas para a compreensão integral da DC, ainda são necessários estudos mais aprofundados - incluindo testes *in vitro* e *in vivo*, para a confirmação dos nossos achados, uma vez que os métodos computacionais atuais ainda estão em um estágio muito inicial de desenvolvimento, podendo haver equívocos quanto a predição do alvo de miRNAs. Ademais, a natureza dinâmica da interação miRNA-mRNA pode variar em diferentes condições fenotípicas.

Com isso, espera-se que os achados aqui reunidos contribuam para o impulsionamento de futuras pesquisas acerca do assunto, e que abra portas para que a compreensão da DC deixe de ser um desafio e se torne mais uma complexidade médica, trazendo esperança para a comunidade científica.

7. REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 437–454, 2005.
- AGAPITO-TENFEN, S. Z. et al. Systematic miRNome profiling reveals differential microRNAs in transgenic maize metabolism. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, 2018.
- ALMEIDA, A. S. DE et al. Hipomelanose de Ito - relato de um caso Hypomelanosis of Ito - case report. v. 77, p. 59–62, 2001.
- AMARAL, B. et al. MicroRNAs - biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 9, n. 2, p. 105–109, 2010.
- ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease in Italy: Breaking an epidemiological silence. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 37, p. 1, 2011.
- ASHTON, N. W. et al. Human single-stranded DNA binding proteins are essential for maintaining genomic stability. v. 1, p. 1–20, 2013.
- BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001.
- BHARGAVA, R.; ONYANGO, D. O.; STARK, J. M. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. **Trends in Genetics**, v. xx, p. 1–10, 2016.
- BIESECKER, L. G. et al. Proteus Syndrome : Diagnostic Criteria , Differential Diagnosis , and Patient Evaluation. v. 395, p. 389–395, 1999.

- BISIO, M. et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: Prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 543–549, 2011.
- BONNEY, K.; ENGMAN, D. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2008.
- BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 421–447, 2019.
- BRENNECKE, J. et al. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biology**, v. 3, n. 3, p. 0404–0418, 2005.
- BRINKWORTH, R. I.; BREINL, R. A.; KOBE, B. Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 74–79, 2003.
- CALDELARI, I. et al. RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 10, p. 1–22, 2013.
- CAMPOS, V. F. Revisão aborda diferentes MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 85–93, 2011.
- CASTRO, E. Chagas' disease: Lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 1, p. 16–23, 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **American Trypanosomiasis**. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>, 2021. Acesso em: 23 jul. 2021.
- CHEN, Y.; WANG, X. miRDB : an online database for prediction of functional microRNA targets. p. 1–5, 2019.
- CONNERS, E. E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Tropica**, v. 156, p. 68–78, 2016.

- COSTA, F. C. et al. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2018.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.
- CULLEN, B. R. Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. **Genes and Development**, v. 25, n. 18, p. 1881–1894, 2011.
- DE BONA, E. et al. Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–8, 2018.
- DE LA MOTA-PEYNADO, A.; CHERNOFF, J.; BEESER, A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated Kinase (Pak) activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13603–13611, 2011.
- DE PONTES, V. M. O. et al. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.
- DE SOUZA, W. Novel Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. p. 13–24, 2003.
- DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 2069–2080, 2009.
- DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 68–72, 2011.

DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1552–1556, 2013.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–269, 2006.

EULALIO, A.; SCHULTE, L. N.; VOGEL, J. to bacterial infections Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . v. 9, n. 6, p. 742–750, 2012.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 586–593, 2012.

FERRAZ, F. A. N. Caracterização de sítios conformacionais de fosforilação em proteínas. 2017.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.

FILSHTEIN, T. J. et al. Origin-based identification of microRNA targets Orbl. p. 1–9, 2012.

FITAS, A. L.; CORDEIRO, A. I. Hipomelanose de Ito : a Pele como Sinal de Alarme. p. 284–285, 2015.

FORSYTH, C. J. et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1056–1062, 2016.

GARCIA, E. W. Residência pediátrica. v. 5, n. 1, p. 33–35, 2015.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 296, p. 89–123, 2005.

GUIMARO, M. C. et al. Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

HAGSTRÖM, L. et al. The use of qPCR in human Chagas disease: a systematic review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 10, p. 875–894, 2019.

HECHT, M. M. et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 2010.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, 2011.

ISMAIL, I. H. et al. The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 1446–1457, 2015.

JHA, B. K. et al. MicroRNA-155 Deficiency Exacerbates Trypanosoma cruzi Infection
Downloaded from <http://iai.asm.org/> on April 22 , 2020 at LINKOPINGS
UNIVERSITETSBIBLIOTEK Downloaded from <http://iai.asm.org/> on April 22 , 2020 at
LINKOPINGS UNIVERSITETSBIBLIOTEK. n. April, 2020.

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 6, p. 270–272, 2005.

KAUR, H. et al. Screening and identification of potential novel biomarker for diagnosis of complicated Plasmodium vivax malaria. **Journal of Translational Medicine**, p. 1–15, 2018.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 210–223, 1999.

KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, P. T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4333–4334, 2004.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase : from microRNA sequences to function. v. 47, n. November 2018, p. 155–162, 2019.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010.

KUN, H. et al. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 11, p. 1534–1540, 2009.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LEE, Y. et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. **EMBO Journal**, v. 25, n. 3, p. 522–532, 2006.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. [Frontiers in Bioscience 8, e315-322, May 1,2003] THE SIGNIFICANCE OF AUTOIMMUNITY IN THE PATHOGENESIS OF CHAGAS HEART DISEASE Juan S. Leon and David M. Engman. v. 1974, n. 17, p. 315–322, 2003.

LOPES, A. C. P. et al. Aspectos Moleculares Da Transmissão Sináptica. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 32, n. 2, p. 167, 1998.

LUND, E. et al. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95–98, 2004.

MACHADO, F. S. ET AL. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012.

MANZANO-ROMÁN, R.; SILES-LUCAS, M. Molecular & Biochemical Parasitology MicroRNAs in parasitic diseases : Potential for diagnosis and targeting. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 186, n. 2, p. 81–86, 2012.

NITZ, N. et al. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 175–186, 2004.

O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. MicroRNA regulation of inflammatory

responses. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 295–312, 2012.

OHMS, S.; LEE, S. H.; RANGASAMY, D. LINE-1 retrotransposons and let-7 miRNA: Partners in the pathogenesis of cancer? **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

PEDERSEN, I. M.; ZISOULIS, D. G. Transposable elements and miRNA: Regulation of genomic stability and plasticity. **Mobile Genetic Elements**, v. 6, n. 3, 2016.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of microRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 1, n. November 2015, 2016.

PEREIRA, M. W. DE M. ASSOCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS FATORES NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS – UMA AVALIAÇÃO DAS TEORIAS DE PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA E AUTOIMUNIDADE. **Ayan**, v. 8, n. 5, p. 55, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

POZZI, A.; DOWLING, D. K.; SLOAN, D. The Genomic Origins of Small Mitochondrial RNAs: Are They Transcribed by the Mitochondrial DNA or by Mitochondrial Pseudogenes within the Nucleus (NUMTs)? **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1883–1896, 2019.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

RIBEIRO, M. et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, v. 162, p. 1–6, 2016.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p.

7–17, 2020.

RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102–1107, 2006.

ROBERTS, J. T.; CARDIN, S. E.; BORCHERT, G. M. Burgeoning evidence indicates that microRNAs were initially formed from transposable element sequences. n. December, p. 1–10, 2014.

ROSE, E. et al. Host DNA repair response to oxidative damage is modulated by *Trypanosoma cruzi* in a strain-dependent manner. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106127, 2021.

SANCHEZ-LERMEN, R. DE L. P. et al. Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica\rUpper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas' disease patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 197–203, 2007.

SANTI-ROCCA, J. et al. A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: Common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

SANTOS, V. T. DOS. Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de duplas fitas no DNA mitocondrial Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de duplas fitas no DNA mitocondrial. 2015.

SCHROEDER, B. C. et al. KCNQ5, a Novel Potassium Channel Broadly Expressed in Brain, Mediates M-type Currents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 24089–24095, 2000.

SEIXAS, E. S. Hipomelanose de Ito : Síndrome neurocutânea multissistêmica. p. 1–8, 2020.

SENE, L. S.; OLIVEIRA, P. DE; CHOJNIK, R. Síndrome de Proteus : relato de caso Proteus syndrome : case report. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 4, p. 318–320, 2013.

SHU, J. et al. Computational characterization of exogenous microRNAs that can be transferred into human circulation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 21–25, 2015.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SIMÕES-BARBOSA, A. et al. Integration of Trypanosoma cruzi kDNA Minicircle Sequence in the Host Genome May Be Associated with Autoimmune Serum Factors in Chagas Disease Patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 249–252, 1999.

SIMPSON, L. Structure and Function of Kinetoplast DNA. **The Journal of Protozoology**, v. 20, n. 1, p. 2–2, 1973.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. 2011.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103–118, 2007.

SODERLING, T. R. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 6, p. 232–236, 1999.

SODERLING, T. R.; STULL, J. T. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2341–2351, 2001.

SOUSA, A. O. DE. Para Retrotransposons Line-1 De Para Retrotransposons Line-1 De. 2012.

SYMER, D. E. et al. Human L1 Retrotransposition Is Associated with Genetic Instability In Vivo similar sloppy structures without a clear preference for. **Cell**, v. 110, p. 327–338, 2002.

TARTAROTTI, E.; OLIVEIRA-AZEREDO, M. T.; CERON, C. R. Problemática vetorial da doença de chagas. **Arq. ciênc. saúde**, v. 11, n. 1, p. 44–47, 2004.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011a.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Trypanosoma cruzi in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 2011b.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Texeira_et al_Evolution and pathology in Chagas disease - A Review.pdf. v. 101, n. August, p. 463–491, 2006.

THOMAS, J.; SCHAACK, S.; PRITHAM, E. J. Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, n. 1, p. 656–664, 2010.

UBERSAX, J. A.; FERRELL, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 530–541, 2007.

WESLEY, M. et al. Correlation of parasite burden, kdna integration, autoreactive antibodies, and cytokine pattern in the pathophysiology of chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. AUG, 2019.

WESTPHALEN, E. V. N. A.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. DE F. L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. **Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**, v. 9, n. 105, p. 17–34, 2012.

WHITE, R. J. Carlos Chagas. **The Pharos of Alpha Omega Alpha-Honor Medical Society. Alpha Omega Alpha**, v. 71, n. 1, p. 49, 2008.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5022–5027, 2008.

World Health Organization (WHO). **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>, 2017. Acesso em: 20 jul. 2020.

XIE, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. v. 1, p. 1–51, 2021.

YOSHIDA, N. Trypanosoma cruzi infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 105–109, 2008.

ZHANG, L. et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. **Cell Research**, v. 22, n. 1, p. 107–126, 2012.

ZHENG, L. L. et al. Exo-miRExplorer: A comprehensive resource for exploring and comparatively analyzing exogenous MicroRNAs. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–11, 2017.