

THÉO GREMEN MIMARY DE OLIVEIRA

Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de pós-graduação em Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2022

THÉO GREMEN MIMARY DE OLIVEIRA

Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de pós-graduação em Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Théo Gremen Mimary de
Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi*
em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos
chagásicos na fase indeterminada e com
cardiomiopatia chagásica / Théo Gremen Mimary de
Oliveira. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Cardiomopatia
chagásica 3.Células-tronco pluripotentes induzidas
4.*Trypanosoma cruzi* 5.RNA-seq 6.Cardiomíocitos

USP/FM/DBD-104/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus avós
Nosor, Galiana, Júlia e Fausto*

*Neste momento da minha vida,
infelizmente, vocês não estão mais aqui comigo.
A saudade, porém, só não é maior do que
o privilégio que tive em tê-los na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Eduardo Krieger, ao Alexandre Pereira e ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular com todo seu corpo de funcionários, alunos e pesquisadores que, nesses quase 12 anos de casa, me deram suporte para desenvolver meus projetos e tanto me ensinaram sobre ciência. Quando entrei pela primeira vez no LGCM, numa despreziosa quarta-feira, 13 de Outubro de 2010, não imaginava o quanto me apaixonaria pela pesquisa e o quanto ainda estaria por vir.

As agências de fomento de pesquisa CNPq e FAPESP, ao Hospital das Clínicas da FMUSP e a Fundação Zerbini pelo financiamento e infraestrutura para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço o apoio da equipe do Instituto de Medicina Tropical (IMT), à Prof^a Ester Sabino e a Carla Dinardo por toda ajuda na idealização e execução desse projeto. Agradeço também a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, sem os quais a pesquisa científica não acontece.

Aos meus companheiros de cultivo de iPSCs que, assim como eu, gastaram muitos finais de semana no laboratório e tanto me ensinaram e ajudaram no desenvolvimento desse projeto desde meus primeiros passos na sala de cultura: Rafael Dariolli, Fanny Wulkan, Clara Steichen, Gabi Venturini, Juliana Alvim e Élide Neri. Sem vocês esse projeto nunca teria saído do papel!

A Cinthia Jannes por ter sido a chefe mais divertida que eu já tive, com ideias a mil e um coração gigante (te amo, Panga!). A Mariana Peres, pelas piadas toscas, apelidos infames e pelo cantinho aconchegante da Genômica sempre aberto a ouvir os amigos desolados (e são muitos!). E, claro, pela paciência e pelos PCRs.

Aos meus colegas de Fundação Pró-Sangue e LIM31 que compreenderam a minha ausência em alguns momentos para me dedicar à conclusão desse trabalho. Agradeço ao Prof. Vanderson Rocha e ao Dr. Alfredo Mendrone Jr pela paciência, compreensão e estímulo. Agradeço à Larissa Feijó por toda ajuda e torcida no começo desse projeto.

Agradeço a toda minha família. Aos meus pais, por me ensinarem que a vida vale a pena, por me mostrarem o valor do trabalho honesto e que sempre dedicaram-se ao público geral, sem distinção de credo, cor ou classe social. Ao meu irmão Tales, pela cumplicidade e companhia.

Aos meus tios e primos, por sempre estarem próximos, mesmo que na correria geral da vida às vezes fiquemos longe tempo demais.

A Isabella, por topar minhas ideias malucas, por ser a melhor companhia de viagens e de dia a dia, e por aguentar me ouvir falar quase todo final de semana (incluindo feriados): “Tenho que passar no lab hoje, rapidinho”.

Por fim, agradeço aos meus avós, que já se foram, mas que sempre estarão aqui, e aqueles que acabaram de chegar, Martin e Luísa, por me fazerem olhar para frente com alegria e esperança.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Chagas.....	2
1.2 Cardiomiopatia Chagásica	6
1.3 Mecanismos de infecção do <i>T. cruzi</i> em cardiomiócitos e alterações celulares decorrentes.....	9
1.4 Modelos celulares no estudo da relação <i>T. cruzi</i> -hospedeiro	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Aspectos éticos e seleção dos participantes.....	17
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	17
3.3 Obtenção das células mononucleares sanguíneas.....	18
3.4 Expansão e reprogramação de eritroblastos em hiPSCs.....	18
3.5 Expansão e criopreservação das hiPSCs	21
3.6 Caracterização das hiPSCs	22
3.6.1 Expressão gênica dos marcadores de pluripotência	22
3.6.2 Citometria de Fluxo.....	23
3.6.3 Imunofluorescência.....	25
3.6.4 Exame de cariótipo	26
3.6.5 Teste de contaminação por micoplasma	26
3.7 Cultivo de <i>Trypanossoma cruzi</i>	27
3.8 Ensaio de infecção de células mononucleares sanguíneas.	27
3.9 Diferenciação de cardiomiócitos a partir de hiPSCs	30
3.10 Ensaio de infecção por imunofluorescência	32
3.11 Ensaio de RNA-seq.....	32

3.12	Análise de genes diferencialmente expressos e vias moleculares enriquecidas.....	33
4.	RESULTADOS	35
4.1	Casuística	36
4.2	Reprogramação dos eritroblastos em hiPSCs	37
4.3	Caracterização das hiPSCs	40
4.3.1	Marcadores de pluripotência	41
4.3.2	Citometria de Fluxo.....	42
4.3.3	Imunofluorescência.....	44
4.3.4	Exame de cariótipo	45
4.4	Infecção de células mononucleares sanguíneas.....	46
4.5	Produção de hiPSC-CM	50
4.6	Quantificação da infecção em hiPSC-CM	51
4.7	Resultados de RNA-seq.....	52
4.8	Análise de vias biológicas	54
4.8.1	Análise de super-representação de vias em 24 hpi.....	54
4.8.2	Respostas grupo-específicas à infecção	59
5.	DISCUSSÃO.....	67
5.1	Produção de hiPSCs e diferenciação em hiPSC-CM.....	68
5.2	Ensaio de infecção de PBMCs e hiPSC-CM.....	70
5.3	Respostas transcricionais associadas à infecção	73
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8.	ANEXOS.....	87

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

G	Força gravitacional
M	Molar
U	Unidade
%	Porcentagem
μl	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Grau Celsius
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CC	Cardiomiopatia Chagásica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DEGs	<i>Differentially expressed genes</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPO	Eritropoetina
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FEV	Fração de Ejeção Ventricular
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
hiPSC	<i>Human induced pluripotent stem-cell</i>
hiPSC-CM	Cardiomiócitos diferenciados a partir de hiPSC
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon gama

L2FC	<i>Log2 Fold Change</i>
MEC	Matriz Extracelular
NaB	Butirato de Sódio
ORA	<i>Over-representation analysis</i>
pb	Par de base
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldeído
pSC	<i>Pluripotent Stem-cells</i>
RB+	RPMI B27 com insulina
RB-	RPMI B27 sem insulina
RI	Inibidor de via ROCK
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento massivo de RNA
SCF	<i>Stem-cell factor</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofluorescência e citometria de fluxo.....	24
Tabela 2: Anticorpos utilizados na marcação de PBMCs.	29
Tabela 3: Dados dos pacientes cardiopatas e indeterminados coletados para o estudo.	36
Tabela 4: Reações de reprogramação realizadas para os pacientes CC e IND.	39
Tabela 5: Eficiência de diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos com o protocolo baseado em RPMI B27 e WNT-C59	51
Tabela 6: Análise de super-representação de vias biológicas utilizando os DEGs retornados no termo de interação. ER: <i>Enrichment ratio</i> . FDR: <i>False-Discovery Rate</i>	56

Lista de Figuras

- Figura 1:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Ao picar um indivíduo infectado com *T. cruzi*, o inseto triatomíneo acaba por ingerir os tripomastigotas circulantes, os quais irão se diferenciar em epimastigotas no intestino médio do inseto, se replicando, e acabarão sendo eliminados como tripomastigotas metacíclicos nas fezes quando o inseto picar novamente um indivíduo. Ao infectar um indivíduo, os tripomastigotas metacíclicos irão invadir as células dos hospedeiro, se diferenciar em amastigotas e, ao se replicar, irão lisar as células, liberando novos tripomastigotas que irão adentrar a corrente sanguínea levando a infecção sistêmica (traduzido de Lidani et al.⁶)..... 4
- Figura 2:** Fases da Doença de Chagas. A fase aguda consiste em alta parasitemia no sangue, seguida de extensa ativação do sistema imunológico do hospedeiro. Já na fase crônica, há queda significativa da parasitemia, com apresentação de imunidade específica ao parasita. A maioria dos indivíduos na fase crônica se apresenta dentro da fase indeterminada da doença (assintomática), porém uma parcela acaba por desenvolver sintomas, os quais podem estar relacionados a problemas cardíacos, digestivos ou ambos (adaptado de Lidani et al⁶)..... 6
- Figura 3:** Processo de produção de hiPSCs. Os eritroblastos são expandidos entre 10 e 12 dias, em normóxia. Ao atingirem 2×10^6 células, os eritroblastos são nucleoporados com plasmídeos episomais e, 48 horas depois, são aderidos à poços com Geltrex e mantidos em hipóxia. O meio de cultura (E8) é trocado a cada 48 horas e, a partir do surgimento de colônias, o meio é trocado diariamente (adaptado de Dowey et al.³¹)..... 20
- Figura 4:** Gates morfológicos utilizados para a análise de infecção de PBMCs por citometria de fluxo. A) Gates “clássicos” de linfócitos e monócitos, com e sem demarcação. B) Canais utilizados para quantificação de cada tipo celular, sem marcação com anticorpos. C) Canais utilizados para quantificação de cada tipo celular, com marcação com anticorpos. 29
- Figura 5:** Principais etapas do processo de diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos (hiPSC-CM) (adaptado de Sharma et al.³⁴). 31
- Figura 6:** Comparação da distribuição de idade entre pacientes cardiopatas e indeterminados (Teste-t de Student. CC: $47,17 \pm 8,01$ e Ind: $61,57 \pm 9,00$ – p-valor = 0,016)..... 37
- Figura 7:** Perfil de expansão dos eritroblastos ao longo de 9 dias de cultura. 38

Figura 8: Perfil morfológico da cultura de PBMCs (D3) e eritroblastos (D6 e D9).....	38
Figura 9: Exemplos de colônias de hiPSCs geradas a partir a reprogramação de eritroblastos (passagem 0).	40
Figura 10: Análise de expressão dos marcadores de pluripotência (eletroforese em gel de agarose 2%). L: Ladder 100pb. Neg: controle negativo	41
Figura 11: Análise de expressão dos marcadores de pluripotência Nanog, Oct-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 por citometria de fluxo. Eixo FL-1: TRA-1-60 ou TRA-1-81. Eixo FL-4: Nanog ou Oct-4. O posicionamento da população de células no quadrante superior direito indica dupla marcação (continua). ..	42
Figura 12: Análise de expressão dos marcadores Nanog, Sox2, TRA-1-60 e TRA-1-81 por imunofluorescência nos clones dos pacientes Indeterminados e Cardiopatas.....	44
Figura 13: Exames de cariótipo realizados por bandeamento G dos clones selecionados para diferenciação.	45
Figura 14: Número total de células analisadas por citometria de fluxo os grupos CC, Indeterminado e Controle, ao longo dos tempos de infecção (N = 5). Não foi observada diferença na distribuição dos tipos celulares entre os grupos. Para todos os grupos analisados foi observado diminuição de monócitos e linfócitos B em cultura com o passar do tempo.	46
Figura 15: Eventos GFP+ ao longo dos tempos de infecção, nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).	47
Figura 16: Intensidade média de GFP ao longo dos tempos de infecção, nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).	48
Figura 17: Razão de intensidade GFP 48/24hpi nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).	49
Figura 18: Razão de intensidade GFP 48/24 hpi por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; Teste t de Student: Monócito vs. Linfócito T – p-valor<0,0001; Monócito vs Linfócito B – p-valor = 0,0003 - N = 5).	49
Figura 19: Caraterização dos hiPSC-CM diferenciados e utilizados nos experimentos posteriores. Linhas pretas identificam os controles brancos	

(não marcados) e as linhas vermelhas as amostras incubadas com anticorpo anti-troponina I cardíaca.	50
Figura 20: A) Imagens ilustrativas da detecção de amastigotas intracelulares GFP+ (verde) em 24 e 48 hpi. Núcleos foram corados com DAPI (em azul). B) Análise das taxas de infecção e proliferação parasitária ao longo do tempo nos grupos Indeterminado e Cardiopata (sem significância estatística).	51
Figura 21: A) Distribuição das contagens em cada replicata B) Gráfico de PCA mostrando a variância entre as replicatas da CC e Ind em 0 e 24 hpi C) Clustering hierárquico das replicatas D) Gráfico do tipo “Volcano” mostrando a distribuição do Log2FoldChange dos genes diferencialmente expressos no resultado do termo de interação.	53
Figura 22: Análise de super-representação de vias com os termos do GO para (A) Processos Biológicos, (B) Componente Celular e (C) Função Molecular.	57
Figura 23: (A) Gráficos de GSEA mostrando a distribuição dos DEGs ranqueados e associação dos termos do Hallmark com cada grupo (barras vermelhas – CC; barras azuis – Ind). (B) Gráficos de conexão dos DEGs associados a cada termo, coloridos pelos valores de Log2FoldChange. (C) Termos da coleção Hallmark associados com cada fenótipo. ES: <i>Enrichment score</i> ; NES: <i>Enrichment score</i> normalizado; FDR: False Discovery Rate ou taxa de falsas descobertas.	60
Figura 24: Heatmaps mostrando a expressão normalizada dos DEGs significativos dentro de cada termo do Hallmark, entre as condições 0 e 24 hpi.	61
Figura 25: (A) Gráfico de barras mostrando os termos enriquecidos pela GSEA com Reactome. (B) Gráficos de conexão dos DEGs associados a termo do Reactome e seus respectivos valores de L2FC (pontos vermelhos – CC; pontos azuis – Ind).	63
Figura 26: (A) Gráfico da enciclopédia KEGG indicando os DEGs positivamente associados às vias de processamento e apresentação antigênica (verde – associação com Ind; vermelho – associação com CC). (B) <i>Heatmaps</i> mostrando a expressão normalizada dos genes do sistema HLA de Classe I e Classe II em todas as condições.	66

Resumo

Oliveira, T.G.M. *Caracterização da infecção por Trypanosoma cruzi em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A doença de Chagas é uma antropozoonose tropical causada pela infecção do parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em humanos. A doença se inicia na fase aguda, por vezes assintomática, na qual ocorre extensa proliferação parasitária e intensa atividade do sistema imune inato, seguida da fase crônica, com parasitemia reduzida e desenvolvimento de imunidade adaptativa. Grande parte dos indivíduos na fase crônica acaba por permanecer na forma indeterminada da doença, porém 20 a 40% dos indivíduos desenvolvem complicações cardíacas ou gastrointestinais em algum momento da vida. A cardiomiopatia chagásica é decorrente de um cenário complexo de interação entre o *T. cruzi* e o organismo do hospedeiro, com importante participação das células cardíacas, as quais, uma vez infectadas, apresentam alterações transcricionais e metabólicas importantes para a viabilidade da replicação parasitária. Neste trabalho, utilizamos cardiomiócitos derivados de hiPSCs (hiPSC-CM) na investigação dos padrões de infecção, proliferação e resposta transcricional ao *T. cruzi* nesse tipo celular em pacientes indeterminados e cardiopatas. Nossos dados mostram que a eficiência de infecção e proliferação do *T. cruzi* não diferem significativamente em PBMCs e hiPSC-CM de ambos os grupos, até 48 horas após infecção. Análises de RNA-seq em hiPSC-CM infectados por 24 horas, entretanto, mostraram um perfil diferente de resposta transcricional ao parasita. Cardiomiócitos de indivíduos indeterminados apresentaram uma resposta mais bem orquestrada quanto à expressão de genes induzíveis por interferon, regulando positivamente genes relacionados ao processamento e apresentação de antígenos por MHC de classe I e II bem como moléculas co-estimulatórias do sistema imune. Ainda, regularam negativamente genes de produção de colágeno e de componentes da matriz extracelular, indicando uma estratégia protetiva a um comportamento pró-fibrótico. Cardiomiócitos de indivíduos cardiopatas, por sua vez, apresentaram aumento de expressão das vias de mTORC1 e resposta a formação de proteínas mal dobradas, ambas indicativas de aumento de produção de ROS intracelular. Esses dados apontam para um padrão diferencial de resposta, o qual pode ter impacto no desenvolvimento de um desfecho crônico com ou sem apresentação de sintomas cardíacos.

Descritores: Doença de Chagas; Cardiomiopatia chagásica; Células-tronco pluripotentes induzidas; *Trypanosoma cruzi*; RNA-seq; Cardiomiócitos

Abstract

Oliveira, T.G.M. *Characterization of Trypanosoma cruzi infection in hiPSC-derived cardiomyocytes from chagasic individuals in the indeterminate phase and with chagasic cardiomyopathy* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Chagas disease is a tropical zoonosis caused by the infection of *Trypanosoma cruzi* in humans, through the bite of insects from the Triatominae subfamily, also known as “kissing bugs”. After infection, the host present an acute phase (usually asymptomatic) in which an extensive parasite proliferation and intense innate immune activity occurs, followed by a chronic phase, characterized by low parasitemia and development of specific immunity. Most individuals in the chronic phase remain in the indeterminate form without symptoms or organ damage. However, 20 to 40% of individuals develop cardiac or gastrointestinal complications at any time in life. Chronic Chagas cardiomyopathy occurs due to a complex interaction between *T. cruzi* and the host, with an important role of cardiac cells which, once infected, present transcriptional and metabolic alterations that are crucial for the parasite survival and replication. In this work, we used hiPSCs-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) to investigate patterns of infection, proliferation and transcriptional response in indeterminate and cardiac patients. Our data show that *T. cruzi* infection and proliferation efficiency did not differ significantly in PBMCs and hiPSC-CM from both groups, up to 48 hours after infection. However, RNA-seq analysis in hiPSC-CM infected for 24 hours showed a different transcriptional response to the parasite. Cardiomyocytes from indeterminate individuals present a better orchestrated expression of interferon-inducible genes, showing significant expression of genes related to antigen processing and presentation as well as immune co-stimulatory molecules. Furthermore, the downregulation of collagen production genes and extracellular matrix components in these cells suggests a protective strategy when facing a pro-fibrotic scenario. Cardiomyocytes from cardiac individuals, in turn, showed increased expression of mTORC1 pathway and unfolded protein response genes, both associated to increased intracellular ROS production. These data point to a differential pattern of response, determined by baseline genetic differences between groups, which may have an impact on the development of a chronic outcome with or without the presentation of cardiac symptoms.

Descriptors: Chagas disease; Chagas cardiomyopathy; Human-induced pluripotent stem-cells; *Trypanosoma cruzi*; RNA-seq; Cardiomyocytes

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de chagas ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose tropical causada pela infecção do parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em seres humanos, principalmente através da picada de insetos triatomíneos. Descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico sanitário Carlos Chagas, a doença de Chagas era tradicionalmente confinada a áreas rurais das Américas do Sul e Central, porém hoje já pode ser considerada endêmica em 21 países latino-americanos e no sul dos Estados Unidos¹. Esse aumento na prevalência é consequência principalmente de fluxos migratórios entre as áreas rural e urbana, da diversificação da transmissão do parasita e da alteração de nichos ecológicos do vetor devido à alterações climáticas recentes².

A principal forma de transmissão é a vetorial, a qual ocorre através da picada de insetos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (subfamília Triatominae), sendo o principal deles o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como “inseto barbeiro”. Porém, com as políticas de controle de proliferação do vetor, formas alternativas de transmissão também passam a ser responsáveis pelo aumento da prevalência da doença de Chagas no mundo. Essas podem ser: transmissão por rota transplacentária (Chagas congênita); por transfusão de sangue; pela ingestão de alimentos contaminados com as fezes de triatomíneos e, mais raramente, via transplante de órgãos de doadores infectados para receptores não-infectados³.

Na transmissão vetorial, uma vez que o inseto infectado pica um indivíduo, ao mesmo tempo em que se alimenta de seu sangue, deposita fezes

contaminadas com *T. cruzi* no local da picada. Ao coçar a região, o indivíduo picado acaba por espalhar as fezes do inseto, permitindo que o parasita invada o organismo pelo orifício deixado pela picada ou, no caso de picadas próximas a região dos olhos, pela membrana conjuntiva. Nesse momento, o *T. cruzi* se apresenta na sua forma infectante, denominada tripomastigota metacíclico, a qual é capaz de infectar diversos tipos de tecido. O histotropismo do *T. cruzi* a princípio, no local da infecção, é majoritariamente por macrófagos, porém, após disseminação sistêmica, o parasita pode infectar uma vasta gama de tipos celulares, sendo os mais acometidos por esse processo as células cardíacas, do músculo liso e/ou do sistema nervoso⁴.

Ao invadir as células do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas, a forma de replicação do parasita, as quais se multiplicam por fissão binária dentro das células dando origem a novos tripomastigotas. Esses por sua vez lisam a célula para infectar tecidos adjacentes ou adentrar na corrente sanguínea⁵. Nesse momento, caso um triatomíneo se alimente do sangue periférico de um indivíduo na fase aguda, irá ingerir os tripomastigotas circulantes, os quais se diferenciarão em epimastigotas ao atingirem o intestino do inseto. Os epimastigotas por sua vez irão se multiplicar por fissão binária no intestino posterior do inseto, dando origem a novos tripomastigotas metacíclicos, os quais serão eliminados nas fezes do animal, assim fechando o ciclo de vida do *T. cruzi*. A Figura 1 ilustra esse processo em todas as suas etapas.

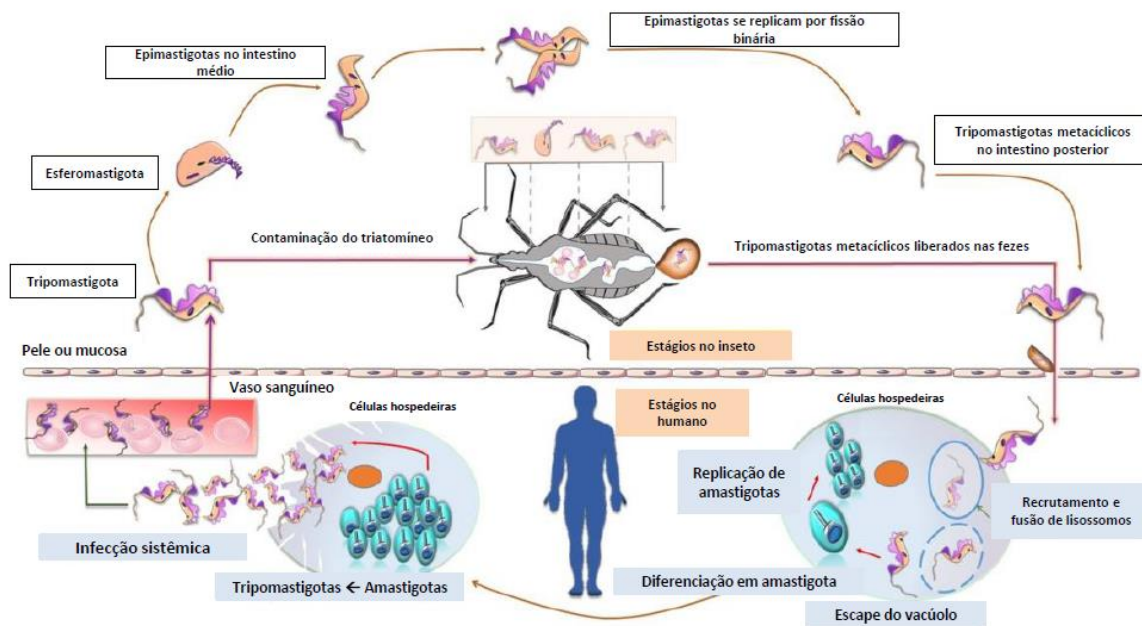


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Ao picar um indivíduo infectado com *T. cruzi*, o inseto triatomíneo acaba por ingerir os tripomastigotas circulantes, os quais irão se diferenciar em epimastigotas no intestino médio do inseto, se replicando, e acabarão sendo eliminados como tripomastigotas metacíclicos nas fezes quando o inseto pica novamente um indivíduo. Ao infectar um indivíduo, os tripomastigotas metacíclicos irão invadir as células dos hospedeiro, se diferenciar em amastigotas e, ao se replicar, irão lisar as células, liberando novos tripomastigotas que irão adentrar a corrente sanguínea levando a infecção sistêmica (traduzido de Lidani et al.⁶).

Iniciada a fase aguda da doença de Chagas, a replicação parasitária ocorre a uma taxa exponencial, com ativação intensa do sistema imunológico, durando de quatro a oito semanas e, geralmente, se resolvendo de forma espontânea, com queda abrupta da parasitemia após esse período⁷. Essa fase é, em muitos casos, assintomática, podendo passar despercebida pelo indivíduo infectado, mas pode incluir sintomas como febre persistente, fadiga, linfadenopatia, hepatomegalia, entre outros. Casos agudos graves geralmente acometem de 1 a 5% dos indivíduos e estão associados a miocardite e meningoencefalite¹. Eventualmente, sinais patognomônicos da infecção por *T. cruzi* podem ser observados como, por exemplo, a formação de chagoma no local da infecção, ou o sinal de Romana, geralmente associado à infecção da

membrana conjuntiva. Exames parasitológicos diretos, como a detecção do parasita no sangue por microscopia ou hemocultura, são capazes de confirmar o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* nessa fase, uma vez que a parasitemia é patente até 90 dias após a infecção³.

Após a queda da parasitemia e o fim da fase aguda, ocasionada principalmente pela ativação do sistema imunológico do hospedeiro, a doença então transita para a fase crônica, na qual os indivíduos infectados apresentam sorologia positiva para *T. cruzi* e os métodos parasitológicos diretos já não são mais úteis na detecção do parasita no sangue. Indivíduos na fase crônica da doença de Chagas podem permanecer assintomáticos por longos períodos, dentro do que se considera a fase indeterminada da doença, sem apresentar nenhum dano secundário à invasão do parasita. Um indivíduo é considerado dentro da forma indeterminada quando se enquadra nos seguintes critérios: teste sorológico positivo; ausência de sinais e sintomas da doença de Chagas; eletrocardiograma (ECG) sem anormalidades e exames radiológicos normais no tórax, esôfago e cólon. Indivíduos nessas condições apresentam um prognóstico favorável, com taxa de mortalidade similar à população normal³.

Geralmente, a doença de Chagas se torna clinicamente evidente de 10 a 30 anos após a infecção (Figura 2), com aproximadamente um terço dos indivíduos acabando por desenvolver problemas envolvendo o coração, o sistema digestório ou ambos (forma cardio-digestiva), sendo que os acometimentos cardíacos compõe a mais grave manifestação da doença de Chagas crônica^{7,8}.

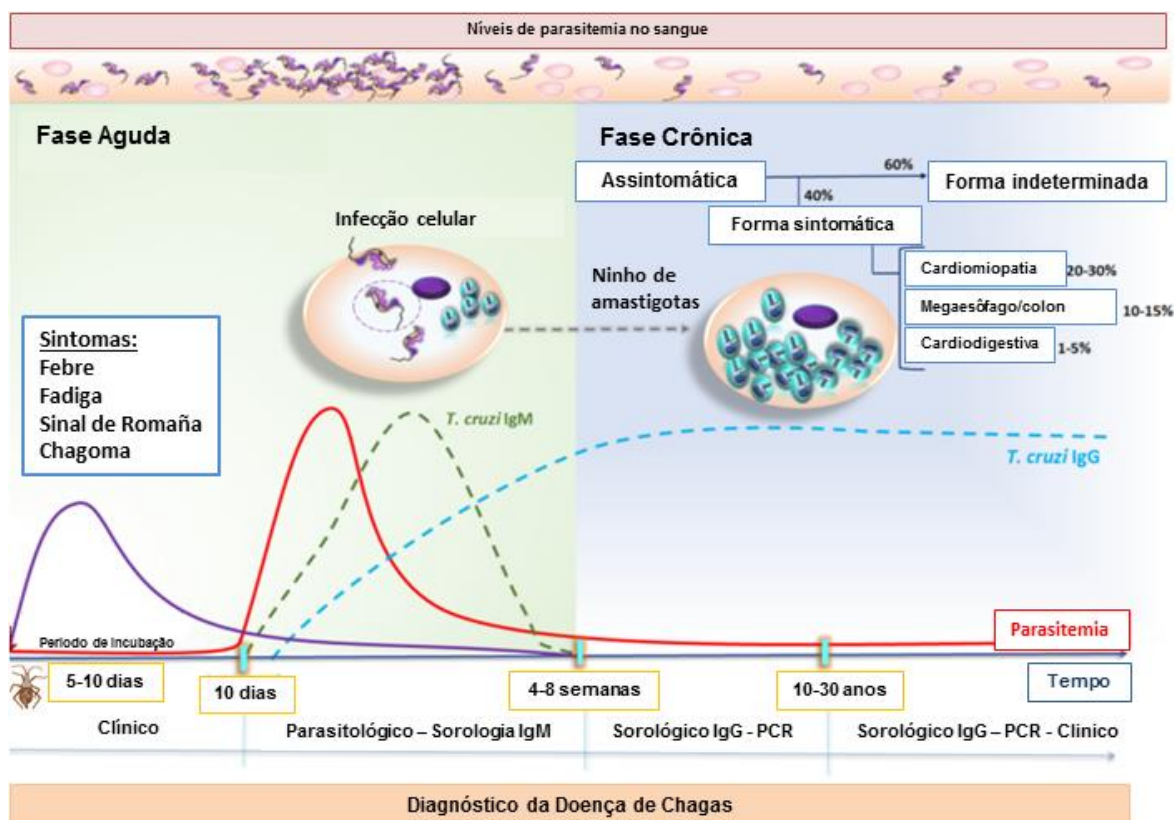


Figura 2: Fases da Doença de Chagas. A fase aguda consiste em alta parasitemia no sangue, seguida de extensa ativação do sistema imunológico do hospedeiro. Já na fase crônica, há queda significativa da parasitemia, com apresentação de imunidade específica ao parasita. A maioria dos indivíduos na fase crônica se apresenta dentro da fase indeterminada da doença (assintomática), porém uma parcela acaba por desenvolver sintomas, os quais podem estar relacionados a problemas cardíacos, digestivos ou ambos (adaptado de Lidani et al⁶).

1.2 Cardiomiopatia Chagásica

A cardiomiopatia chagásica (CC) é o mais comum e mais letal tipo de comprometimento órgão-específico da doença de Chagas, ocorrendo em 20 a 40% dos indivíduos com doença crônica sintomática, acometendo tanto o sistema de condução cardíaco quanto o miocárdio⁸. Os sintomas da CC incluem aqueles similares à insuficiência cardíaca (dispneia aos esforços físicos, fadiga e edemas), arritmias (palpitações e síncope), tromboembolismo (sistêmico e pulmonar) e angina. Porém, a CC é uma condição heterogênea, com uma alta variabilidade de curso clínico e prognóstico⁸. Esse cenário é

resultado de uma complexa interação entre diferentes processos que envolvem o dano tecidual devido a persistência parasitária, inflamação, autoimunidade, o comprometimento da inervação parassimpática do coração por disautonomia e alterações microvasculares⁹. Ainda, o remodelamento da matriz de colágeno e a ocorrência de fibrose levam ao aumento da rigidez miocárdica, à disfunção sistólica e diastólica e, finalmente, à dilatação cardíaca associada a arritmias com potencial de causar morte súbita, a qual é um desfecho comum em pacientes com CC¹⁰.

Apesar da queda da parasitemia após a fase aguda e a ausência de positividade em testes parasitológicos diretos, pesquisadores que utilizaram técnicas mais sensíveis como imuno-histoquímica e a reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction* ou PCR) foram capazes de detectar antígenos e DNA do *T. cruzi* em materiais de autópsia de pacientes cardiopatas¹¹. Tais achados levantaram a hipótese de que a persistência parasitária local, ainda que em níveis quase indetectáveis, ativa a resposta imune local, levando ao recrutamento e expansão de células citotóxicas T CD8+ *T. cruzi*-específicas. Essas, além de aumentarem o estado inflamatório local, poderiam acabar reconhecendo antígenos parasitários com estrutura molecular semelhante à antígenos próprios, levando a ocorrência de reação cruzada autoimune e, conseqüentemente, o estabelecimento de danos ao miocárdio¹².

Somado à isso, o cenário patogênico também é composto pelo aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos infiltrados, especialmente interferon- γ (IFN- γ), TNF- α e interleucina-6 (IL-6)¹¹, as quais

também exercem efeitos moduladores na fibrose miocárdica, um fator importante no desenvolvimento de arritmias¹³. Estudos *in vitro* comparando o perfil de expressão de citocinas inflamatórias demonstrou que monócitos de indivíduos crônicos indeterminados exibem um perfil mais imuno-modulatório, com expressão aumentada de IL-10 e diminuída de HLA-DR quando comparados com indivíduos cardiopatas, cujos monócitos apresentam um aumento de expressão de TNF- α ¹⁴, o que contribuiria para a manutenção de um estado inflamatório crônico.

Alterações perivasculares também se apresentam como uma alteração decorrente do estado inflamatório do coração. Estudos em tecidos cardíacos *post-mortem* revelaram que pacientes acometidos pela CC apresentavam alterações inflamatórias perivasculares bem como obstrução de coronárias intramurais devido à proliferação da camada íntima e espessamento da parede de arteríolas¹⁵. Tais obstruções são responsáveis por focos de isquemia e microinfartos no miocárdio, aumentando a ocorrência de miocitólise perivascular e o conseqüente reparo fibrótico da região afetada. Outros fenômenos decorrentes do distúrbio vascular podem ser a formação de microaneurismas, a dilatação e proliferação de microvasos e a agregação plaquetária e formação de trombos¹³.

Por fim, outro fenômeno relevante que contribui para o remodelamento cardíaco na CC é a disautonomia miocárdica, mais especificamente a perda de inervação parassimpática devido à lesão de gânglios e queda na população de neurônios intramurais, dado o parasitismo neuronal do *T. cruzi*. Tal perda de atividade neuronal leva a uma predominância descompensada das respostas

simpáticas aumentando assim a sensibilidade do coração às catecolaminas, o que por sua vez contribui para a progressão da cardiomiopatia, ainda que não haja um consenso sobre o papel da disautonomia como um fator desencadeador da CC^{12,13}.

1.3 Mecanismos de infecção do *T. cruzi* em cardiomiócitos e alterações celulares decorrentes

A interação entre o *T. cruzi* e as células cardíacas do hospedeiro pode ser dividida em três etapas diferentes: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. A etapa de adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes tanto na membrana do parasita quanto na membrana da célula-alvo. O grande número de moléculas envolvidas no reconhecimento dessas células aumenta a capacidade do parasita de explorar múltiplas estratégias de invasão¹⁶. Resíduos de carboidratos presentes em glicoconjugados da membrana dos cardiomiócitos são importantes para a aderência do parasita. Na membrana do parasita infectante (tripomastigota metacíclico), por sua vez, glicoproteínas da família Tc85 e outros grupos como gp80, gp82 e gp35/50 interagem de forma receptor-ligante com moléculas da superfície do cardiomiócito e da matriz extracelular (MEC), como a fibronectina e a laminina, ambas compostas por glicoproteínas multiadesivas¹⁷.

A interação entre as moléculas de membrana do tripomastigota metacíclico e dos cardiomiócitos leva ao disparo de vias de sinalização intracelular em ambos. Tanto no parasita como nas células cardíacas são ativadas vias envolvendo a fosfolipase-C (PLC), a qual gera inositol trifostato (IP3), promovendo o aumento nos níveis de cálcio intracelular¹⁸. Uma vez

liberado no citoplasma, o cálcio em excesso contribui para dois possíveis mecanismos de invasão: 1) ativação do mecanismo actina-dependente, no qual o rearranjo dos microfilamentos do citoesqueleto induz a célula hospedeira a enclausurar o tripomastigota ou 2) ativação do mecanismo lisossomo-dependente, no qual a despolimerização de actina cortical induz o recrutamento de lisossomos no sítio de ligação do parasita¹⁶. Mecanismos alternativos a esses como, por exemplo, a utilização do receptor de LDL-C para disparar a endocitose mediada por clatrin e a ativação de receptores do tipo *Toll-like* também já são conhecidos como formas eficientes de invasão^{17,19}.

Uma vez dentro da célula, o parasita induz uma série alterações, tanto transcricionais como metabólicas. Um modelo celular utilizando cardiomiócitos murinos demonstrou que a invasão do *T. cruzi* nessas células gera uma resposta transcional global, levando a ativação de vias relacionadas à resposta imune, inflamação, organização do citoesqueleto, interação celular, estresse oxidativo, entre outros²⁰, gerando um ambiente favorável a sobrevivência do parasita. Além disso, a interferência nas vias metabólicas celulares, tais como a glicólise, fosforilação oxidativa e síntese e oxidação de ácidos graxos é um fenômeno essencial no sucesso da replicação parasitária²¹. Outro efeito resultante da invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos, também demonstrado por modelo *in vitro*, é expressão de moléculas de membrana sinalizadoras do sistema imunológico, como por exemplo a CD40, responsável por interagir com células T ativadas, levando estabelecimento de um estado inflamatório local²².

1.4 Modelos celulares no estudo da relação *T. cruzi*-hospedeiro

A investigação das respostas transcricionais à infecção pelo *T. cruzi* em células não fagocíticas tem sido bem-sucedida em descrever as principais vias imediatamente perturbadas pelo parasita (variando de 3 a 72 horas após a infecção) e as respostas comuns entre os diferentes tipos celulares²³. No caso da doença de Chagas, modelos utilizando cardiomiócitos murinos primários e linhagens de cardiomiócitos humanos já foram realizados, elucidando respostas em relação ao comportamento desse tipo celular quando infectado²⁴. Porém, por não utilizarem células provenientes de paciente acometidos com a Doença de Chagas tais estudos não identificaram possíveis padrões de resposta específicos de cada condição clínica.

Da mesma forma, embora estudos transcriptômicos usando biópsias cardíacas de pacientes crônicos tenham sido importantes na definição do cenário inflamatório da CC²⁵, esses achados retratam um cenário de longo prazo no qual muitos dos aspectos iniciais da resposta à infecção parasitária não podem ser determinados. Além disso, a limitação na obtenção de biópsias cardíacas e a distinção intrínseca da função cardíaca de pacientes indeterminados impede uma verdadeira comparação a qual poderia revelar aspectos específicos de cada grupo quanto a suscetibilidade à doença de Chagas crônica.

Desde o surgimento da técnica de produção de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (do inglês, *human induced pluripotent stem-cells* ou hiPSCs) e, posteriormente, da capacidade de se diferenciar cardiomiócitos²⁶ a partir delas (denominados hiPSC-CM), esse tipo celular tem

sido amplamente adotado no estudo de doenças cardíacas. As principais vantagens em se utilizar hiPSC-CM estão relacionadas principalmente com fato de que o material de origem pode ser obtido de forma pouco invasiva, e as células resultantes da diferenciação serem paciente-específicas, ou seja, originárias de indivíduos que de fato apresentam a doença de interesse²⁷.

A aplicação dos hiPSC-CM vai desde estudos que focam na modelagem de doenças, procurando uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares de uma determinada cardiomiopatia, passando pelas aplicações em medicina regenerativa, até estudos cujo foco é a busca por drogas e/ou compostos seguros que possam interferir no fenótipo de uma doença²⁸. A junção desses modelos celulares com as técnicas de *High Content Screening* (HCS) e sequenciamento massivo de RNA (RNA-seq), por exemplo, ampliou a capacidade analítica desses modelos de forma inédita, permitindo agora o monitoramento de diversos eventos celulares e moleculares de forma múltipla, com a geração e a análise de dados em um curto período de tempo²⁹.

Num contexto no qual o interesse é avaliar a relação parasita-hospedeiro, o uso dos hiPSC-CM permite o monitoramento em tempo real da interação entre o parasita estudado e as células cardíacas humanas, de forma que se torna possível interferir em qualquer momento da infecção, bem como analisar de maneira detalhada a dinâmica da infecção sob diferentes condições experimentais e/ou terapêuticas³⁰. Isso mostra o potencial desse modelo celular no estudo da CC, uma vez que tal recapitulação permite o modelamento *in vitro* de características da doença, bem como torna a determinação fenótipos

celulares capazes de reportar o efeito de uma determinada intervenção uma tarefa menos trabalhosa e mais tempo e custo-efetiva.

Neste estudo, portanto, nossa proposta foi identificar as respostas transcricionais iniciais à infecção por *T. cruzi* gerando cardiomiócitos derivados hiPSC de ambos os grupos de pacientes chagásicos. Para tanto, os hiPSC-CM foram re-infectados com a cepa Y por 24 horas, 30 dias após o início da diferenciação, e tiveram seu transcriptoma sequenciado e analisado de forma comparativa. Os resultados aqui apresentados podem trazer novas informações sobre a capacidade de cardiomiócitos “paciente-específicos” em lidar com a invasão do parasita, bem como estabelecer uma resposta adequada à infecção, cruciais para estabelecer um cenário regulatório precoce que pode ter implicações importantes na fase crônica da doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta transcricional à infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CM) de pacientes chagásicos na fase crônica indeterminada e com cardiomiopatia chagásica.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer linhagens de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC), a partir da reprogramação de eritroblastos de pacientes chagásicos indeterminados e cardiopatas;
- Analisar a eficiência de infecção e proliferação do *T. cruzi* em PBMCs (monócitos, linfócitos T e linfócitos B) e hiPSC-CM de pacientes chagásicos cardiopatas e indeterminados, em quatro pontos temporais;
- Avaliar a resposta transcricional global dos hiPSC-CM após a infecção por *T. cruzi* através da técnica de RNA-seq e análises de enriquecimento de vias biológicas;
- Analisar comparativamente os perfis de resposta transcricional à infecção por *T. cruzi* em hiPSC-CM de indivíduos com cardiomiopatia chagásica e na fase indeterminada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e seleção dos participantes

O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FMUSP (CAPPesq), através da Plataforma Brasil, e aprovado dentro das normas do comitê (CAAE: 89242218.0.0000.0068) (Anexo I). Foram convidados a participar do projeto pacientes em duas condições: indivíduos com sorologia positiva para doença de chagas com cardiomiopatia chagásica confirmada e indivíduos com sorologia positiva, porém na fase indeterminada da doença. Os pacientes foram selecionados a partir de uma casuística do Instituto de Medicina Tropical (IMT), relativa ao projeto “Centro de Pesquisa em Biomarcadores em Doenças Negligenciadas Tropicais de São Paulo/Minas Gerais”, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CEP-FMUSP) sob o número do protocolo CAAE 00580612.8.0000.0065 e de responsabilidade de Profª Drª. Ester Cerdeira Sabino. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para indivíduos na fase indeterminada foram: sorologia positiva em ao menos duas ocasiões, com ausência de comprometimento cardíaco e/ou gastrointestinal confirmados por ECG e exames de imagem, respectivamente. Já os indivíduos com cardiomiopatia chagásica deveriam apresentar sorologia positiva em duas ocasiões com acometimento cardíaco apresentado por cardiomegalia, na ausência ou presença de disfunção cardíaca (FEV<30%).

Foram excluídos indivíduos com sorologia positiva para doença de Chagas em menos de duas ocasiões e, no caso de indivíduos com cardiomiopatia chagásica, histórico de eventos prévios como infarto agudo do miocárdio ou cardiomiopatia hipertrófica documentada. Indivíduos utilizados como controle deveriam apresentar sorologia negativa para doença de Chagas, ausência de histórico familiar da doença bem como nunca ter residido em região endêmica de insetos transmissores.

3.3 Obtenção das células mononucleares sanguíneas

Para a obtenção de células mononucleares sanguíneas (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* ou PBMCs), foram coletados de cada paciente dois tubos a vácuo com Ficoll (BD Vacutainer[®]), de 8 ml, específicos para separação de células mononucleares sanguíneas. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 1800G para separação da fração mononuclear. Dentro de um fluxo laminar, as amostras foram retiradas do tubo e lavadas com PBS-EDTA 0,1M, seguidas por um tratamento com tampão de lise de hemácias por 12 minutos em T.A., e então novamente lavadas com PBS-EDTA 0,1M. Ao final do processo, as células foram contadas em câmara de Neubauer e congeladas em meio com FBS e DMSO 10%. As amostras foram mantidas em freezer -80°C durante as primeiras 24 horas, e então armazenadas em nitrogênio líquido.

3.4 Expansão e reprogramação de eritroblastos em hiPSCs

O protocolo de expansão e reprogramação de eritroblastos utilizado foi gentilmente cedido pela Prof.^a Lygia da Veiga Pereira (Instituto de Biociências/USP), e executado com pequenas modificações (Figura 3).

Após descongelamento, as PBMCs foram cultivadas e expandidas para linhagem eritróide por um período entre 10 e 12 dias, em incubadora a 37°C, 5% CO₂. O dia de descongelamento era considerado como dia zero (D0). O meio de cultivo utilizado durante a expansão (meio MNC) era composto por meio StemSpan (Stemcell Technologies) enriquecido com citocinas específicas (R&D systems) para expansão de eritroblastos, dentro das seguintes concentrações: IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) a 40 ng/ml; SCF (*Stem-cell factor*) a 100ng/ml; IL-3 (Interleucina-3) a 10ng/ml e EPO (eritropoietina) a 2U/ml. Foram adicionados também 1 µM/ml de dexametasona (Sigma-aldrich). A troca do meio foi realizada a cada 72 horas (D3, D6 e D9).

Entre D0 e D9, as células foram cultivadas em uma concentração de 2x10⁶ células/ml, em um poço de placa P24. Do dia D9 em diante, as células foram cultivadas em uma concentração de 1x10⁶ células/ml, em um poço da placa P12. Assim que o poço atingiu novamente a concentração de 2x10⁶ células/ml, os eritroblastos foram direcionados para reprogramação.

Antes da reprogramação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS 1x, e contadas em câmara de Neubauer. Entre 1 e 2x10⁶ células foram misturadas a uma solução contendo reagentes para nucleoporação, e entre 1 e 1,5ug de plasmídeos episomais, contendo 5 fatores de reprogramação (Oct-4, Sox-2, Lin28, L-Myc e Klf-4), provenientes do kit *Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming* (Thermo Fisher). Foi realizada então a nucleoporação dos eritroblastos, com uso do kit *Human CD34+ Cell Nucleofector™*, no equipamento Amaxa Nucleofector II (Lonza), utilizando o programa de nucleoporação T-016. Após a nucleoporação, as células foram transferidas

delicadamente para um poço de placa P12 contendo 2 ml de meio MNC acrescido de 20 ng/ml de fator básico de crescimento de fibroblastos (*Basic human fibroblast growth factor* ou bFGF).

Dois dias após a reprogramação, as células foram transferidas para dois poços de placa P12 contendo Geltrex™ (Thermo Fisher), e as placas foram centrifugadas a 200 G por 30 minutos para aderência das células. As células foram então cultivadas por 24 horas em DMEM-High 10% FBS, acrescido de Antimicótico-antibiótico, GlutaMax® (Thermo Fisher), bFGF (20ng/ml) e Butirato de sódio (NaB – 0,25mM), em estufa de hipóxia (5% CO₂ e 1% O₂). No dia seguinte, o meio foi parcialmente trocado por meio E8 (Essential 8 – Thermo Fisher), suplementado com bFGF (20ng/ml) e NaB (0,25mM). A partir de então, o meio E8 foi trocado a cada 48 horas. Após o aparecimento das primeiras colônias, a frequência de troca do meio passou a ser diária.

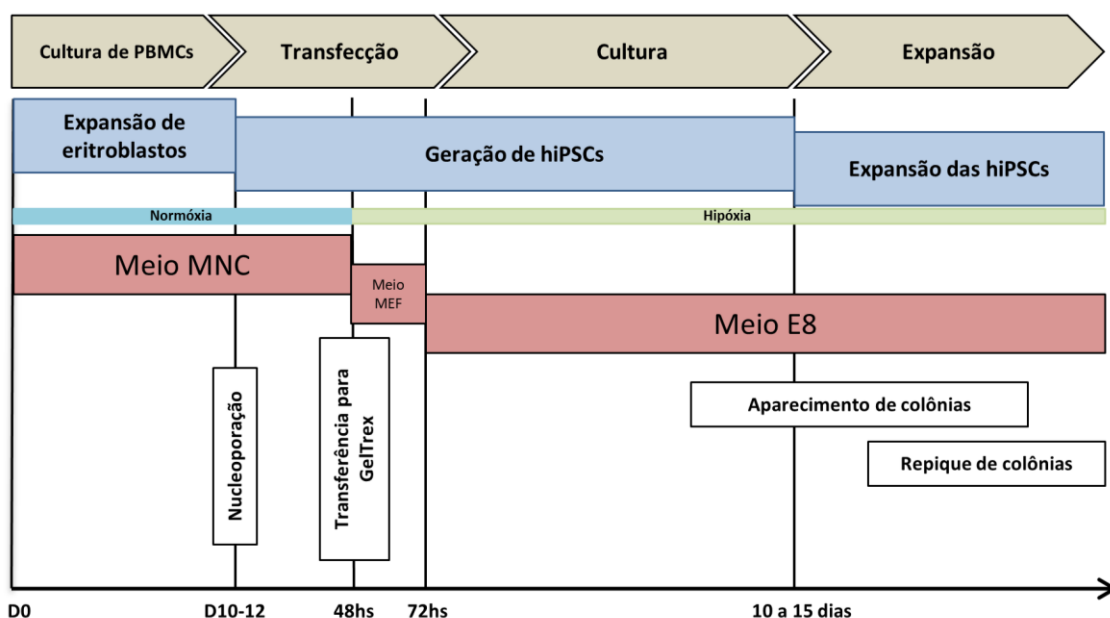


Figura 3: Processo de produção de hiPSCs. Os eritroblastos são expandidos entre 10 e 12 dias, em normóxia. Ao atingirem 2×10^6 células, os eritroblastos são nucleoporados com plasmídeos episomais e, 48 horas depois, são aderidos à poços com Geltrex e mantidos em hipóxia. O meio de cultura (E8) é trocado a cada 48 horas e, a partir do surgimento de colônias, o meio é trocado diariamente (adaptado de Dowey et al.³¹).

3.5 Expansão e criopreservação das hiPSCs

A partir do aparecimento das colônias, o monitoramento quanto a seu crescimento e morfologia foi diário. O repique foi feito uma vez que uma colônia atingia a totalidade do campo de visão da objetiva de 10x. Esse procedimento foi realizado com o microscópio “EVOS XL core” (Thermo Fisher) dentro de um fluxo laminar, devidamente esterilizado.

O processo de repique seguia os seguintes passos: A colônia desejada era identificada no microscópio com a objetiva de 4x, a tampa da placa era removida e, com o auxílio de uma agulha de injeção, a colônia era cortada em pequenos pedaços por linhas verticais e horizontais. Em seguida, acoplava-se uma ponteira P10 na extremidade de uma ponteira P1000, dobrava-se a ponteira P10 e um ângulo de 90 graus, e raspava-se a colônia para que os pequenos fragmentos se soltassem do fundo da placa. Ao mesmo tempo, o meio era aspirado para que os fragmentos soltos fossem coletados pela pipeta. Uma vez coletada toda a colônia, o meio aspirado era despejado em um poço de placa P12 contendo GelTrex™ e 2ml de meio E8 suplementado com 10µM de inibidor de via ROCK Y-27632 (RI), bFGF e NaB. Após esse procedimento a placa era mantida em incubadora a 37°C, 5% CO₂. Cada colônia isolada recebeu uma identificação, e a partir desse momento passavam a ser tratadas com um clone individual. O repique foi considerado como a passagem zero (P0).

Os clones foram expandidos com troca diária de meio E8 suplementado com NaB. A partir do momento que um poço atingisse 80% a 90% de confluência, uma passagem era realizada. O meio era removido do poço e as

células eram lavadas com 500µl de Versene (Thermo Fisher). Em seguida, adicionavam-se outros 500µl de Versene, e a placa era devolvida à incubadora por aproximadamente 3 minutos. Após esse tempo, as células eram observadas em microscópio para verificação do descolamento, e então eram finalmente soltas do poço com 500µl de meio E8 aquecido e suplementado com RI. Aproximadamente 50µl de meio eram coletados e transferidos para um poço novo contendo 2 ml de meio E8 suplementado com 10µM de RI.

A partir da P2, um poço de cada clone foi criopreservado para armazenamento em passagem baixa. As células foram soltas do poço com a utilização de Versene conforme descrito acima e congeladas em solução crioprotetora com 10% DMSO. Os criotubos foram então colocados em um Mr. Frosty® (Nalgene) e deixados por 30 minutos em freezer -20°C. Em seguida, foram acondicionados em freezer -80°C por 24 horas. Após esse período foram transferidos para um galão de nitrogênio líquido para armazenamento de longo prazo. O restante das células foi mantido em cultura e direcionado para caracterização.

3.6 Caracterização das hiPSCs

3.6.1 Expressão gênica dos marcadores de pluripotência

Um poço de placa P6 de cada clone foi utilizado para extração de RNA. O meio de cultura foi removido, e os poços foram lavados uma vez com PBS 1x. Após a lavagem, as células foram removidas do poço com 600µl de Trizol® (Thermo Fisher), e a extração do RNA se deu conforme as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a reação da transcriptase reversa para a

composição do cDNA, com a utilização do kit *SuperScript IV Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante.

A reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* ou PCR), foi feita utilizando o kit TopTaq™ PCR (QIAGEN), seguindo as seguintes proporções: 1 µl de cDNA; 0,6 µl de primers F e R; 7,5 µl de Master Mix 2x; 5,3 µl de H₂O. Foram utilizados primers para os genes *REX1*, *KLF4*, *OCT4*, *NANOG* e *LIN28A* (Anexo III). O gene *GAPDH* também foi amplificado como um controle da reação. A reação foi realizada em termociclador, seguindo as orientações do fabricante. O resultado foi revelado em gel de agarose 2%.

3.6.2 Citometria de Fluxo

Um poço de placa P6 de cada clone foi utilizado para realização do experimento de citometria de fluxo. As células foram soltas do poço com 500µl de Versene e coletadas em PBS 1x. Os anticorpos utilizados no experimento estão listados na Tabela 1. Para a marcação de proteínas de membrana (TRA-1-60 e TRA-1-81), as células foram centrifugadas a 1100 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em FACS *Buffer* (PBS + 2% FBS) com o anticorpo primário de membrana diluído em 1:300. Em seguida, foram incubadas por 30 minutos do escuro.

Para marcação das proteínas nucleares (NANOG e Oct-4), as células foram permeabilizadas com solução de FACS *Buffer* + Triton 0,1% por 15 minutos a 4°C. Foram então centrifugadas a 1100 rpm e ressuspendidas em FACS *buffer* contendo anticorpo primário nuclear diluído em 1:300. Incubou-se

então por mais 30 minutos e, após esse período, as células foram fixadas com PFA 1% por 15 minutos em T.A.

Após a fixação, as células foram lavadas com FACS *Buffer* + Triton 0,1% e incubadas por mais 30 minutos com anticorpo secundário diluído em FACS *Buffer* (1:300). Foram utilizados os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-Mouse e Alexa Fluor 647 anti-Rabbit para as proteínas de membrana e nucleares, respectivamente. Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em FACS *Buffer*, e armazenadas a 4°C. Quando possível, as amostras eram lidas no mesmo dia da marcação com o anticorpo secundário. As amostras foram analisadas no equipamento C6 Accuri (BD Biosciences) e a quantidade mínima de eventos registrados foi de 20.000 dentro do *gate* de hiPSCs.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofluorescência e citometria de fluxo.

Anticorpos primários				
Anticorpo	Fornecedor	Referência	Animal	Diluição
TRA-1-60	Cell Signaling	4746S	Mouse	1:300
TRA-1-81	Cell Signaling	4745S	Mouse	1:300
OCT4	Cell Signaling	2840S	Rabbit	1:300
NANOG	Cell Signaling	4903S	Rabbit	1:300
SOX2	Cell Signaling	3579S	Rabbit	1:300
Anticorpos secundários				
Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	A21202	Anti-mouse	1:300
Alexa Fluor 647	Thermo Fisher	A21244	Anti-rabbit	1:300

3.6.3 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em poços de placa P24, em baixa concentração e mantidas com meio E8 diariamente. Quando foram observadas pequenas colônias nos poços, as células foram fixadas com PFA 4% por 30 minutos em T.A. Em seguida, os poços direcionados para marcação de proteínas celulares foram permeabilizados com 200µl de PBS-Triton 0,5% por 20 minutos em T.A., seguidas de lavagem com PBS 1x por três vezes. Em seguida, todos os poços foram saturados com 200µl de PBS-BSA 3%, por 30 minutos em T.A. Após essa etapa, foi feita a marcação com anticorpo primário diluído em solução PBS-BSA 1% (1:300), em um volume de 200µl. A placa foi vedada e mantida a 4°C, *overnight*, sob agitação. Foram marcadas as proteínas de membrana TRA-1-60 e TRA-1-81, e as nucleares Sox-2 e NANOG (Tabela 1).

Após a primeira incubação, a solução com anticorpo primário foi retirada e os poços foram lavados com PBS-BSA 1% + Tween 0,1%. Incubou-se então o anticorpo secundário diluído em PBS-BSA 1% (1:300) por 1 hora à T.A., no escuro, sob agitação. Foram utilizados os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-Mouse e Alexa Fluor 555 anti-Rabbit para as proteínas de membrana e nucleares, respectivamente. Após a segunda incubação, foi realizada a marcação com DAPI, diluído em PBS 1x (1:1000), por 20 minutos em T.A., no escuro, sob agitação. Ao final dessa etapa cada poço foi lavado três vezes com PBS-BSA 1%, e os poços foram mantidos em 1 ml de PBS 1x para armazenamento. As placas foram vedadas com Parafilm (Bemis), cobertas com papel alumínio e armazenadas a 4°C.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência, separadamente para cada canal. A junção das imagens (*merge*) foi realizada no software ImageJ (NCBI).

3.6.4 Exame de cariótipo

As células foram passadas para uma garrafa T25, em baixa concentração, e mantidas com meio E8 até atingirem aproximadamente 50% de confluência. Após esse período, as garrafas foram totalmente preenchidas com meio 50% E8 + 50% RPMI e enviadas a um laboratório especializado para realização do exame de cariótipo por bandeamento G. Foram analisadas 20 a 25 metáfases por clone.

3.6.5 Teste de contaminação por micoplasma

No dia seguinte à troca de meio, 1 ml do sobrenadante de um poço de cultura foi coletado e armazenado a 4°C até a realização do teste. O meio coletado foi centrifugado a 200G por 1 minuto e 1µl do sobrenadante foi utilizado como *template* para a PCR, juntamente com 5x Green GoTaq Flexi *Buffer* (5µl), Taq DNA polimerase (0,1µl), MgCl (25mM, 2µl), dNTPs (25mM, 0,25µl), *primers* sense e anti-sense específicos para micoplasma³² (1µl) e água (15,65µl). A reação ocorreu em termociclador, na seguinte programação: 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. A reação contou com um controle negativo e um controle positivo (material genético de micoplasma). Ao final da reação, 10µl foram analisados em gel de agarose 2% para revelação do resultado.

3.7 Cultivo de *Trypanossoma cruzi*

Parasitas da cepa Y, modificada por Schenkman e colaboradores³³ para expressar proteína verde fluorescente (do inglês, *Green Fluorescent Protein* ou GFP) na fase amastigota, foram cultivados em células da linhagem LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco Rhesus), em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e 1% Penicilina-Estreptomicina (Thermo Fisher). As células LLC-MK2 foram cultivadas em frascos T125, com troca de meio a cada 48 horas. A taxa de infecção das células era observada no microscópio óptico diariamente através da presença e da quantidade de amastigotas intracelulares. Uma vez que tripomastigotas eram observados no sobrenadante e as células apresentavam alta taxa de lise, novas células eram colocadas no frasco para permitir a continuidade do ciclo de replicação parasitária. O sobrenadante removido dos frascos T125, contendo tripomastigotas, foi filtrado para remoção de *debris* celular e armazenado em estufa a 37°C, 5%CO₂.

3.8 Ensaio de infecção de células mononucleares sanguíneas.

Para o experimento de infecção das PBMCs, células de um paciente com cardiomiopatia chagásica foram descongeladas juntamente com células de um paciente indeterminado, e um controle não infectado. Esse experimento foi realizado em 5 lotes, compondo um tamanho amostral de 5 pacientes indeterminados, 5 cardiopatas e 5 controles. Após descongelamento as células foram centrifugadas a 300 G por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e 2×10^5 células foram plaqueadas em poços de placa P12. Foram plaqueados 10 poços para cada indivíduo, para que pudessem ser realizados os tempos de infecção de zero, 03, 06, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi), em duplicata. Com exceção dos poços de 0 hpi, cada poço recebeu 2×10^6

tripomastigotas (MOI 10:1). As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após 24 horas, as células dos poços de 48 hpi foram centrifugadas, lavadas e plaqueadas em poços limpos, sem a presença de parasitas.

Após o término de cada tempo de infecção, as células foram centrifugadas e lavadas com tampão de lavagem (PBS 1x, com 2% FBS). Em seguida, foram incubadas com anticorpos conjugados anti-CD3 (PE), anti-CD19 (PE-Cy5) e anti-CD14 (APC), para marcação de linfócitos T, linfócitos B e monócitos, respectivamente (Tabela 2). A incubação foi realizada no escuro, a 4°C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram centrifugadas duas vezes com tampão de lavagem e submetidas à fixação com PFA 2% por 20 minutos, no escuro. Por fim, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS 1x para leitura no citometro de fluxo.

As amostras foram analisadas no equipamento C6 Accuri (BD Biosciences), imediatamente após a fixação com PFA 2%. Os canais dedicados para a análise foram: FL1 – *T. cruzi* (GFP+); FL2 – Linfócito T (CD3+); FL3 – Linfócito B (CD19+); FL4 – Monócito (CD14+). As amostras de tempo zero foram utilizadas para a demarcação dos *gates* clássicos de linfócito T e B, e monócitos (Figura 4). A quantidade de eventos requisitados foi de 20.000, dentro do *gate* de linfócitos.

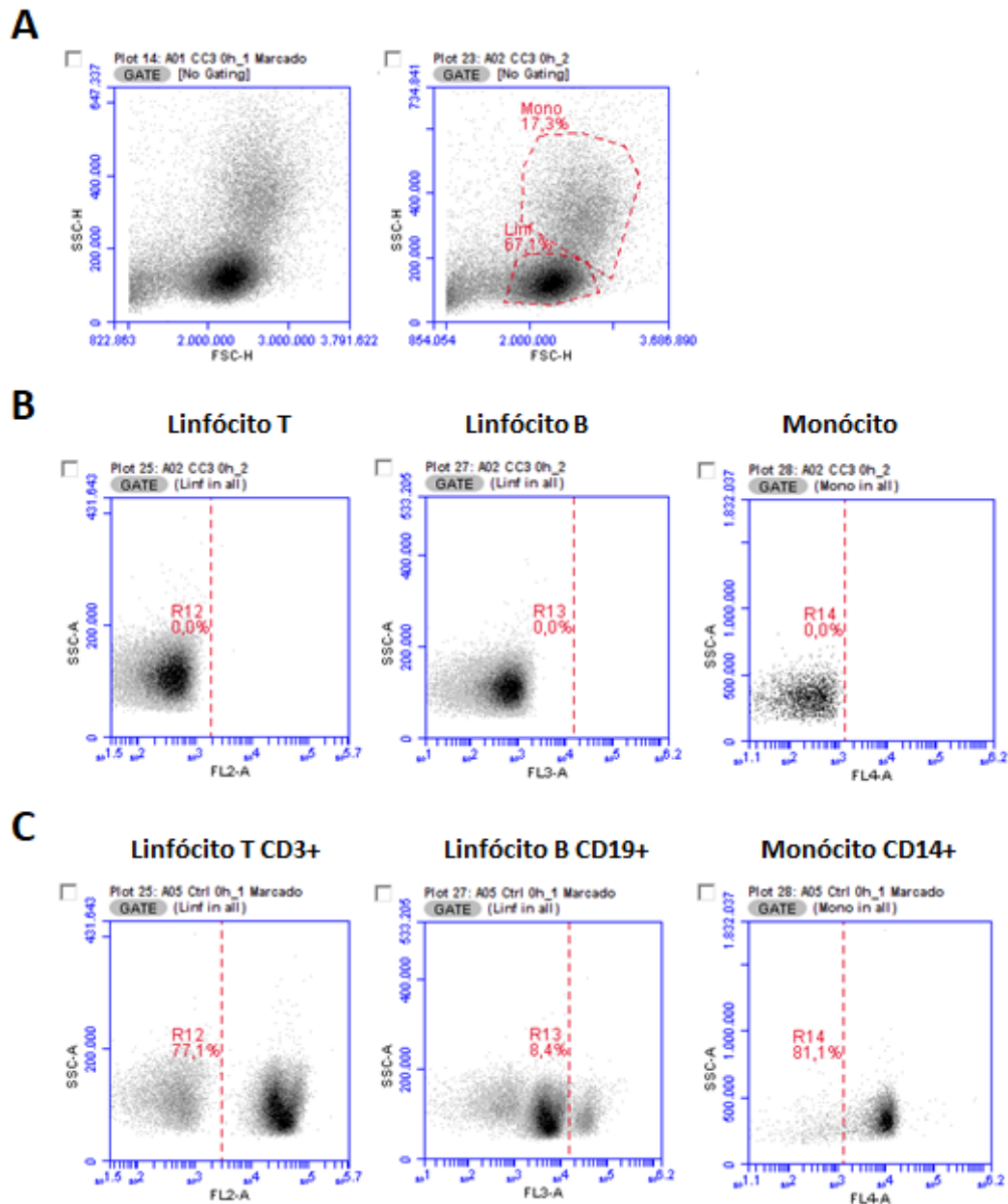


Figura 4: Gates morfológicos utilizados para a análise de infecção de PBMCs por citometria de fluxo. A) Gates “clássicos” de linfócitos e monócitos, com e sem demarcação. B) Canais utilizados para quantificação de cada tipo celular, sem marcação com anticorpos. C) Canais utilizados para quantificação de cada tipo celular, com marcação com anticorpos.

Tabela 2: Anticorpos utilizados na marcação de PBMCs.

Anticorpo	Fornecedor	Referência	Diluição
PE Mouse Anti-Human CD3	BD Biosciences	555333	1:100
APC Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences	555399	1:100
PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD19	BD Biosciences	555414	1:100

Os resultados dos experimentos de infecção das PBMCs foram analisados no software Prism 8 (GraphPad). Foram tomadas como variáveis a porcentagem de eventos GFP+, a intensidade média do GFP ao longo do tempo, e a razão da intensidade GFP 48/24 hpi. Comparações envolvendo os três grupos foram feitas através da Análise de variância de uma via (One-way ANOVA), e comparações envolvendo apenas dois grupos foram realizadas através do Teste-t de Student. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como valor de significância estatística.

3.9 Diferenciação de cardiomiócitos a partir de hiPSCs

Cardiomiócitos foram obtidos através da diferenciação de hiPSCs utilizando o protocolo padronizado com a molécula Wnt-C59, conforme previamente relatado³⁴, com pequenos ajustes (Figura 5). Antes do início da diferenciação, as hiPSCs foram repicadas em pelo menos três passagens longas (taxa de repique 1:15-20) e três passagens curtas (taxa de repique 1:2-3) com meio StemFlex (Thermo Fisher) suplementado com 10 μ M de RI. As células foram mantidas em placas de 6 poços durante todo o processo. Quando a confluência atingiu em torno de 80%, o meio foi trocado por RPMI B27- (RB-) suplementado com 9 μ M de CHIR99021 para indução de diferenciação mesodérmica, por 24 horas.

O dia inicial foi definido como Dia 0 (D0). No D1 as células foram lavadas com PBS 1x e RB- fresco foi adicionado à cultura (sem CHIR99021). As células foram então mantidas intactas até D3 quando o meio foi trocado por RB- suplementado com 2 μ M de WNT-C59 (diluição 1:5000). No D5, o meio com WNT-C59 foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x e RB-

fresco foi adicionado. No D7, RB- foi alterado para RPMI B27+ (RB+) com 1% PS. Células contráteis eram geralmente observadas entre D8 e D10. Uma vez que eram observadas células contráteis em vários pontos do poço, RB+ sem glicose foi adicionado à cultura para seleção negativa de possíveis células contaminantes. A privação de glicose foi mantida de 2 a 6 dias (1 a 3 trocas de meio), dependendo da taxa de morte celular e inspeção visual de células não contráteis ou com morfologia fibroblastóide. Após a finalização da privação de glicose, os hiPSC-CM foram mantidos com RB+ 1% PS até D20, quando foram repicados com Tripsina (Thermo Fisher) por 7 minutos a 37°C, filtrados em um filtro de 100µm e contados em câmara de Neubauer. As células foram então plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço e em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço para experimentos de imunofluorescência e RNA-seq, respectivamente.

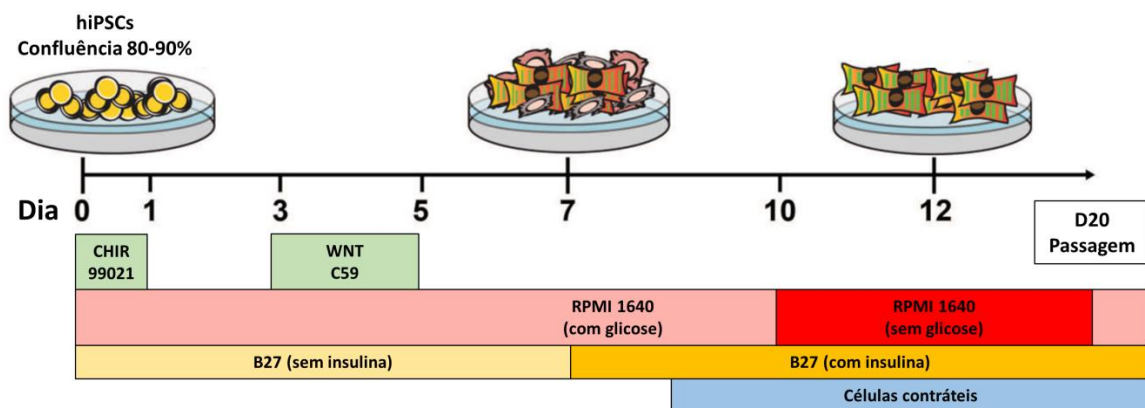


Figura 5: Principais etapas do processo de diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos (hiPSC-CM) (adaptado de Sharma et al. ³⁴).

Uma alíquota de hiPSC-CM foi separada e avaliada quanto à pureza através da quantificação de troponina I cardíaca por citometria de fluxo. As células foram fixadas em PFA 2% por 30 minutos, permeabilizadas com Triton

0,1% por 15 minutos e incubadas com anticorpo anti-troponina I cardíaca humana (Hytest 4T21/2) na diluição de 1:300, por 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 647 Anti-goat (Thermo Fisher A-21447). Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. A quantidade mínima de pureza considerada adequada para os experimentos foi de 90%.

3.10 Ensaio de infecção por imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado com 4 pontos temporais (03, 06, 24 e 48 hpi). Os hiPSC-CM foram incubados com parasitas em RB+ 1% PS em uma razão parasita/célula de 10:1, em triplicata. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com PFA 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI e as células foram analisadas em um EVOS™ M7000 Imaging System (Thermo Fisher) no mesmo dia da fixação. Oito campos aleatórios de cada poço foram capturados e os amastigotas GFP+ e os núcleos corados foram contados em um *script* personalizado no software MATLAB (Mathworks Inc.) desenvolvido por nosso grupo (dados não publicados). A razão parasita/núcleo foi usada como variável de entrada para ANOVA no GraphPad Prism 8.

3.11 Ensaio de RNA-seq

Os hiPSC-CM foram incubados com *T. cruzi* em uma razão parasita/célula de 10:1. Duas replicatas infectadas e duas não infectadas foram geradas por clone diferenciado. As replicatas de RNA-seq foram mantidas em contato com tripomastigotas em RB+ 1% PS por 24 horas a 37°C em 5% CO₂. Após 24 hpi, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x para remoção

de parasitas extracelulares e lisadas com reagente TRIzol™ (Thermo Fisher) para extração de RNA. As replicatas não infectadas foram mantidas sob as mesmas condições das infectadas.

O preparo da biblioteca foi realizado usando o protocolo do kit de preparação da biblioteca Nextera (Illumina). As bibliotecas de RNA-Seq foram agrupadas e executadas em quatro *lanes* (uma *flow cell*) usando a plataforma Illumina NextSeq500. O cálculo da cobertura foi ajustado para gerar 30 a 50 milhões de leituras (*reads*) por replicata. As sequências geradas foram alinhadas pelo programa STAR contra o genoma humano (hg38).

3.12 Análise de genes diferencialmente expressos e vias moleculares enriquecidas

A análise de expressão gênica diferencial (DE) foi realizada com o pacote DESeq2³⁵ no programa RStudio. Os genes com uma soma de contagens inferior a 10 *reads* foram considerados genes de baixa contagem e foram removidos antes da análise. O modelo de análise foi desenhado considerando as seguintes variáveis: lote de diferenciação (*batch*); grupo (CC ou Ind), tempo (0 ou 24) e um termo de interação para grupo:tempo. O grupo IND e o tempo de 0hpi foram considerados como os níveis de referência. Como o coeficiente do termo de interação retorna os genes mais variáveis entre todas as condições, os genes com valor de *p* ajustado (*padj*) < 0,05 no termo de interação foram considerados como genes diferencialmente expressos (DEGs).

O pacote ClusterProfiler³⁶ foi utilizado para a análise de enriquecimento de termos e vias biológicas, bem como para gerar os gráficos e imagens

resultantes dessas análises. As coleções *Gene Ontology* (GO) e *Hallmark* (MSigDB) foram utilizadas como referências. Inicialmente, foi realizada uma análise de super-representação (do inglês, *Over-representation analysis* ou ORA) para identificação de termos biológicos relacionados aos DEGs identificados, sem distinção entre grupos. A ORA foi realizada com a função *enrich()* utilizando o identificador entrezID para os DEGs e com uma lista de genes “*background*” contendo o identificador de todos os genes mantidos após a filtragem de contagens mínimas. A redundância dos termos de GO foi realizada com a função *simplify()* após a ORA.

A análise de enriquecimento de grupos de genes (do inglês, *Gene set enrichment analysis* ou GSEA) foi realizada utilizando uma lista dos DEGs ranqueados pela fórmula $|\text{ sinal}(\log_2\text{FoldChange}) \times -\log_{10}(\text{padj})|$. Nessa análise estávamos particularmente interessados em genes com resposta diferencial entre os grupos na infecção por *T. cruzi*. Assim, os valores de Log2FoldChange (L2FC) positivos se referiam aos DEGs do grupo CC enquanto valores de L2FC negativos se referiam aos DEGs do grupo Ind. A lista ranqueada do maior para o menor valor foi analisada com a função *gsea()* do pacote ClusterProfiler no programa Rstudio. Tanto a ORA como GSEA foram limitadas a um intervalo de 5 a 500 genes por termo, com um limite máximo de 1000 permutas.

4. RESULTADOS

4.1 Casuística

Ao todo, foram convidados a participar do estudo 13 pacientes, sendo 7 na forma indeterminada e 6 com diagnóstico de cardiomiopatia chagásica. A Tabela 2 apresenta as características dos pacientes coletados, bem como alguns aspectos clínicos dos pacientes cardiopatas. Não foram feitas distinções em relação à idade, sexo ou região de origem/moradia. Não houve nenhum caso de recusa de participação. A diferença entre a média das idades dos grupos Indeterminado e CC foi significativa em termos estatísticos (CC: $47,17 \pm 8,01$ e Ind: $61,57 \pm 9,00$ – p-valor = 0,016), sendo que os indivíduos cardiopatas eram mais jovens que os indivíduos indeterminados (Figura 6).

Tabela 3: Dados dos pacientes cardiopatas e indeterminados coletados para o estudo.

Paciente	Sexo	Idade	Características clínicas
Cardiopatas			
CC1	F	57	Hipocinesia em parede inferolateral; FE 55%
CC2	M	33	FEVE 19%; VD e VE com dilatação e hipocinesia; fibrose difusa; histórico de PCR
CC3	M	49	FEVE 48%; EVs polimórficas frequentes
CC4	M	45	AVCi; Diminuição de forças septais; Alt. de repolarização; FA paroxística; FE 49%
CC5	F	51	FE 46%; discinesia em região apical
CC6	F	48	VE com hipertrofia excêntrica; hipocinesia difusa; FE 42%; histórico de síncope
Indeterminados			
Ind1	F	75	Assintomático
Ind2	M	48	Assintomático
Ind3	M	64	Assintomático
Ind4	M	62	Assintomático
Ind5	M	68	Assintomático
Ind6	F	53	Assintomático
Ind7	M	61	Assintomático

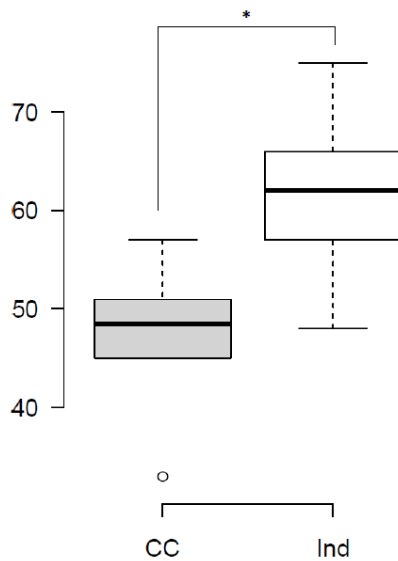


Figura 6: Comparação da distribuição de idade entre pacientes cardiopatas e indeterminados (Teste-t de Student. CC: $47,17 \pm 8,01$ e Ind: $61,57 \pm 9,00$ – p-valor = 0,016).

4.2 Reprogramação dos eritroblastos em hiPSCs

Foram selecionados 3 pacientes indeterminados (Ind4, Ind5 Ind6) e 3 pacientes cardiopatas (CC4, CC5 e CC6) para reprogramação em hiPSCs. Os pacientes indeterminados foram escolhidos de forma aleatória, enquanto os pacientes cardiopatas foram selecionados em função da gravidade do fenótipo. A Figura 7 traz o perfil de expansão dos eritroblastos dos 4 pacientes, e a Figura 8 o perfil morfológico da cultura nos dias 3, 6 e 9 da expansão.

Nota-se que entre D3 e D6 do cultivo houve uma queda considerável no número de células, caracterizando essa etapa como um período de seleção, ao passo que após D6 houve uma recuperação do número de células, caracterizando o momento da expansão dos eritroblastos. É possível também observar que inicialmente a cultura de PBMCs apresenta um perfil heterogêneo, que se torna mais homogêneo ao longo dos dias em decorrência da seleção e expansão do eritroblastos (Figura 8).

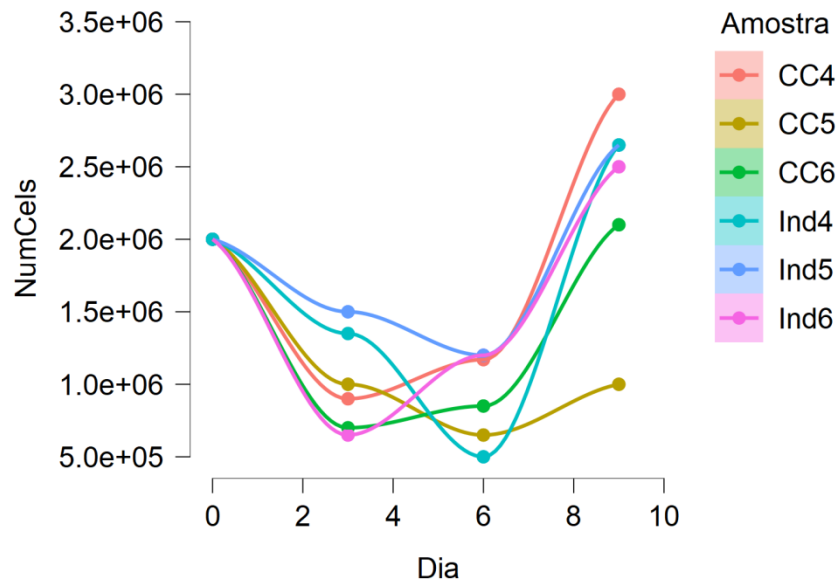


Figura 7: Perfil de expansão dos eritroblastos ao longo de 9 dias de cultura.

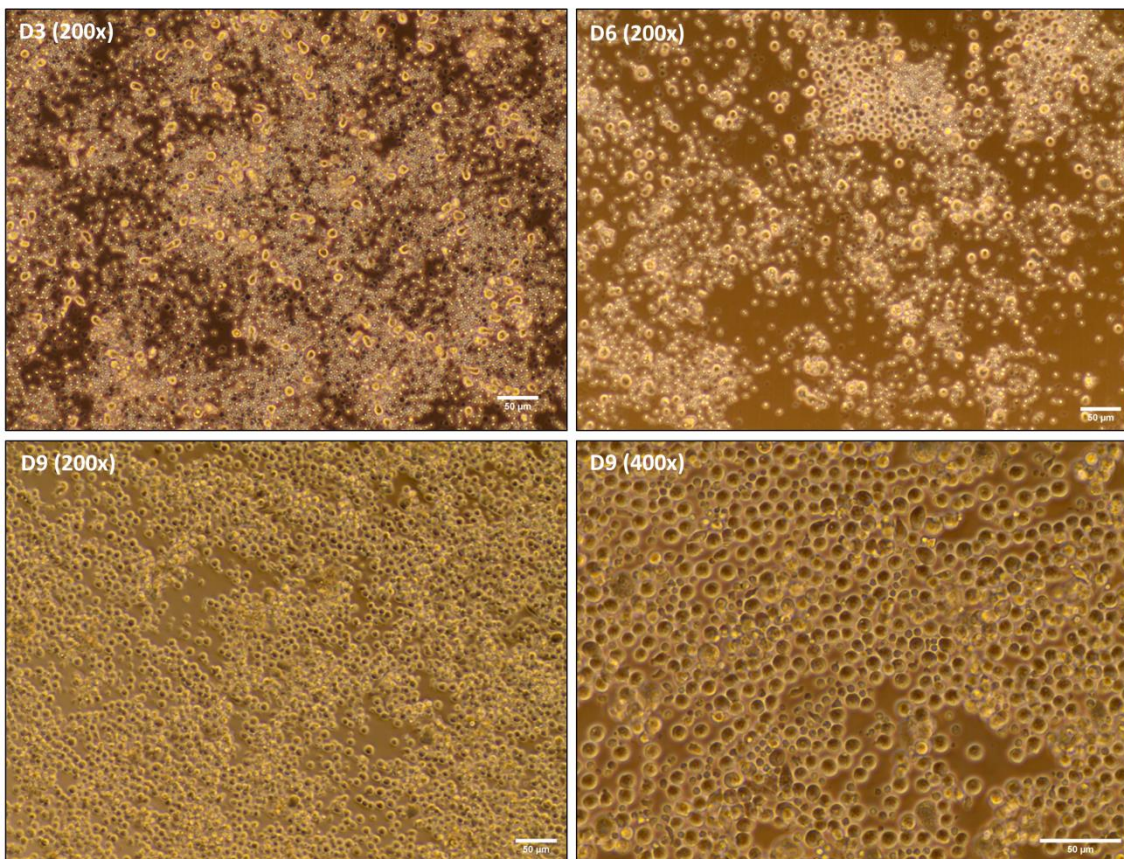


Figura 8: Perfil morfológico da cultura de PBMCs (D3) e eritroblastos (D6 e D9).

Todas as amostras foram nucleoporadas em uma quantidade entre 1 a 2×10^6 células (Tabela 3). As colônias coletadas dos poços de reprogramação apresentaram morfologia típica de colônias de células-tronco embrionárias, com bordas bem definidas e ausência de células em diferenciação (Figura 9). As colônias foram coletadas separadamente e expandidas como clones individuais. A quantidade de colônias observadas e coletadas no processo de reprogramação de cada paciente está listado na Tabela 4.

Tabela 4: Reações de reprogramação realizadas para os pacientes CC e IND.

Amostra	Num. Cél. Nucleoporadas	Epi5 [ug]	Nucleoporação	Num. Clones	Eficiência
CC4	1×10^6	1ug	D10	14	0,0014%
CC5	2×10^6	1,5ug	D12	12	0,0006%
CC6	2×10^6	2,5ug	D10	16	0,0008%
Ind4	2×10^6	1,25ug	D10	15	0,00075%
Ind5	1×10^6	1,25ug	D10	17	0,0017%
Ind6	1×10^6	1,25ug	D10	18	0,0018%

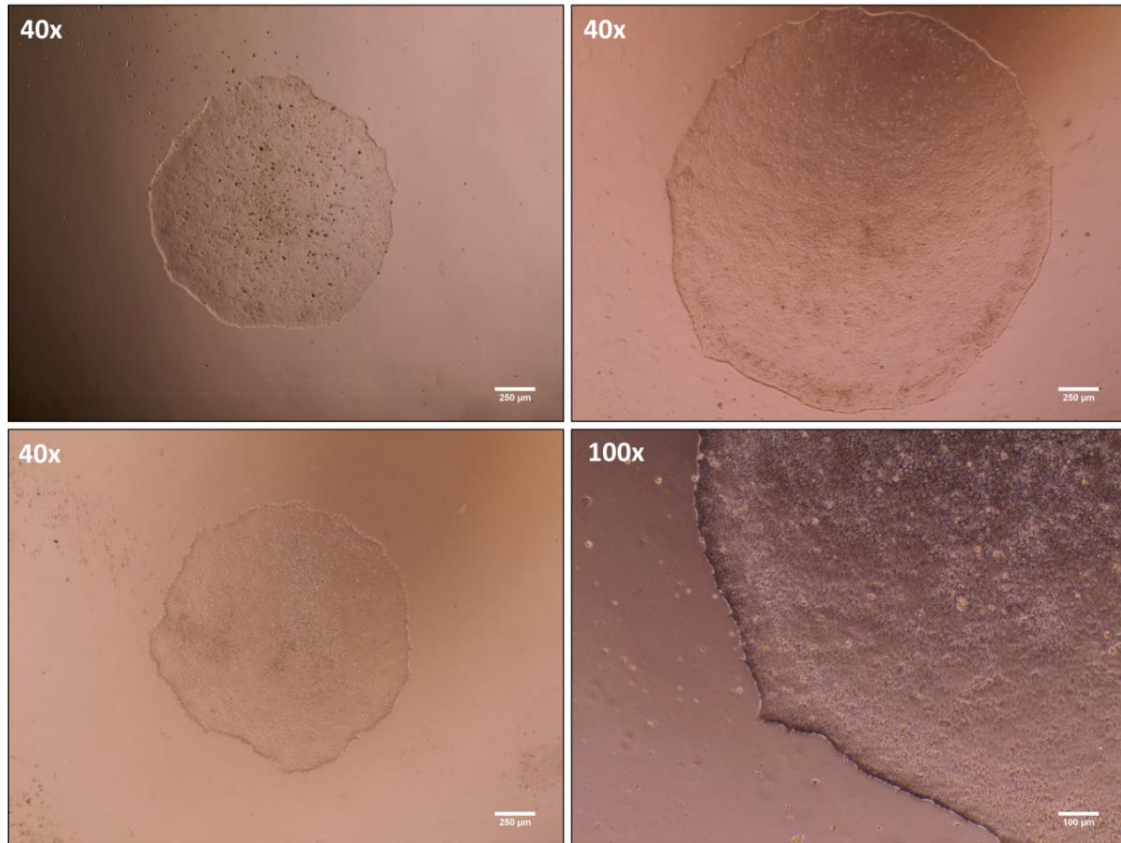


Figura 9: Exemplos de colônias de hiPSCs geradas a partir a reprogramação de eritroblastos (passagem 0).

4.3 Caracterização das hiPSCs

Cada paciente reprogramado teve três clones caracterizados quanto a expressão de marcadores de pluripotência. A seguir, estão os resultados de caracterização para os clones utilizados na produção de cardiomiócitos, sendo Ind4.5, Ind5.6 e Ind6.4 os clones de pacientes indeterminados e CC4.3, CC5.1 e CC6.6 os de pacientes cardiopatas.

4.3.1 Marcadores de pluripotência

A expressão dos genes *REX1*, *KLF4*, *OCT4*, *NANOG*, *LIN28A* e *GAPDH* foi analisada qualitativamente pelo método de RT-PCR, e o resultado da amplificação foi revelado em gel de agarose 2%. Todos os marcadores se apresentaram positivos nos clones caracterizados, ainda que para o marcador *KLF4* os clones indeterminados tenham apresentado expressão diminuída em relação aos clones cardiopatas (Figura 10).

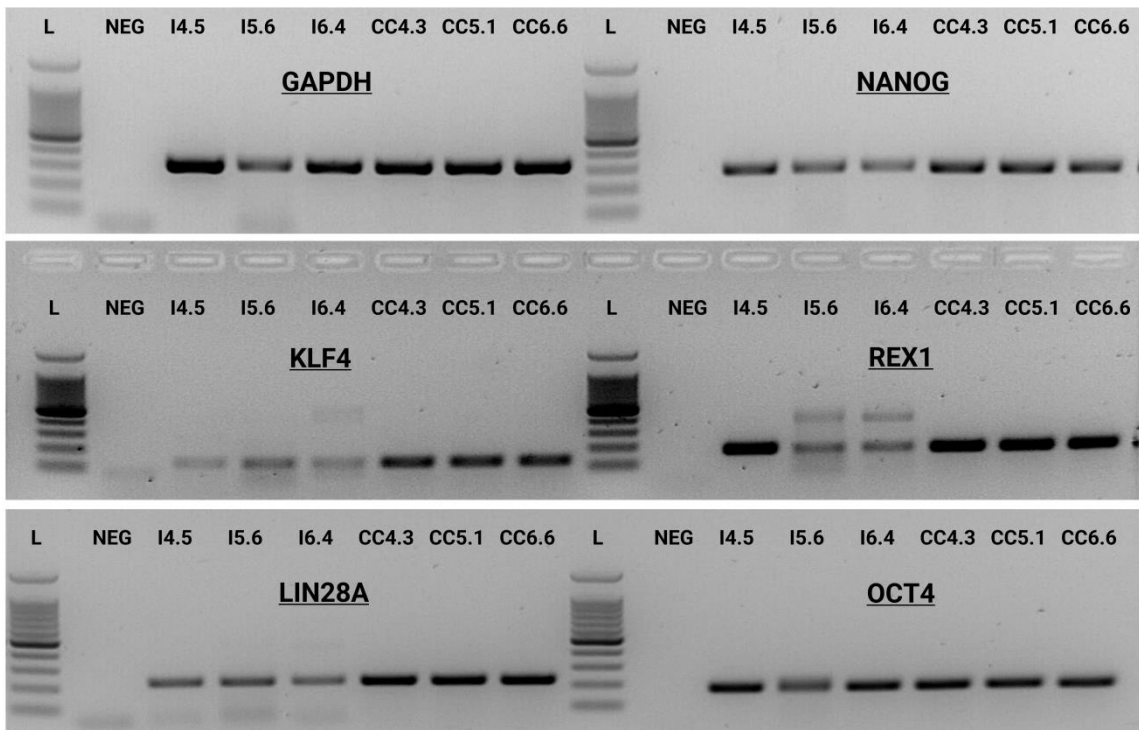


Figura 10: Análise de expressão dos marcadores de pluripotência (eletroforese em gel de agarose 2%). L: Ladder 100pb. Neg: controle negativo

4.3.2 Citometria de Fluxo

A análise de expressão por citometria de fluxo foi feita para os marcadores de membrana TRA-1-60 e TRA-1-81, e para os marcadores nucleares Nanog e Oct-4, nos clones Ind4.5, Ind5.6, Ind 6.4, CC 4.3, CC5.1 e CC6.6 (Figura 11). A presença de eventos no quadrante superior direito indica dupla marcação para Oct-4 / TRA-1-60 ou NANOG / TRA-1-81.

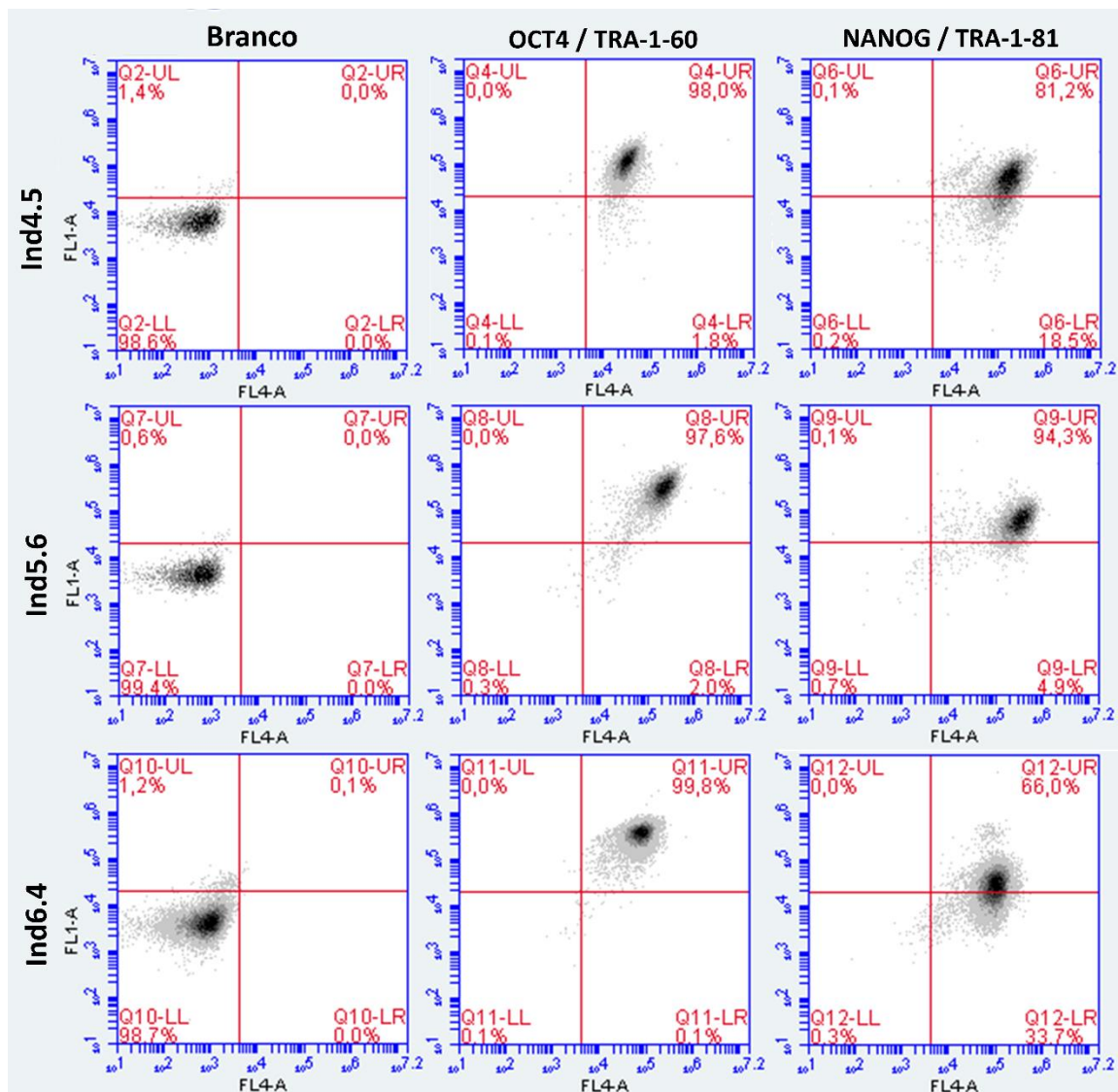


Figura 11: Análise de expressão dos marcadores de pluripotência Nanog, Oct-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 por citometria de fluxo. Eixo FL-1: TRA-1-60 ou TRA-1-81. Eixo FL-4: Nanog ou Oct-4. O posicionamento da população de células no quadrante superior direito indica dupla marcação (continua).

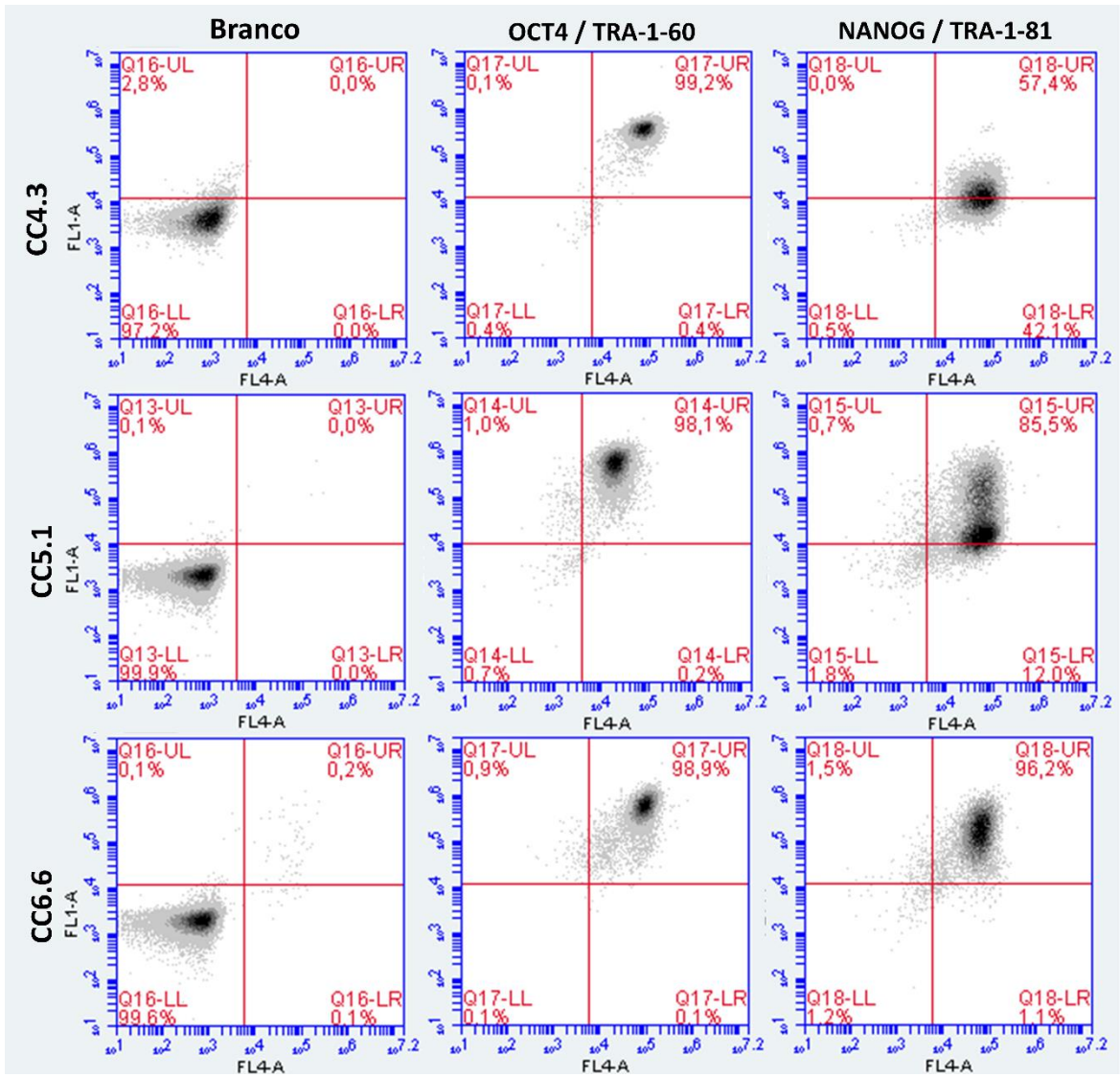


Figura 10: (Cont).

4.3.3 Imunofluorescência

A Figura 12 apresenta as análises de imunofluorescência realizadas para os clones caracterizados. Todos os clones apresentaram expressão positiva e devidamente localizada para os marcadores Nanog, Sox2, TRA-1-60 e TRA-1-81.

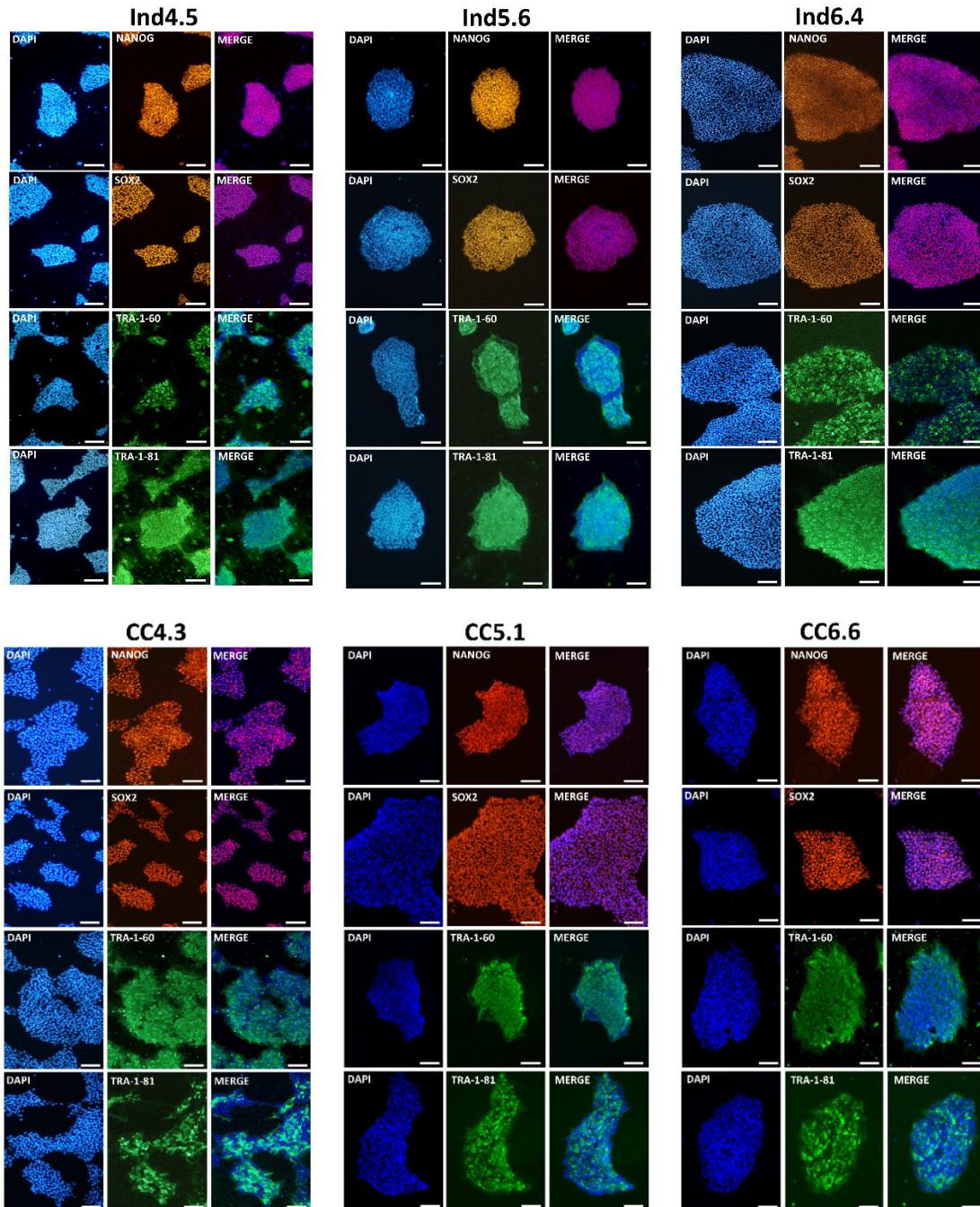


Figura 12: Análise de expressão dos marcadores Nanog, Sox2, TRA-1-60 e TRA-1-81 por imunofluorescência nos clones dos pacientes Indeterminados e Cardiopatas.

4.3.4 Exame de cariótipo

O exame de cariótipo foi realizado pela técnica de bandeamento G, por um laboratório especializado (Figura 13). Entre 20 e 25 metáfases foram analisadas por clone. Todos os cariótipos se apresentaram normais, sem aneuploidias ou grandes deleções ou translocações.

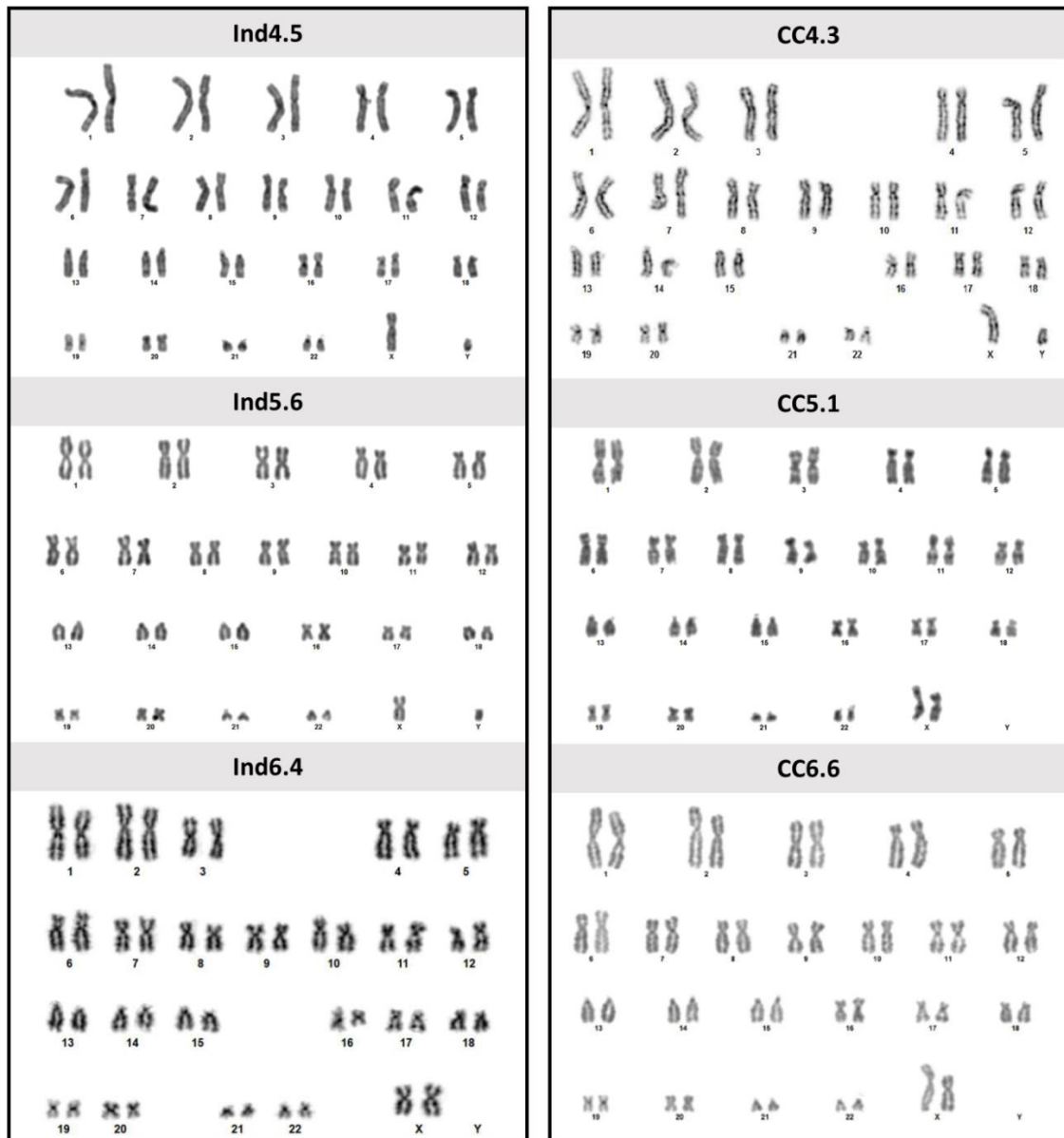


Figura 13: Exames de cariótipo realizados por bandeamento G dos clones selecionados para diferenciação.

4.4 Infecção de células mononucleares sanguíneas

Os experimentos de infecção de PBMCs foram analisados tomando como base as seguintes variáveis: porcentagem de eventos GFP+ ao longo do tempo (para medida de infecção parasitária), intensidade média do GFP ao longo do tempo (para medida de replicação parasitária) e razão da intensidade GFP 48/24 hpi (para aferição do aumento da intensidade do GFP entre 24 e 48 hpi). Inicialmente, para nos certificarmos que a quantidade de células analisadas entre os grupos não diferia ao longo do tempo e nem por tipo celular, comparamos a quantidade de células analisadas entre os grupos e não observamos diferença estatística significativa. Foi possível observar, porém, que monócitos e linfócitos B tendem a cair ao longo do tempo, enquanto linfócitos T se mantêm constantes (Figura 14).

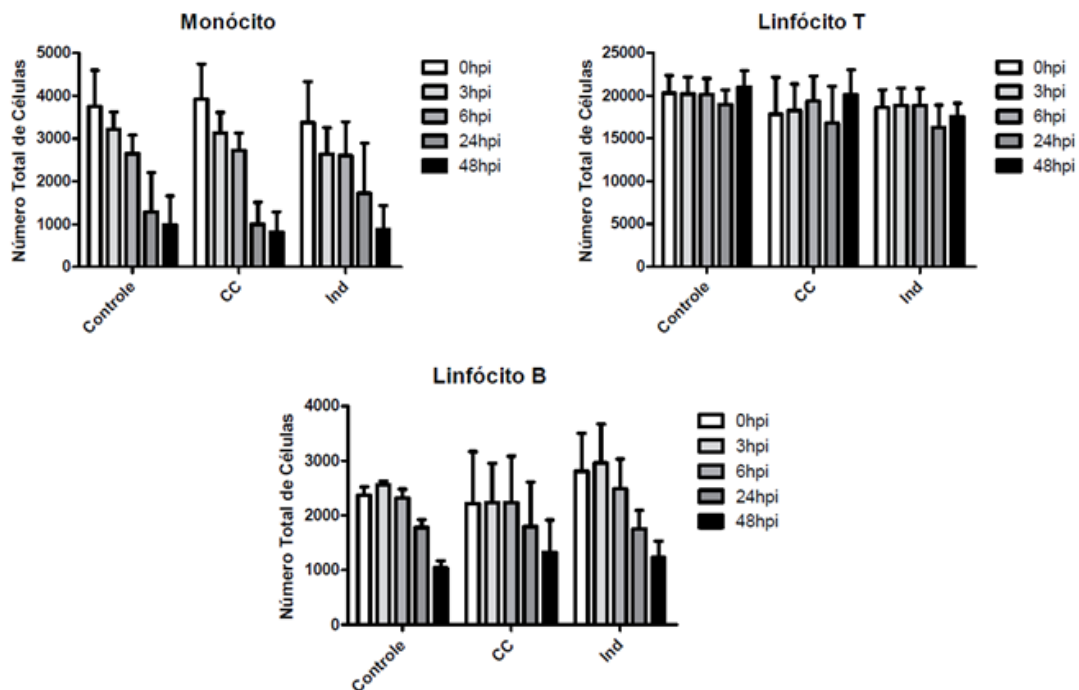


Figura 14: Número total de células analisadas por citometria de fluxo os grupos CC, Indeterminado e Controle, ao longo dos tempos de infecção (N = 5). Não foi observada diferença na distribuição dos tipos celulares entre os grupos. Para todos os grupos analisados foi observado diminuição de monócitos e linfócitos B em cultura com o passar do tempo.

Assim, seguindo com a análise, foi possível observar que os monócitos são o tipo celular com maior porcentagem de eventos GFP+ ao longo do tempo (Figura 15), atingindo, em determinados momentos, uma taxa de infecção acima de 50%, ao passo que linfócitos T e B mantêm uma taxa de infecção mais baixa e constante. Porém, ao compararmos a quantidade de eventos GFP+ entre os grupos, para cada tipo celular analisado, não foi possível identificar diferença significativa em nenhum dos quatro tempos de infecção.

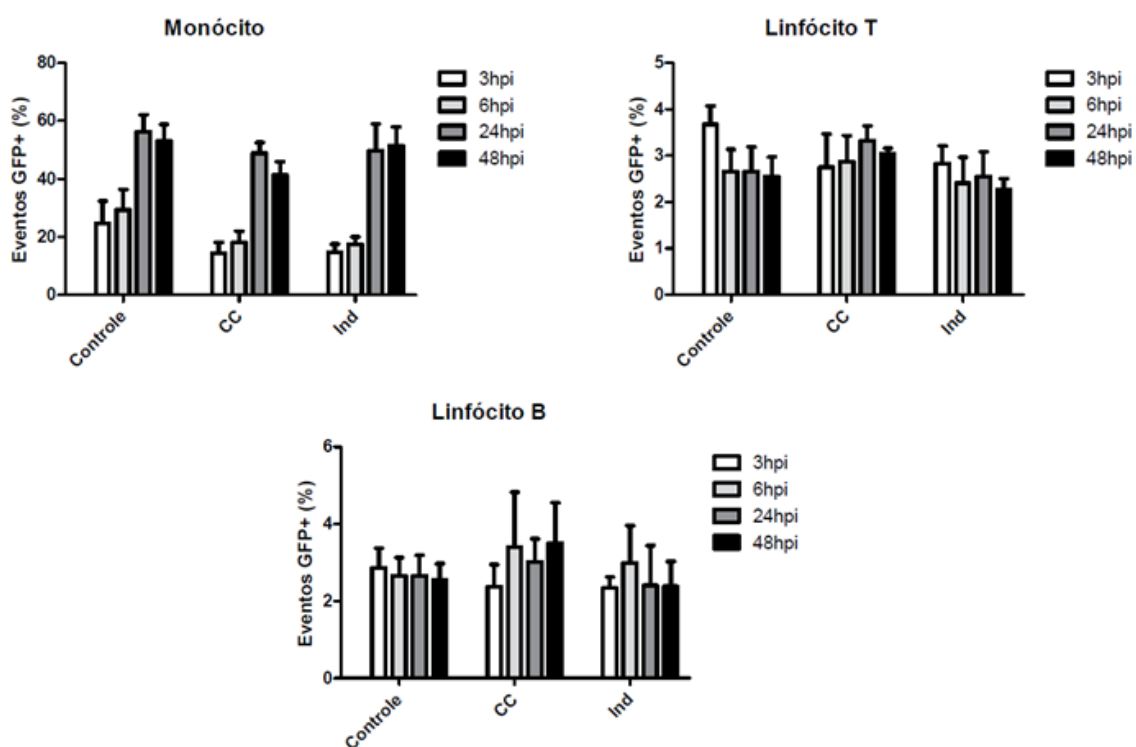


Figura 15: Eventos GFP+ ao longo dos tempos de infecção, nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).

Ao compararmos a intensidade média do GFP entre os grupos, para cada tipo celular, é possível novamente observar que os monócitos são o tipo celular com maior aumento de intensidade ao longo do tempo (Figura 16), com um aumento da intensidade média de GFP já a partir de 24 hpi. Entretanto, linfócitos T apresentam uma tendência de aumento a partir de 48 hpi, o que

indica um aumento mais tardio da replicação parasitária em relação aos monócitos. Novamente, ao compararmos a intensidade GFP entre os grupos, para cada tipo celular analisado, não foi possível identificar diferença significativa em nenhum dos quatro tempos de infecção.

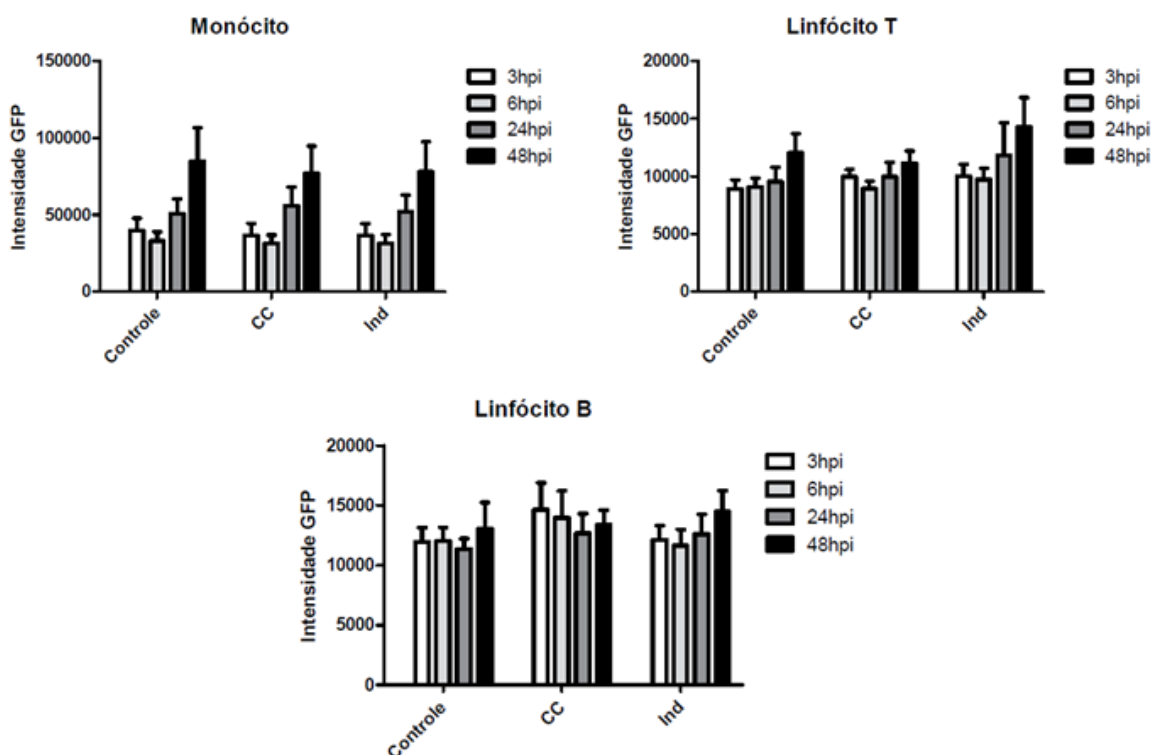


Figura 16: Intensidade média de GFP ao longo dos tempos de infecção, nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).

No que diz respeito à razão de intensidade GFP 48/24 hpi, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos, para nenhum dos tipos celulares analisados (Figura 17). Porém, ao compararmos a diferença dessa mesma variável levando em consideração apenas o tipo celular, observamos que os monócitos apresentam um valor de razão de intensidade GFP 48/24 hpi significativamente diferente em relação à linfócitos T e B (Figura 18).

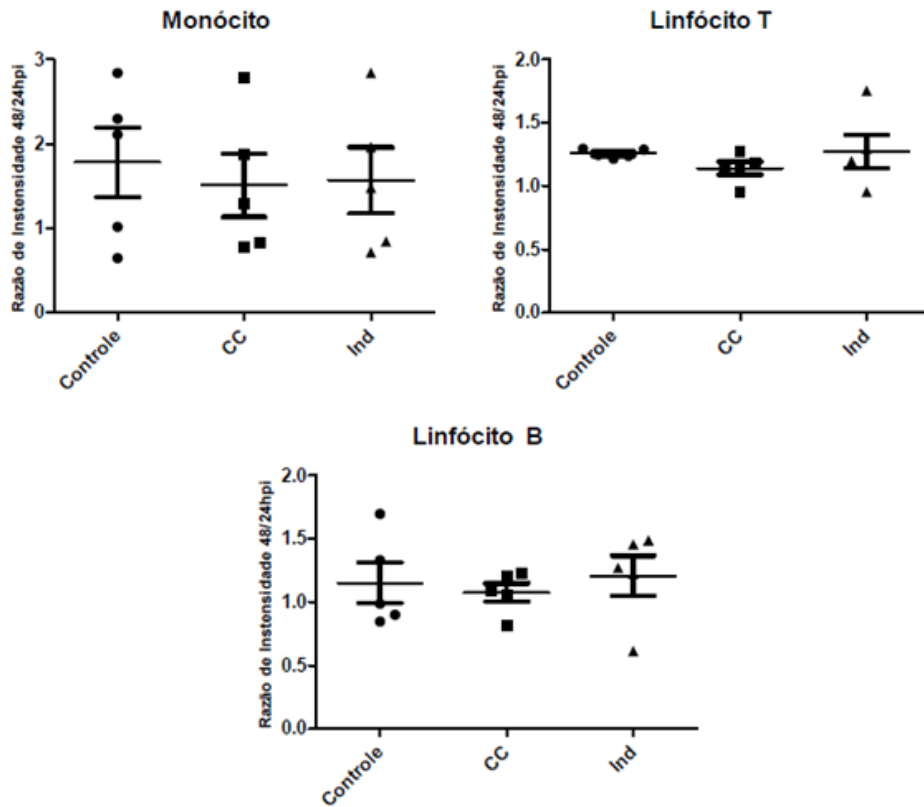


Figura 17: Razão de intensidade GFP 48/24hpi nos grupos CC, Indeterminado e Controle, separados por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; N = 5).

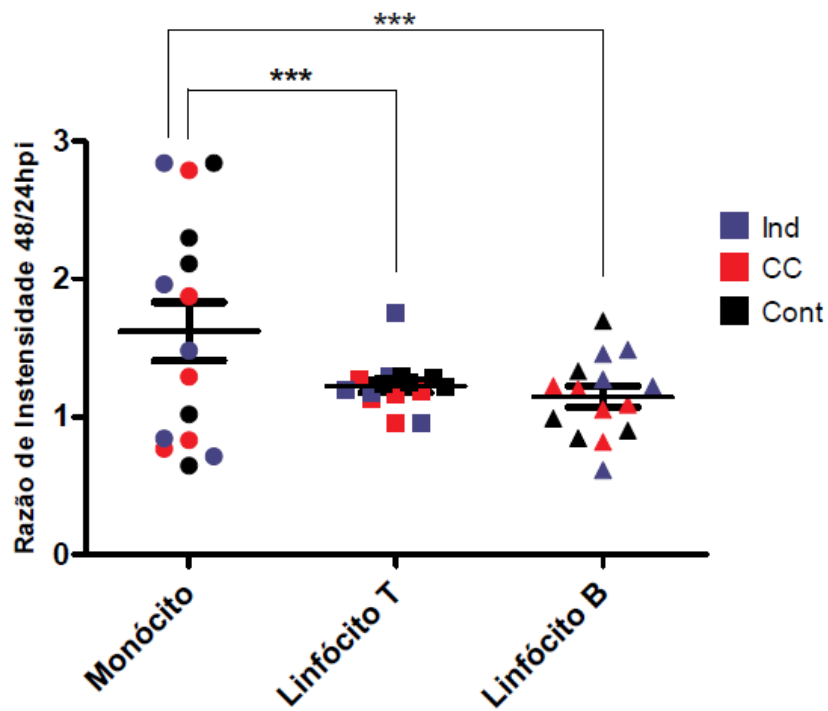


Figura 18: Razão de intensidade GFP 48/24 hpi por tipo celular (Monócito, Linfócito T e Linfócito B; Teste t de Student: Monócito vs. Linfócito T – p-valor<0,0001; Monócito vs Linfócito B – p-valor = 0,0003 - N = 5).

4.5 Produção de hiPSC-CM

Os cardiomiócitos utilizados nos experimentos de RNA-seq e imunofluorescência (CC5.1, CC4.3, CC6.6, Ind4.5 e Ind6.4) foram quantificados quanto a sua pureza, através da expressão de troponina cardíaca. A Figura 19 mostra os histogramas de citometria de fluxo contendo as porcentagens de positividade de troponina, e a Tabela 05 mostra os dados de eficiência de diferenciação. O controle positivo consistia em uma população de hiPSC-CM diferenciada através de outro protocolo e previamente quantificada para o mesmo marcador. As populações de cardiomiócitos humanos diferenciadas a partir de hiPSC apresentaram mais de 90% de expressão de troponina cardíaca no D20. No Anexo IV constam links para visualização da contração dos cardiomiócitos em D20.

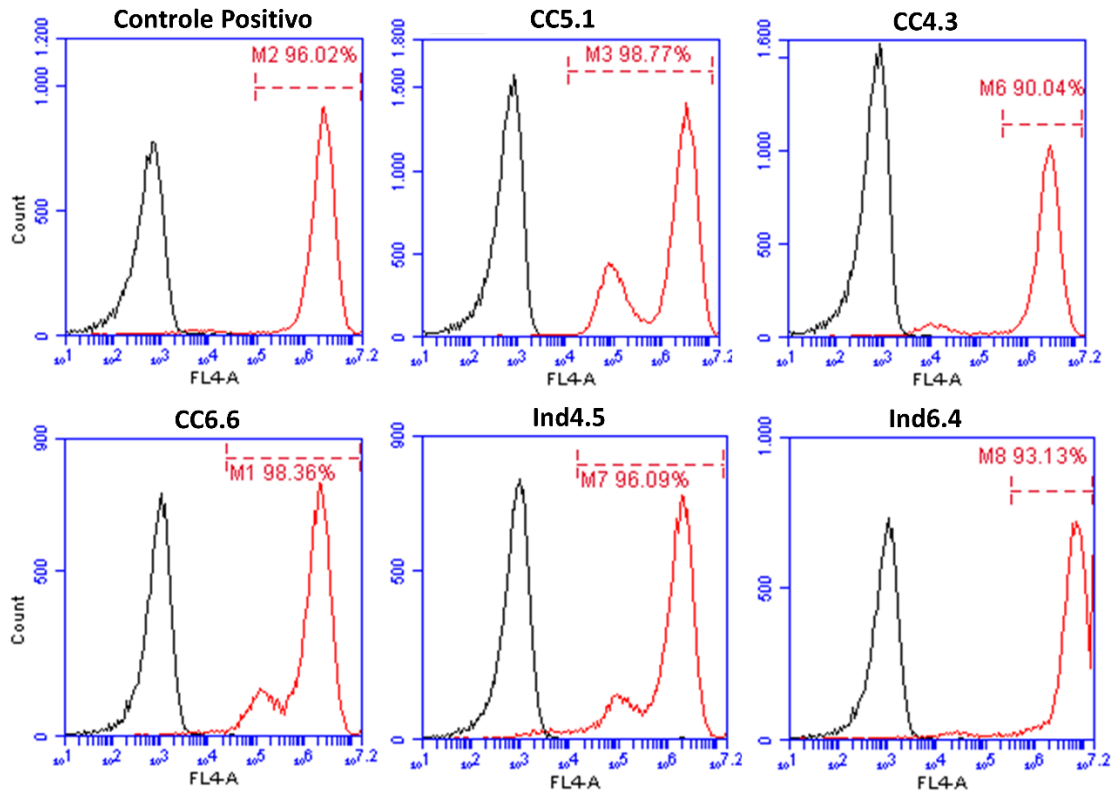


Figura 19: Caracterização dos hiPSC-CM diferenciados e utilizados nos experimentos posteriores. Linhas pretas identificam os controles brancos (não marcados) e as linhas vermelhas as amostras incubadas com anticorpo anti-troponina I cardíaca.

Tabela 5: Eficiência de diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos com o protocolo baseado em RPMI B27 e WNT-C59

Clone	N Poços	Rendimento Total	Eficiência/poço	Batimento
CC4.3	06	$4,1 \times 10^6$	$0,68 \times 10^6$	D9
CC5.1	06	$7,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	D9
CC6.6	06	5×10^6	$0,83 \times 10^6$	D10
Ind4.5	06	$5,75 \times 10^6$	$0,95 \times 10^6$	D10
Ind6.4	06	$4,32 \times 10^6$	$0,72 \times 10^6$	D9

4.6 Quantificação da infecção em hiPSC-CM

A quantificação da infecção e proliferação parasitária em hiPSC-CM de pacientes indeterminados e cardiopatas se deu a partir da contagem de parasitas/núcleo. A Figura 20 ilustra a forma como os amastigotas GFP+ eram detectados (painel A) e a quantificação dos parasitas ao longo do tempo nos dois grupos (painel B). Não houve diferença estatística significativa quanto a infecção ou a proliferação parasitária quando comparados os dois grupos.

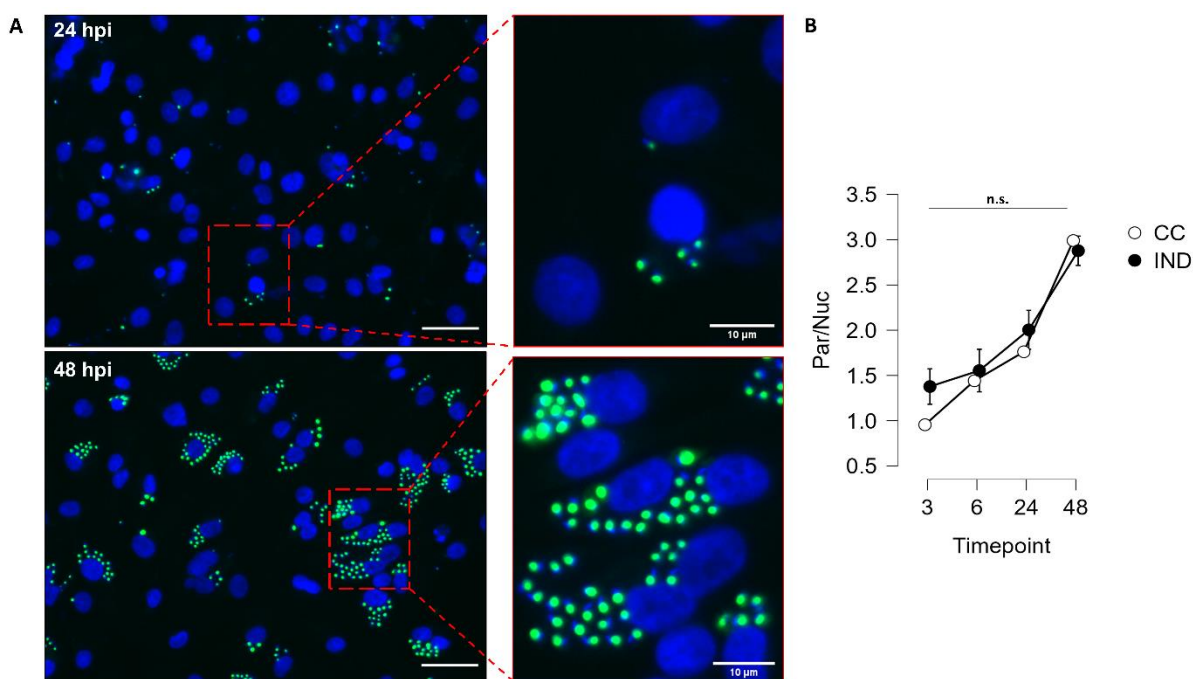


Figura 20: A) Imagens ilustrativas da detecção de amastigotas intracelulares GFP+ (verde) em 24 e 48 hpi. Núcleos foram corados com DAPI (em azul). B) Análise das taxas de infecção e proliferação parasitária ao longo do tempo nos grupos Indeterminado e Cardiopata (sem significância estatística).

4.7 Resultados de RNA-seq

Um total de 20 replicatas (6 CC_0hpi, 6 CC_24hpi, 4 IND_0hpi e 4 IND_24hpi) foram sequenciados em uma única corrida. No total, foram gerados 577 milhões de *reads* com uma média de 28,8 milhões de *reads* por amostra. As leituras foram verificadas quanto à qualidade e remoção de sequências de adaptador com o programa FASTQC antes do alinhamento e geração das contagens por gene. Todas as amostras passaram nas etapas de controle de qualidade e foram usadas nas análises posteriores. As distribuições de contagem por amostra são mostradas na Figura 21, painel A. A análise de componentes principais (do inglês, *Principal Component Analysis* ou PCA) revelou um padrão de agrupamento relacionado aos clones sobreposto com um padrão de agrupamento relacionado ao hpi. Curiosamente, nenhum efeito de lote de diferenciação foi observado (Figura 21, painel B). O PC1 foi responsável por 50% da variância amostral, indicando que a maior parte da variabilidade entre as amostras pode ser explicada pela variável fenótipo. O *clustering* hierárquico mostra que a maioria dos clones em 0 hpi tende a se agrupar lado-a-lado com seu respectivo em 24 hpi (Figura 21, painel C).

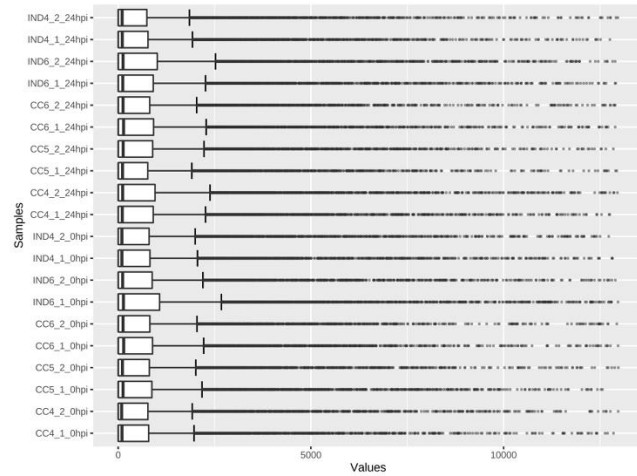
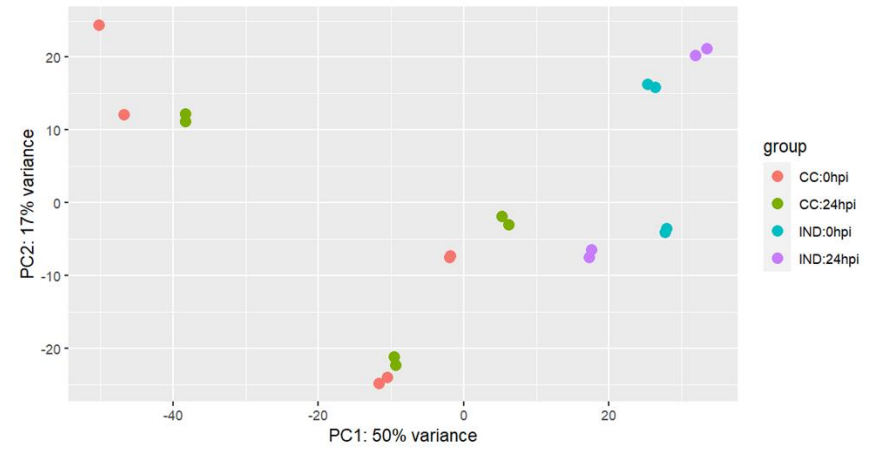
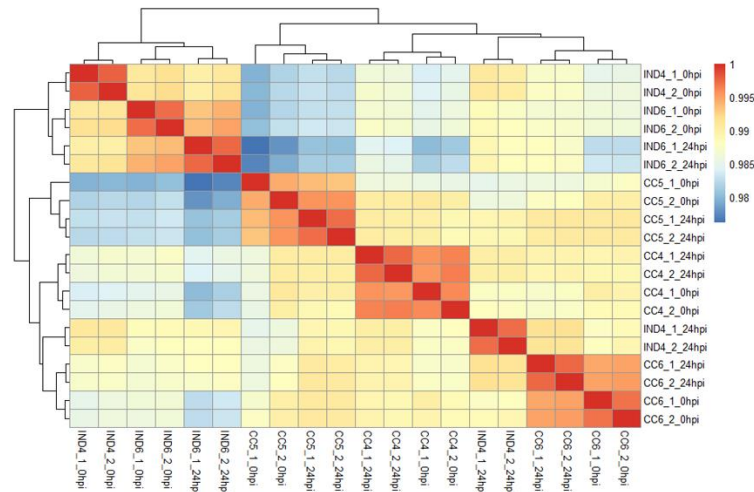
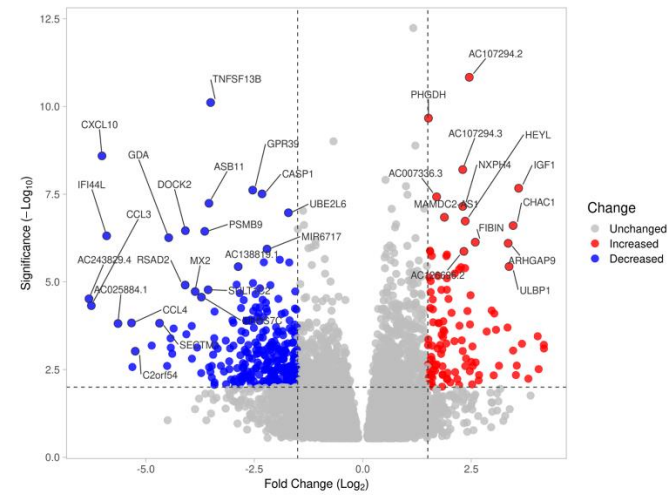
A**B****C****D**

Figura 21: A) Distribuição das contagens em cada replicata B) Gráfico de PCA mostrando a variância entre as replicatas da CC e Ind em 0 e 24 hpi C) Clustering hierárquico das replicatas D) Gráfico do tipo “Volcano” mostrando a distribuição do Log₂FoldChange dos genes diferentemente expressos no resultado do termo de interação.

4.8 Análise de vias biológicas

4.8.1 Análise de super-representação de vias em 24 hpi

Como mencionado anteriormente, a análise de expressão gênica diferencial envolveu todas as condições experimentais para detectar os genes mais variáveis ao longo do processo de infecção em ambos os grupos fenotípicos. No total, 463 DEGs com um valor de p ajustado (p_{adj}) $< 0,05$ foram selecionados a partir do resultado do termo de interação (tempo:grupo) após a análise de expressão gênica diferencial. Destes, 395 (215 L2FC positivos e 180 L2FC negativos – Figura 21, painel D) tinham um entrezID válido e foram usados para ORA com uma lista de genes *background* contendo 19483 genes. Os DEGs foram anotados contra os termos de GO nas três categorias disponíveis (Figura 22) e contra os termos da coleção Hallmark (coleções MSigDB)³⁷. A Tabela 6 mostra os 20 principais termos do Hallmark enriquecidos com seu valor específico para taxa de falsas descobertas (do inglês, *False Discovery Rate* ou FDR).

As análises de GO retornaram, majoritariamente, termos relacionados à estresse celular e resposta imune (Figura 22), confirmando a capacidade do nosso modelo de perturbar significativamente vias biológicas de importância para a infecção e sobrevivência do *T. cruzi* nas células do hospedeiro. Termos como “*Positive lymphocyte migration*” (migração linfocitária), “*chemokine activity*” (atividade de quimiocinas) e “*chemokine receptor binding*” (ligação em receptores de quimiocinas) indicam a ativação de genes relacionados com o disparo da resposta imune. Ainda, os termos com maior significância estatística

nas análises com Hallmark foram, especificamente, resposta a interferon alfa e gama (Tabela 6).

Tabela 6: Análise de super-representação de vias biológicas utilizando os DEGs retornados no termo de interação. ER: *Enrichment ratio*. FDR: *False Discovery Rate*.

Termo original	ER	p-valor	FDR	Genes
Interferon gamma response*	27/191	3,66E-10	1,83E-08	<i>CASP1; CD38; CMPK2; CXCL10; CXCL11; DDX58; DDX60; GCH1; HERC6; IFI27; IFI35; IFI44; IFI44L; IFIH1; IFIT1; MT2A; MTHFD2; MX2; NAMPT; PSMB9; PSME1; RSAD2; SAMHD1; SECTM1; SLC25A28; TNFSF10; UBE2L6</i>
Interferon alpha response*	16/96	1,93E-07	4,83E-06	<i>CASP1; CMPK2; CXCL10; CXCL11; DDX60; HERC6; IFI27; IFI35; IFI44; IFI44L; IFIH1; PSMB9; PSME1; RSAD2; SLC25A28; UBE2L6</i>
Unfolded protein response*	12/112	5,91E-04	0,00985	<i>ASNS; CEBPG; CHAC1; FKBP14; IARS1; IFIT1; KDELR3; MTHFD2; PSAT1; SLC7A5; TARS1; XPOT</i>
TNF- α signaling via NF- κ B	14/196	0,01004	0,09899	<i>CCL4; CXCL10; CXCL11; DDX58; GCH1; IFIH1; JAG1; KLF4; NAMPT; PMEPA1; PTPRE; TNC; TNFAIP8; TNFRSF9</i>
mTORC1 signaling	14/200	0,01188	0,09899	<i>ASNS; EPRS1; GAPDH; IDH1; MTHFD2; NAMPT; PHGDH; PSAT1; PSPH; RRM2; SHMT2; SLC6A6; SLC7A5; TRIB3</i>
Complement	13/180	0,01188	0,09899	<i>ADRA2B; APOBEC3F; APOBEC3G; CA2; CASP1; DYRK2; FYN; GCA; L3MBTL4; LGALS3; LRP1; PSMB9; SRC</i>
Inflammatory response	12/176	0,02329	0,16633	<i>APLNR; CXCL10; CXCL11; GCH1; MET; NAMPT; PTPRE; SLC1A2; SLC7A1; SLC7A2; TNFRSF9; TNFSF10</i>
Cholesterol homeostasis	6/73	0,04598	0,28739	<i>CBS; GLDC; GPX8; JAG1; LGALS3; TRIB3</i>
EM transition	12/200	0,05423	0,30127	<i>BMP1; CDH11; COL1A2; COL5A1; COL6A2; CXCL12; FBLN2; LRP1; MMP2; PMEPA1; SPARC; TNC</i>
IL2-STAT5 signaling	11/186	0,06933	0,33104	<i>BCL2; CA2; CDCP1; CISH; CXCL10; GUCY1B1; IGF2R; LRRC8C; MAP6; TNFRSF9; TNFSF10</i>
UV response dn	9/144	0,07283	0,33104	<i>CAV1; COL1A2; DLG1; FYN; ID1; KALRN; MAPK14; MET; SLC7A1</i>
Coagulation	8/130	0,09421	0,38161	<i>BMP1; FYN; GDA; LEFTY2; LRP1; MMP2; RGN; SPARC</i>
Notch signaling	3/32	0,10583	0,38161	<i>HEYL; JAG1; MAML2</i>
UV response up	9/156	0,10685	0,38161	<i>ASNS; CA2; CEBPG; GCH1; HLA-F; PPIF; RET; SHOX2; TARS1</i>
Estrogen response late	10/189	0,14020	0,42251	<i>BCL2; CA2; CAV1; CISH; CXCL12; KLF4; PPIF; RET; SLC26A2; SLC7A5</i>
Apical junction	10/192	0,15068	0,42251	<i>ACTN3; BMP1; CDH11; DLG1; MAPK14; MMP2; MYH10; NRTN; PCDH1; SRC</i>
p53 pathway	10/192	0,15068	0,42251	<i>APAF1; CASP1; DGKA; H2AW; KLF4; PLXNB2; PTPRE; TGFA; TRIB3; XPC</i>
Estrogen response early	10/196	0,16526	0,42251	<i>BCL2; CISH; CXCL12; KLF4; PPIF; RET; SLC26A2; SLC7A2; SLC7A5; THSD4</i>
Hypoxia	10/197	0,16901	0,42251	<i>ATP7A; BCL2; CAV1; CHST3; COL5A1; GAPDH; HDLBP; KDELR3; MT2A; SLC6A6</i>
Myogenesis	10/197	0,16901	0,42251	<i>ACTN3; APLNR; COL15A1; COL6A2; EPHB3; IGF1; MB; PLXNB2; SPARC; SPDEF</i>

*enriquecimentos significativos

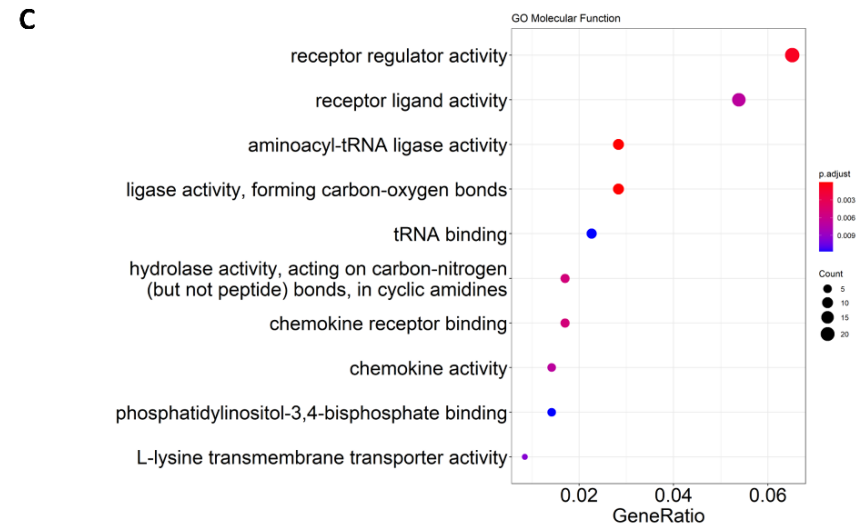
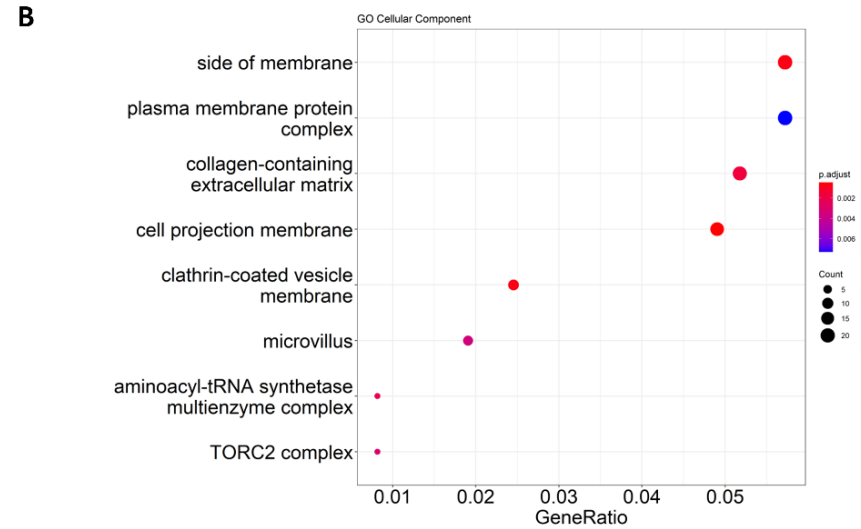
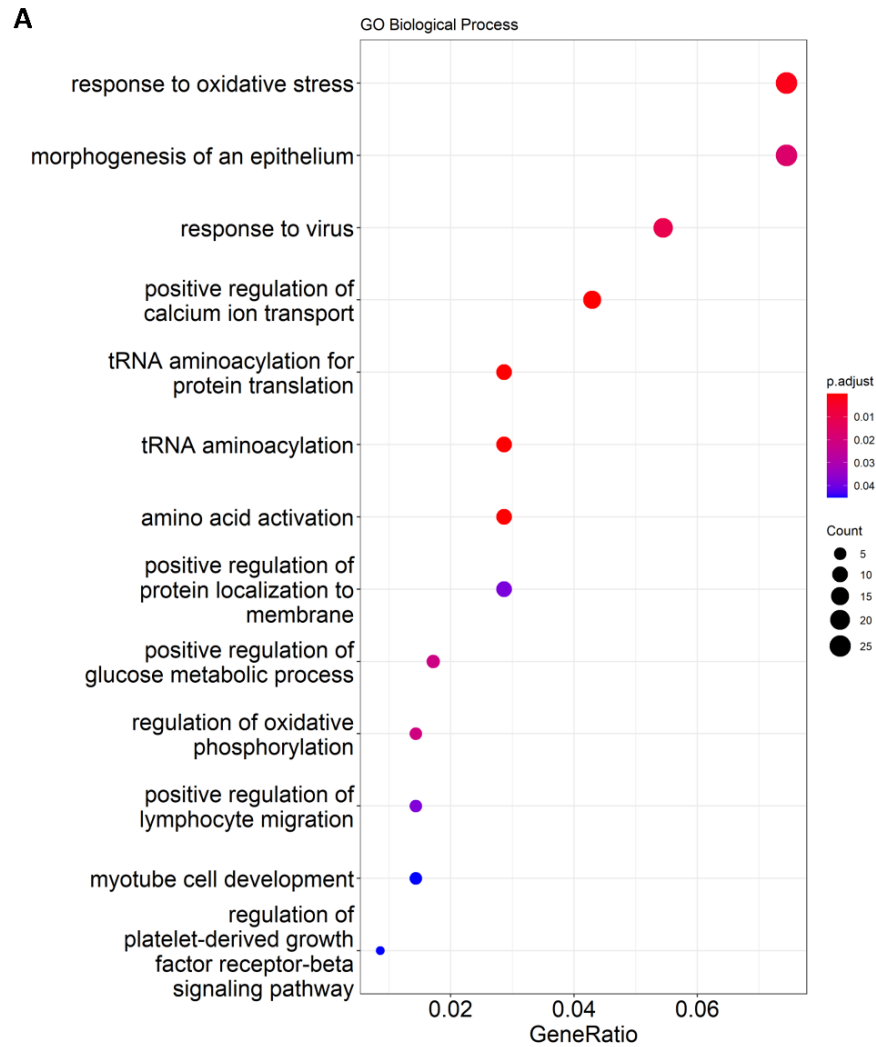


Figura 22: Análise de super-representação de vias com os termos do GO para (A) Processos Biológicos, (B) Componente Celular e (C) Função Molecular.

Sinais de estresses celular foram detectados a partir dos termos “*oxidative stress response*” (resposta ao estresse oxidativo) e “*Unfolded Protein Response*” (resposta a proteínas mal dobradas), este último indicando a ocorrência de estresse de retículo endoplasmático.

Termos representando os processos de adesão e internalização dos tripomastigotas apareceram nas três categorias da análise com GO. Termos como “*cell projection membrane*” (projeção de membrana celular), “*microvillus*” (microvilosidades), “*clathrin-coated vesicle membrane*” (vesícula de membrana revestida por clatrina) e “*positive regulation of calcium ion transport*” (regulação positiva de transporte de cálcio) refletem a entrada do *T. cruzi* através da membrana plasmática, tanto por fagocitose como por endocitose mediada pela ativação de receptores e vesículas revestidas por clatrin. Sinalização de PIP3, ativação do complexo mTORC e mobilização de cálcio, todos envolvidos no processo de formação de vacúolos, também foram apontados com enriquecidos nas análises de GO. O aumento na atividade transcricional da célula está principalmente representado pelos termos relacionado a ativação de aminoácidos, aminoacilação e ligação de RNAs transportadores.

Curiosamente, genes relacionados a morfogênese tecidual e produção de MEC foram identificados tanto nas análises de GO como Hallmark. O termo “*EM transition*” (transição epitélio-mesenquimal), ainda que não significativo, agrupava genes como caderina-11 (*CDH11*), metaloproteinase-2 (*MMP2*) e genes codificadores de colágeno (*COL1A2*, *COL5A1* e *COL6A2*). A análise de ORA com GO retornou termos como “*collagen-containing cellular matrix*” (MEC contendo colágeno) e “*morphogenesis of an epithelium*” (morfogênese epitelial)

também contendo genes produtores de colágeno. Finalmente, alterações na expressão de genes que controlam o estado metabólico dos hiPSC-CM após a invasão do *T. cruzi* foram detectados nas análises de ORA, sendo representados por termos envolvendo a absorção de glicose e a regulação de fosforilação oxidativa nos termos de Processos Biológicos do GO.

4.8.2 Respostas grupo-específicas à infecção

A GSEA, descrita na seção Materiais e Métodos, foi realizada com a intenção de identificar quais das vias biológicas estavam especificamente relacionadas a um determinado grupo. Inicialmente, a mesma lista de genes utilizada na ORA foi aplicada para GSEA, contra termos da coleção Hallmark, porém nenhuma via se mostrou significativamente associada a nenhum dos grupos. Dessa forma, um ajuste no valor de p_{adj} foi feito na lista de DEGs, agora utilizando um corte de $p_{adj} < 0,1$, incrementando a lista para 719 genes com identificador entrez válido.

A GSEA com a coleção Hallmark revelou três termos associados ao grupo CC: “*Epithelial-mesenchymal transition*” (EMT), “*mTORC1 signaling*” e “*Unfolded Protein Response*” (UPR). Dois termos foram associados ao grupo Ind: “*Interferon alpha response*” e “*Interferon gamma response*”. A Figura 23 mostra os gráficos de GSEA para os termos significativos em cada grupo, com seus respectivos valores de FDR (painéis A e C), bem como gráficos de conexão entre os genes listados dentro de cada termo (painel B). O Anexo V traz a tabela completa de associações incluindo termos não significativos. No total, 28 genes com L2FC negativo (Ind) e 30 genes com L2FC positivo (CC) foram associados a algum termo.

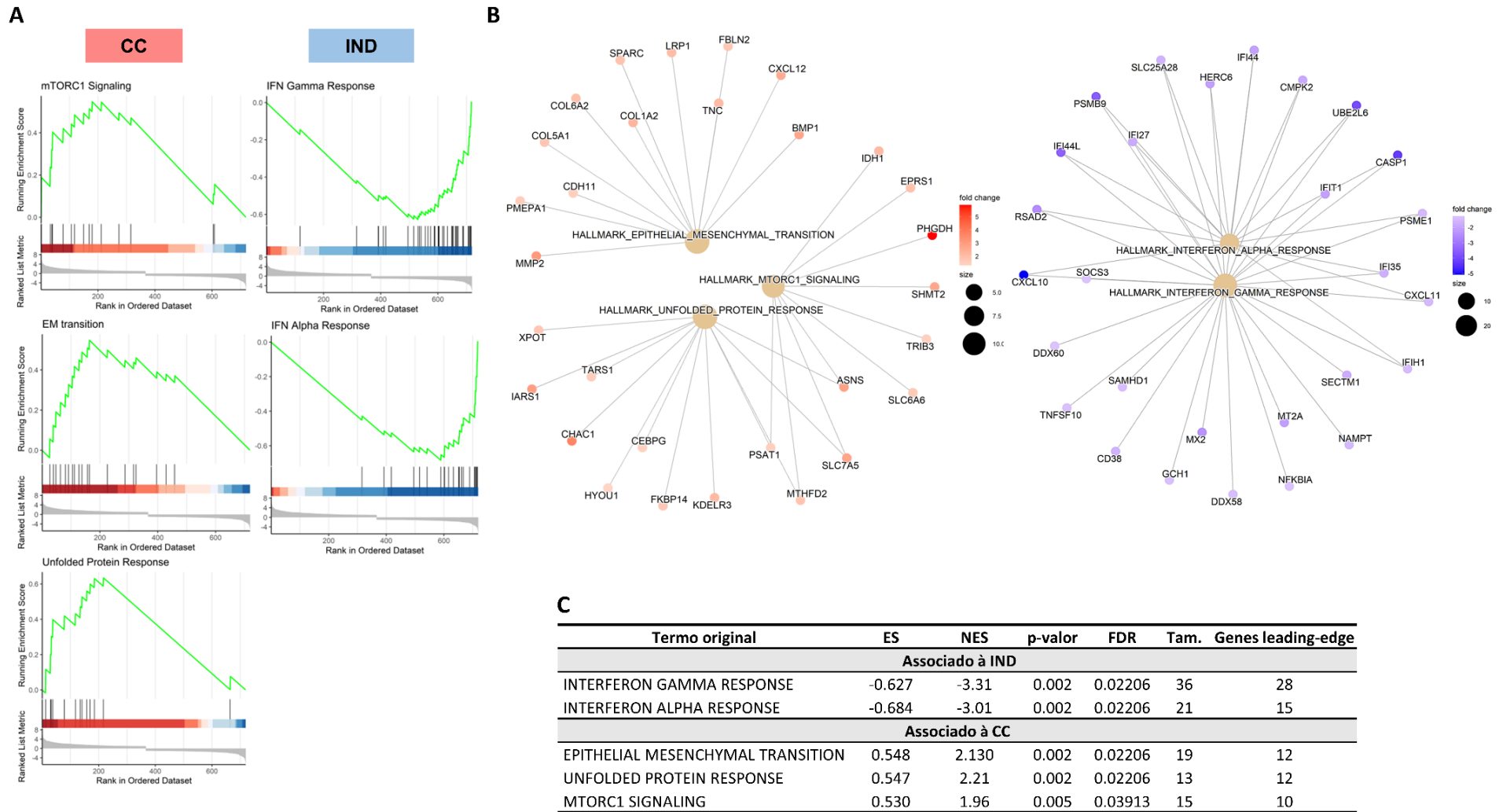


Figura 23: (A) Gráficos de GSEA mostrando a distribuição dos DEGs ranqueados e associação dos termos do Hallmark com cada grupo (barras vermelhas – CC; barras azuis – Ind). (B) Gráficos de conexão dos DEGs associados a cada termo, coloridos pelos valores de Log2FoldChange. (C) Termos da coleção Hallmark associados com cada fenótipo. ES: *Enrichment score*; NES: *Enrichment score* normalizado; FDR: False Discovery Rate ou taxa de falsas descobertas.

A Figura 24 mostra a expressão dos genes dentro dos termos do Hallmark enriquecidos, ao longo do tempo de infecção. A resposta ao IFN é uma resposta inicial à infecção por *T. cruzi* e, embora ambos os grupos tenham regulado positivamente os genes de resposta ao IFN, o efeito da infecção resultou em uma regulação mais aguda na expressão desses genes no grupo Ind. Por outro lado, todos os termos positivamente enriquecidos em CC sofreram uma regulação negativa significativa nos cardiomiócitos do grupo Ind após a infecção. A UPR e a sinalização de mTORC1 foram reguladas positivamente no grupo CC como resposta à infecção, enquanto EMT permaneceu estável de 0 a 24 hpi.

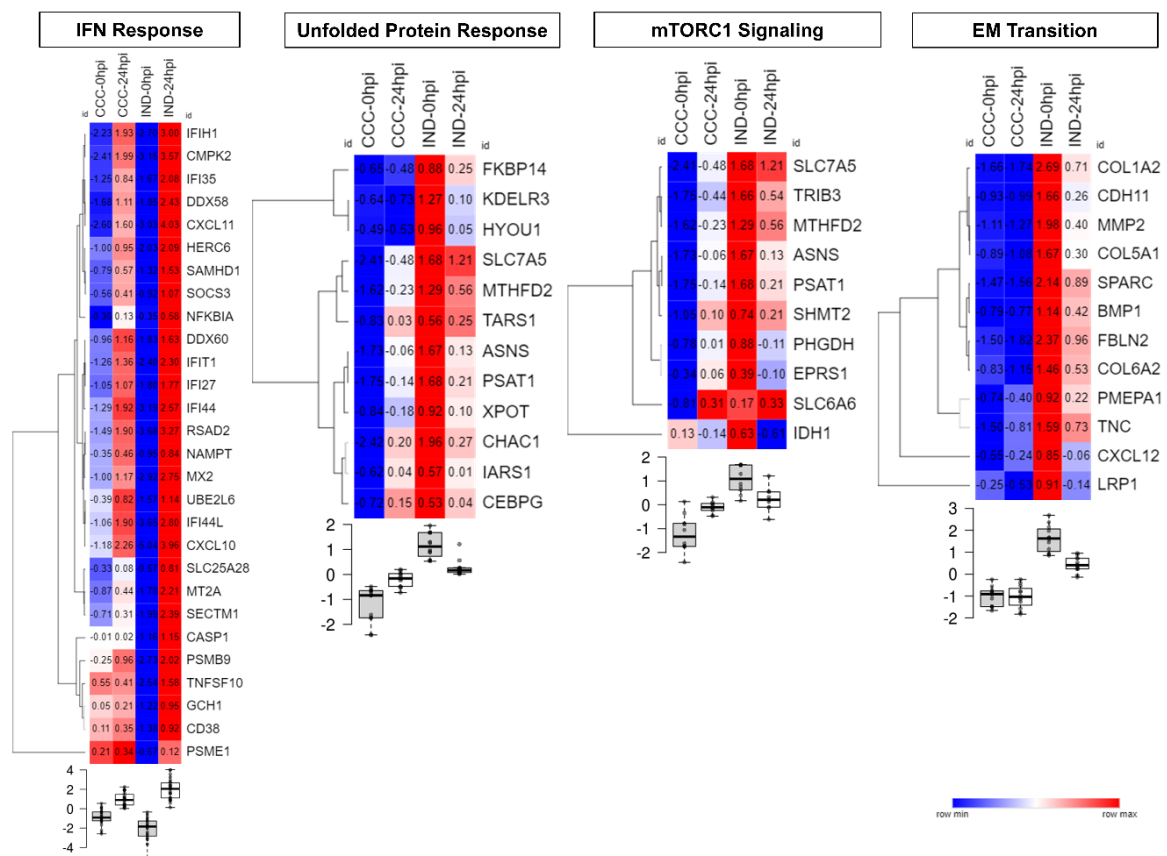


Figura 24: Heatmaps mostrando a expressão normalizada dos DEGs significativos dentro de cada termo do Hallmark, entre as condições 0 e 24 hpi.

A lista original de DEGs extraídos do termo de interação ($p_{adj} < 0,05$) foi também submetida a GSEA com os termos do banco de dados Reactome com o intuito de especificar em mais detalhes as vias biológicas pelas quais os genes enriquecidos estavam agindo. Utilizando os mesmos parâmetros de tamanho mínimo e máximo para os termos e quantidade de permutas, foi possível perceber que o padrão de associação reproduziu o resultado de GSEA com Hallmark, com termos de resposta imune relacionadas com o grupo Ind e termos relacionados a produção de colágeno associados a CC. Houve um incremento de 12 e 9 genes atribuídos a alguma via para Ind e CC, respectivamente.

Os resultados com Reactome especificaram não apenas a associação de vias relacionadas ao IFN com o fenótipo Ind, mas também retornaram outros processos importantes de recrutamento de células imunes e estabelecimento de resposta imune adaptativa, como processamento de antígenos (*“Ubiquitination and proteasome degradation”*) e apresentação de MHC de classe I (*“Class I MHC mediated antigen processing and presentation”*). A Figura 25 mostra as vias identificadas pelo Reactome com seus respectivos *scores* de enriquecimento normalizados (NES) (painel A) e o gráfico de conexão dos genes com maior associação (*“leading-edge genes”*) (painel B).

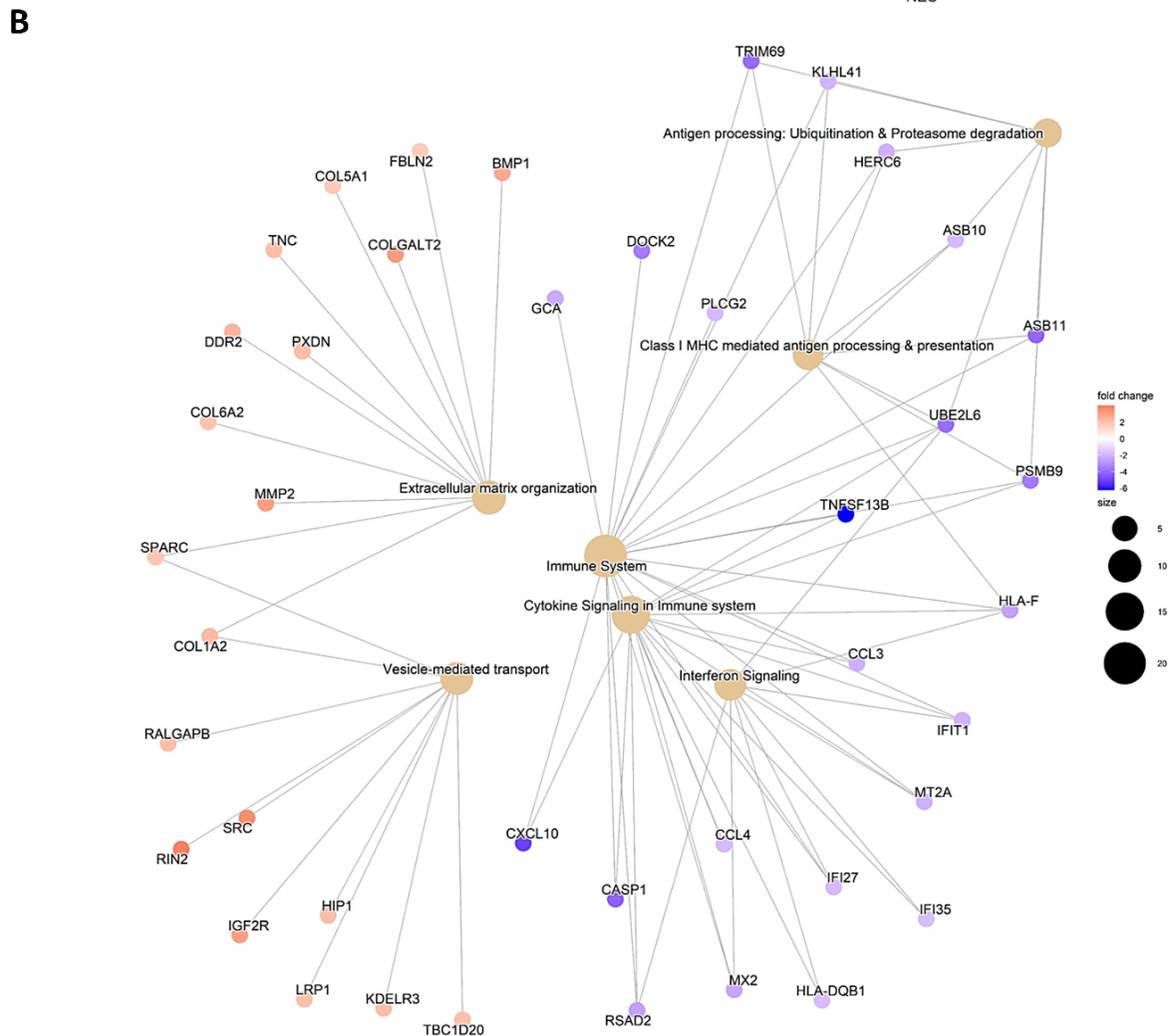
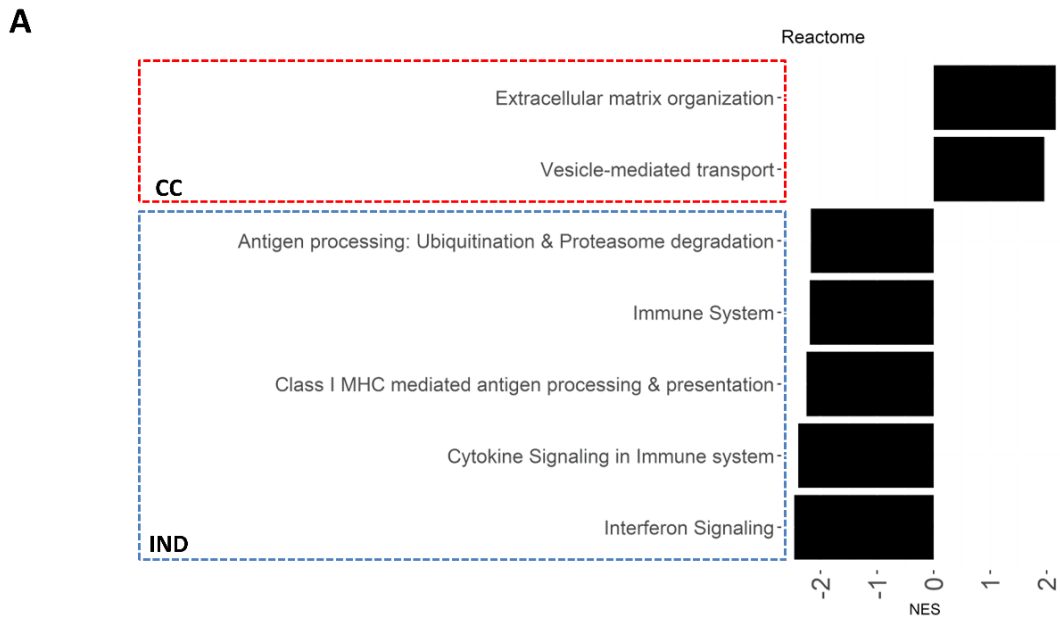


Figura 25: (A) Gráfico de barras mostrando os termos enriquecidos pela GSEA com Reactome. (B) Gráficos de conexão dos DEGs associados a termo do Reactome e seus respectivos valores de L2FC (pontos vermelhos – CC; pontos azuis – Ind).

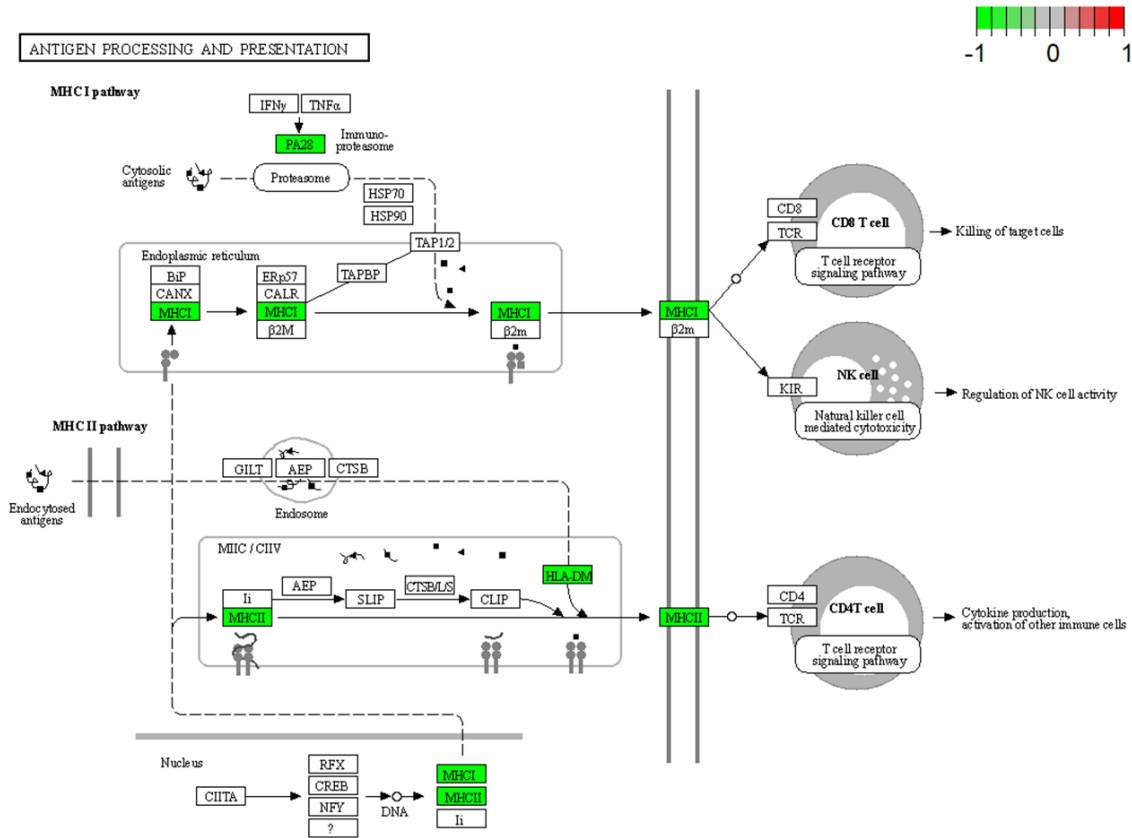
A UPR é principalmente ativada pelo estresse de retículo endoplasmático³⁸. Dentro do termo UPR havia genes relacionados ao aumento da tradução proteica (*TARS1*, *IARS1* e *ASNS*) bem como relacionados a apoptose mediada por estresse de retículo (*CHAC1* e *CEBPG*). Genes de produção de colágeno (*COL1A2*, *COL6A2*, *COL5A1* e *COLGALT2*) e relacionados à composição estrutural da MEC (*TNC*, *FBLN2*, *BMP1* e *MMP2*) estão relacionados tanto no termo “*EM transition*” (Hallmark) como “*Extracellular-matrix organization*” (Reactome). Os termos “*Vesicle-mediated transport*” (transporte mediado por vesículas) e “*Extracellular-matrix organization*” (organização de MEC) estavam conectados pelos genes *SPARC* e *COL1A2* (Figura 25, painel A) provavelmente indicando a mobilização de vesículas tanto na exportação de componentes de matriz quanto na entrada do *T. cruzi* mediada por vesículas. Concordantemente, a regulação positiva dos genes de sinalização mTORC1 pode também contribuir para esses fenômenos, uma vez que esses genes estão envolvidos na formação do vacúolo parasitóforo, uma estrutura crucial na internalização e proliferação do parasita³⁹.

Entre os DEGs associados ao grupo Ind havia dois genes codificantes de moléculas do sistema HLA: *HLA-F* (classe I) e *HLA-DBQ1* (classe II). Além disso, a molécula CD38, envolvida na ligação e ativação de células T também apresentou associação significativa a esse grupo. Nenhum gene codificante para HLA se mostrou associado ao grupo CC. Curiosamente, a expressão de moléculas HLA de classe II, as quais são preferencialmente expressas por células apresentadoras de antígeno profissionais (pAPCs), foi detectada anteriormente em cardiomiócitos derivados de pSC após indução de IFN- γ ⁴⁰.

Visto isso, decidimos verificar a expressão dos principais genes codificadores de HLA I e II e das principais moléculas co-estimulatórias em todas as condições (Figura 26, painel B). De todos os genes relacionados ao sistema HLA com expressão mensurável em nossos dados, todas as moléculas clássicas de HLA classe I estavam reguladas positivamente em cardiomiócitos do grupo Ind em 24 hpi, enquanto ambos os grupos apresentaram regulação positiva de genes HLA classe II, embora nenhum gene dessa categoria tenha sido regulado positivamente ao mesmo tempo nos dois grupos.

Junto com CD38, os genes codificantes das moléculas CD274 (PD-L1) e CD40 também apresentaram maior expressão no grupo Ind após a infecção, embora não tenha sido observada significância estatística. O gráfico da enciclopédia KEGG ilustrando as vias de processamento e apresentação antigênica (Figura 26, painel A) mostra que tanto a via de processamento de MHC de classe I como a de MHC de classe II estão exclusivamente associadas aos DEGs do grupo Ind (L2FC negativo). Ainda, os genes *CXCL10* e *CXCL11*, ambos codificantes de quimiocinas se apresentaram associados ao grupo Ind. As quimiocinas *CXCL10* e *CXCL11* fazem parte do eixo de ligação com o receptor CXCR3 presente na superfície de linfócitos T e células NK, o qual exerce papel regulatório na ativação e recrutamento dessas células⁴¹.

A



B

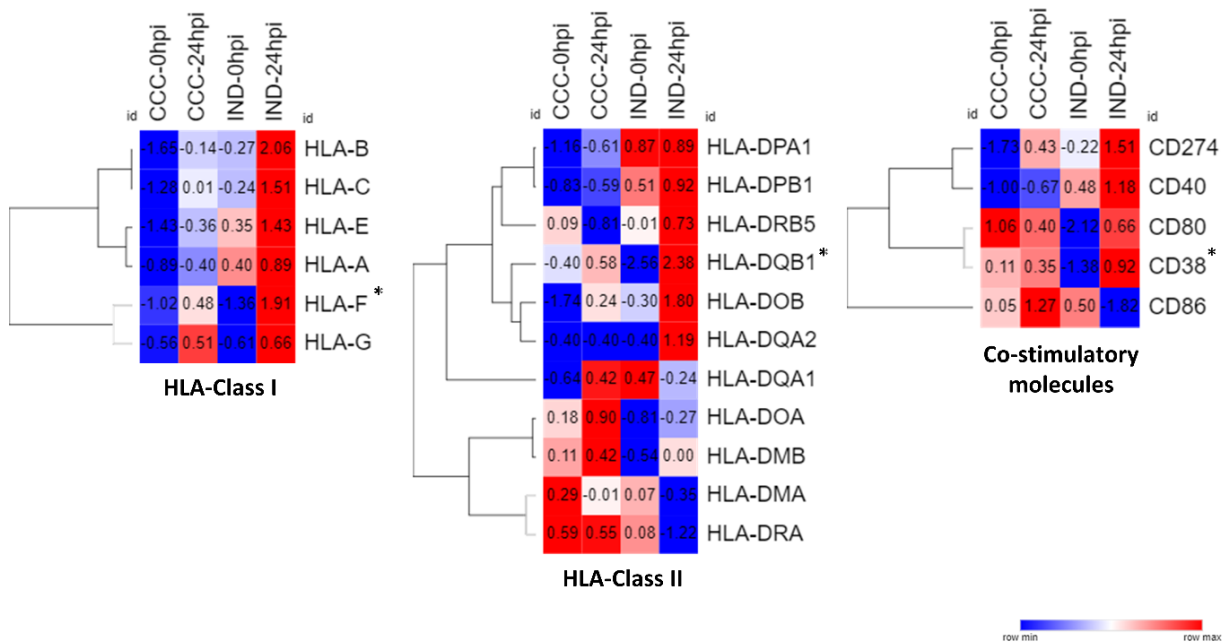


Figura 26: (A) Gráfico da enciclopédia KEGG indicando os DEGs positivamente associados às vias de processamento e apresentação antigênica (verde – associação com Ind; vermelho – associação com CC). (B) Heatmaps mostrando a expressão normalizada dos genes do sistema HLA de Classe I e Classe II em todas as condições. *DEGs significativos

5. DISCUSSÃO

5.1 Produção de hiPSCs e diferenciação em hiPSC-CM

Quando o processo de produção de células-tronco pluripotentes induzidas foi apresentado pela primeira vez por Takahashi e colaboradores⁴², o tipo celular escolhido para a padronização dessa técnica foi o fibroblasto dérmico. Entretanto, o amplo uso desse tipo celular na geração de hiPSCs esbarra no fato de que a obtenção de fibroblastos dérmicos se dá por biópsia de pele, um procedimento que demanda um operador especializado e que geralmente é incômodo para o doador. Nos últimos anos, diversos protocolos alternativos foram publicados, mostrando ser possível gerar hiPSCs a partir de uma série de outros tecidos, sendo que o sangue, tanto periférico como de cordão umbilical, se mostrou como uma excelente fonte de células para reprogramação^{31,43,44}, por ser um tecido de fácil obtenção e pela homogeneidade no processo de isolamento de células. Nesse estudo, não registramos nenhum caso de recusa de participação, o que pode estar relacionado com a utilização de um método não-invasivo e prático de obtenção de material biológico.

O perfil de expansão dos eritroblastos se mostrou similar entre as amostras, sendo que todas foram passíveis de expansão e a maioria delas havia recuperado no D9 o número de 2×10^6 células plaqueadas no D0 (Figura 7). A razão 1×10^6 células para cada μg de plasmídeo no momento da nucleoporação variou entre 1:0,625 e 1:1,25, sendo que em todos os casos foi possível gerar clones viáveis (Tabela 4). Nota-se, porém, que o dia da nucleoporação foi um fator que influenciou na geração de clones, uma vez que a amostra CC5, nucleoporada em D12, foi a amostra menos eficiente, ainda que tenha sido reprogramada em uma concentração célula:plasmídeo maior do

que a amostra Ind4 (1:0,625), por exemplo. Esse dado indica que em D12, provavelmente, parte dos eritroblastos em cultura já está no processo de diferenciação em reticulócito, o qual leva à condensação da cromatina e expulsão do núcleo celular⁴⁵, impactando na eficiência de reprogramação. De qualquer forma, o intervalo entre 0,625 a 1,25µg de plasmídeo para cada milhão de células se mostrou eficiente para reprogramação de eritroblastos, corroborando dados já publicados⁴⁶.

Apesar da eficiência aqui apresentada se mostrar abaixo do que já foi demonstrado para reprogramações episomais (entre 0,006 a 0,1%)⁴⁷, as células geradas neste trabalho apresentaram alta capacidade de auto-renovação e expressão constitutiva dos marcadores de pluripotência, confirmados tanto por citometria de fluxo, como por imunofluorescência e RT-PCR. Esses dados reforçam que a reprogramação episomal de eritroblastos expandidos a partir de PBMCs, em condições “*feeder-free*”, é um método aplicável e reprodutível na geração de hiPSCs⁴⁴. Até onde sabemos, essa é a primeira coleção de hiPSCs que inclui tanto pacientes cardiopatas como indeterminados provenientes de um estudo longitudinal brasileiro e, dado seu potencial de aplicabilidade, podem ser diferenciadas em outros tipos celulares de interesse na doença de Chagas.

O protocolo utilizado para a produção de células cardíacas a partir das hiPSCs geradas se mostrou reprodutível, sendo capaz de gerar hiPSC-CM contráteis e com boa positividade para troponina I cardíaca, assegurando a ausência de células contaminantes no momento da infecção. Ainda que a eficiência de diferenciação entre as amostras tenha variado, conforme já

observado em outros protocolos de diferenciação⁴⁸, foi possível gerar a quantidade mínima de hiPSC-CM necessários para os experimentos propostos.

5.2 Ensaio de infecção de PBMCs e hiPSC-CM

A interação entre o *T. cruzi* e as células de organismos hospedeiros já foi estudada por diversos modelos celulares envolvendo, por exemplo, células HeLa, HUVEC, LLC-MK2, PBMCs, entre outras⁴⁹. O uso de cepas geneticamente modificadas para expressar genes repórteres como o GFP tem sido de grande valia em modelos que visam estudar a infecção do *T. cruzi* em termos quantitativos, por permitirem uma análise mais precisa e rápida do perfil de infecção do parasita⁵⁰. Nosso modelo utilizou a cepa Y, gentilmente cedida por Schenkman e colaboradores³³, a qual foi modificada geneticamente para expressar GFP quando na fase amastigota.

Utilizando dessa cepa modificada, juntamente com a marcação específica de monócitos, linfócitos T e linfócitos B, nosso modelo foi capaz de distinguir de forma eficiente a taxa de infecção e replicação parasitária nesses três tipos celulares. Quando comparamos as taxas de infecção *in vitro* de linfócitos T e B no nosso modelo com outros valores já observados, confirmamos a baixa taxa de infecção nesses tipos celulares, porém agora mostrando que essa taxa se mantém até 48 hpi, sem aumento significativo (Figura 15), e também confirmando a capacidade do *T. cruzi* em proliferar dentro dessas células (Figura 16)^{51,14}.

A taxa de infecção monocitária na literatura é variável, uma vez que os protocolos variam nos tempos de infecção e no preparo das células, dificultando uma comparação direta entre os dados. Alguns grupos optam por infectar apenas monócitos aderidos^{14,52}, sem a presença de outras PBMCs,

fazendo com que o efeito da presença de outras células no momento da infecção seja pouco explorado. Ainda assim, dados sobre a infecção de monócitos indicam que o *T. cruzi* tem uma alta capacidade de infectar essas células, e em apenas 3 hpi a taxa de infecção varia entre 29% e 80%⁴⁹. No nosso modelo, em 3 hpi a infecção preferencial também foi monocitária, com aumento expressivo da taxa de infecção nas horas subsequentes. Dessa forma, a presença de outras PBMCs no meio pareceu não alterar a preferência inicial do *T. cruzi* pela infecção de monócitos. A natureza fagocítica profissional do monócito também pode ser um fator que contribui para taxas iniciais mais altas de infecção, assim como para a queda mais acentuada no número de células ao longo das horas pós-infecção analisadas, uma vez que os monócitos estão envolvidos com o *clearance* de patógenos.

Ainda que nosso modelo não tenha sido capaz de identificar uma diferença no perfil de infecção e proliferação parasitária ao longo do tempo entre pacientes cardiopatas e indeterminados, pudemos observar uma diferença no que diz respeito à capacidade do *T. cruzi* em proliferar dentro dos três tipos celulares analisados (Figura 18). Ainda que haja queda no número de monócitos ao longo do tempo, a razão de intensidade do GFP 48/24 hpi mostra que a eficiência de replicação do parasita em monócitos é maior do que em linfócitos T e B, indicando que esse tipo celular se apresenta mais propício à replicação parasitária. Dados no nosso grupo gerados por Alvim, J et al. (2020)⁵³ a partir da infecção de cardiomiócitos humanos derivados de hiPSCs, mostram que o parasita se beneficia da ativação de vias glicolíticas ativadas pós-infecção para proliferar dentro da célula hospedeira. Uma vez que monócitos alteram seu estado metabólico de oxidativo para glicolítico quando

ativados⁵⁴, um efeito semelhante poderia estar sendo observado, o que explicaria o sucesso na replicação do parasita nesse tipo celular.

Dessa maneira, nossos dados sugerem que não existem diferenças nos números de monócitos, linfócitos B e linfócitos T entre indivíduos controles, indeterminados e cardiopatas. Também não houve diferença na taxa de infecção pelo *T. cruzi* entre esses grupos, sugerindo não existir uma memória na resposta aguda à infecção por *T. cruzi* em células de indivíduos já expostos ao parasita independente de sintomáticos ou assintomáticos.

Nosso modelo de infecção de hiPSC-CM com o uso da cepa Y modificada para expressar GFP se mostrou eficiente na quantificação da infecção, sendo possível detectar amastigotas intracelulares já em 3 hpi. Porém, como para PBMCs, não foram observadas diferenças significativas quanto à capacidade de infecção e proliferação do *T. cruzi* em hiPSC-CM de pacientes indeterminados e cardiopatas (Figura 20). O fato da eficiência de infecção e replicação em PBMCs e cardiomiócitos ser igual em ambos os grupos sugere que os diferentes desfechos fenotípicos provavelmente não estão relacionados à carga parasitária inicial. Entre pacientes crônicos sintomáticos e assintomáticos também não foram encontradas diferenças entre a carga parasitária quando aferidas por RT-PCR no sangue e no plasma⁵⁵. Diante desses resultados, explorar globalmente a resposta transcricional à infecção mostrou-se uma opção viável para identificar as estratégias moleculares adotadas para superar os distúrbios intracelulares causados pela infecção e evitar danos ao tecido infectado.

5.3 Respostas transcricionais associadas à infecção

De todas as vias biológicas perturbadas em 24 hpi, a resposta à interferon se mostrou altamente sensível à infecção com uma fração considerável de DEGs associados a essa via (Tabela 6). Ambas as cascatas de IFN do tipo I e II são mediadas pelo reconhecimento de TLR nas membranas da célula e do fagossomo e já se mostraram cruciais no controle da replicação do *T. cruzi*⁵⁶. Em células dendríticas infectadas, a ativação de genes de resposta à interferon se mostrou positiva com apenas 12 hpi⁵⁷, reforçando a sensibilidade dessa via à infecção por *T. cruzi* tanto em células fagocíticas profissionais como não profissionais. Na GSEA, a sinalização de genes induzidos por IFN foi estatisticamente associada ao grupo Ind que apresentou uma regulação positiva altamente homogênea para esse grupo de genes do momento 0 hpi para 24 hpi (Figura 24).

O desencadeamento de genes induzíveis por IFN em cardiomiócitos infectados é crucial para o controle da proliferação do parasita, porém o momento da mudança de um efeito protetor para um efeito deletério ainda é um ponto em constante discussão⁵⁸. Notavelmente, os genes induzíveis por IFN- γ já se mostraram altamente expressos no miocárdio de pacientes cardiopatas em estágio terminal da doença²⁵. Nossos resultados sugerem um papel protetor dos genes induzíveis por IFN em hiPSC-CM de pacientes indeterminados, configurando uma resposta oportuna e bem orquestrada à infecção por *T. cruzi*, logo nas primeiras horas, a qual parece crucial para estabelecer uma comunicação eficiente entre a resposta imune inata e adaptativa. Concordantemente, os genes *HLA-F* (classe I) e *HLA-DQB1* (classe II) foram significativamente associados ao grupo Ind nos resultados de GSEA,

e todos os genes de HLA Classe I foram regulados positivamente neste grupo em 24 hpi (Figura 26, painel B). É digno de nota que o gene *HLA-DQB1* já foi previamente associado à proteção contra o desenvolvimento das formas crônicas cardíaca ou digestiva em pacientes chagásicos brasileiros⁵⁹.

Outras moléculas tais como CD38, CD247, CD40 e CD80 também foram reguladas positivamente no grupo Ind em 24 hpi, as quais, num eventual cenário *in vivo*, estabeleceriam uma ponte de comunicação entre células cardíacas e leucócitos. A expressão tanto de CD40 como de CD80 já foi detectada em músculo cardíaco, sendo a primeira num contexto de infecção por *T. cruzi*, no qual a expressão dessa molécula estava relacionada com a produção de IFN- γ ²². É importante ressaltar que a molécula CD247 (PD-L1) é conhecida por ser um *checkpoint* imunológico crucial envolvido na regulação imune de células T e que o tratamento com moléculas inibidoras de *checkpoint* levou ao aumento da infiltração de leucócitos e danos cardíacos em camundongos infectados com *T. cruzi*⁶⁰, indicando um papel regulatório importante dessa molécula no controle do dano tecidual.

Curiosamente, a expressão de genes relacionados à MEC foi sensível à infecção em cardiomiócitos do grupo Ind enquanto permaneceu inalterada no grupo CC. Nos momentos iniciais da infecção, o *T. cruzi* é conhecido por interagir com componentes da MEC, induzindo o remodelamento da mesma, e, alguns dos genes aqui associados à "*EM transition*" (Hallmark) e "*ECM organization*" (Reactome), fazem parte do "interatôma" proposto a partir da interação *T. cruzi* - MEC (*MMP2 / COL1A2 / COL6A2 / COL5A1*), regulado pela molécula gp38 na membrana do parasita⁶¹. A regulação positiva tanto de genes pró-fibróticos como anti-fibróticos já foi demonstrada em cardiomiócitos

humanos primários em momentos iniciais da infecção, indicando que as células cardíacas são capazes de responder à produção de componentes da MEC induzida pelo parasita⁶². Assim, a regulação negativa de genes relacionados à MEC por parte dos cardiomiócitos do grupo Ind pode indicar um melhor controle na expressão de genes de remodelação da MEC, protegendo as células de adquirir um fenótipo pró-fibrótico.

A GSEA também detectou vias biológicas com comportamentos opostos nos grupos fenotípicos em resposta à infecção. Tanto a sinalização de mTORC1 quanto UPR foram reguladas positivamente em CC, mas reguladas negativamente em Ind em 24 hpi. A sinalização do mTORC1 é crucial nos momentos iniciais da infecção, como demonstrado por Libisch et al. (2018)⁶³. Nesse estudo, os autores observaram que a ativação da sinalização mTORC1 na infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos humanos induz a biogênese mitocondrial e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a danos oxidativos e ao desenvolvimento de um fenótipo celular patológico.

Além disso, o estresse de retículo endoplasmático mediado por ROS é um fenômeno que pode levar ao dobramento incorreto de proteínas e a ativação de UPR⁶⁴. Algumas das moléculas produzidas num contexto de UPR são indutoras de apoptose, como é o caso dos fatores de transcrição da família *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP). Nos nossos resultados, o gene *CEBPG* foi regulado positivamente no grupo CC como resultado da infecção. O *knockdown* de CHOP (membro principal da família C/EBP altamente ativo sob estresse de retículo), em um modelo murino de sobrecarga cardíaca resultou em menor disfunção cardíaca, indicando que os fatores de transcrição C/EBP

trabalham como reguladores chave de apoptose de cardiomiócitos sob estresse patológico³⁸.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossa abordagem nos permitiu de forma conclusiva comparar a eficiência de infecção e replicação do *T. cruzi* em tipos celulares de alta relevância para a doença de Chagas, apontando para uma situação na qual não há diferenças entre os grupos quanto à capacidade de agir eficientemente na eliminação parasitária dentro das primeiras 24 horas de contato parasita-hospedeiro. Ainda, nossos resultados apontam para um cenário no qual os cardiomiócitos infectados de pacientes indeterminados exibem um de resposta transcricional favorável à regulação positiva de moléculas envolvidas no eixo imune inato-adaptativo, levando a uma melhor orquestração do processamento e apresentação de antígenos, bem como a regulação negativa de genes relacionado ao estresse celular que podem levar a produção de ROS e consequentes danos aos cardiomiócitos.

Por outro lado, o perfil de resposta transcricional em cardiomiócitos de pacientes cardiopatas indica o estabelecimento de um perfil homeostático desequilibrado em 24 hpi, o qual desfavorece o controle da produção de ROS induzida pela infecção e estresse de retículo endoplasmático, sobrepondo sua capacidade de desenvolver uma resposta específica ao parasita, o que por sua vez pode resultar em uma dependência de longo prazo da resposta primária mediada por IFNs. Em conclusão, nossos resultados apontam para diferenças genéticas basais que modulam as respostas específicas de cada grupo à infecção, o que pode impactar na evolução de diferentes desfechos clínicos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2017; **6736**: 1–13.
- 2 Garza M, Feria Arroyo TP, Casillas EA, Sanchez-Cordero V, Rivaldi CL, Sarkar S. Projected Future Distributions of Vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under Climate Change Scenarios. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**. doi:10.1371/journal.pntd.0002818.
- 3 Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean. In: Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI (eds). *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean*. Springer Vienna: Vienna, 2015, pp 45–70.
- 4 Dias JCP. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). In: Marcondes CB (ed). *Arthropod Borne Diseases*. Springer International Publishing, 2016, pp 245–275.
- 5 Vianna Martins A, Patrícia Gomes A, de Mendonça EG, Rangel Fietto JL, Alberto Santana L, de Almeida Oliveira MG *et al*. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio* 2012; **16**: 45–58.
- 6 Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1–14.
- 7 Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; **375**: 1388–1402.
- 8 Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2012; **9**: 576–589.
- 9 Benziger CP, do Carmo GAL, Ribeiro ALP. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. *Cardiol Clin* 2017; **35**: 31–47.
- 10 Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *Am J Med* 2015; **128**: 1251.e7-1251.e9.
- 11 Rassi Jr A, Marin Neto JA, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a

- review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; **112**: 224–235.
- 12 Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes M V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* 2007; **115**: 1109–1123.
 - 13 Gonzalez J, Azzato F, Ambrosio G, Milei J. Pathogenesis of Chronic Chagasic Myocarditis. In: *Diagnosis and Treatment of Myocarditis*. InTech, 2013, p 450.
 - 14 Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CAS, Chaves ACL, Gollob KJ *et al*. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 2004; **72**: 5283–5291.
 - 15 Marin-Neto JA, Simoes MV, Rassi Junior A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; **46**: 536–541.
 - 16 Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, Oliveira FOR, Silva Neto DT, Meirelles MNSL *et al*. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–8.
 - 17 de Souza W, de Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010; **2010**: 1–18.
 - 18 Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–7.
 - 19 Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J *et al*. *Trypanosoma cruzi* Utilizes the Host Low Density Lipoprotein Receptor in Invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**: e953.
 - 20 Manque PA, Probst C, Pereira MCS, Rampazzo RCP, Ozaki LS, Pavoni DP *et al*. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces a Global Host Cell Response in Cardiomyocytes. *Infect Immun* 2011; **79**: 1855–1862.

- 21 Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL *et al.* Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog* 2016; **12**: e1005511.
- 22 Moreno Ayala MA, Casasco A, González M, Postan M, Corral RS, Petray PB. *Trypanosoma cruzi* infection induces the expression of CD40 in murine cardiomyocytes favoring CD40 ligation-dependent production of cardiopathogenic IL-6. *Parasitol Res* 2016; **115**: 779–785.
- 23 Oliveira AER, Grazielle-Silva V, Ferreira LRP, Teixeira SMR. Close encounters between *Trypanosoma cruzi* and the host mammalian cell: Lessons from genome-wide expression studies. *Genomics* 2020; **112**: 990–997.
- 24 Libisch MG, Rego N, Robello C. Transcriptional Studies on *Trypanosoma cruzi* – Host Cell Interactions: A Complex Puzzle of Variables. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**: 1–12.
- 25 Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatidou D, Benvenuto L, Higuchi ML *et al.* Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005; **167**: 305–313.
- 26 Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM *et al.* Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: E1848–E1857.
- 27 Matsa E, Burridge PW, Wu JC. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 239ps6.
- 28 da Silva Lara L, Andrade-Lima L, Magalhães Calvet C, Borsoi J, Lopes Alberto Duque T, Henriques-Pons A *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an in vitro model for drug screening for Chagas disease. *Microbes Infect* 2018; **20**: 312–316.
- 29 Fraietta I, Gasparri F. The development of high-content screening (HCS)

- technology and its importance to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2016; **11**: 501–514.
- 30 Sass G, Tsamo AT, Chounda GAM, Nangmo PK, Sayed N, Bozzi A *et al.* Vismione B interferes with *Trypanosoma cruzi* infection of vero cells and human stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Trop Med Hyg* 2019; **101**: 1359–1368.
- 31 Dowe SN, Huang X, Chou B-K, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc* 2012; **7**: 2013–21.
- 32 Young L, Sung J, Masters JR. Detection of mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* 2010; **5**: 929–934.
- 33 Ramirez MI, Yamauchi LM, De Freitas LHG, Uemura H, Schenkman S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; **111**: 235–240.
- 34 Sharma A, Toepfer CN, Schmid M, Garfinkel AC, Seidman CE. Differentiation and Contractile Analysis of GFP-Sarcomere Reporter hiPSC-Cardiomyocytes. *Curr Protoc Hum Genet* 2018; **96**: 21.12.1-21.12.12.
- 35 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; **15**: 1–21.
- 36 Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation(China)* 2021; **2**: 100141.
- 37 Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst* 2015; **1**: 417–425.
- 38 Wang X, Wei W, Wu J, Kang L, Wu S, Li J *et al.* Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Activation of C/EBP

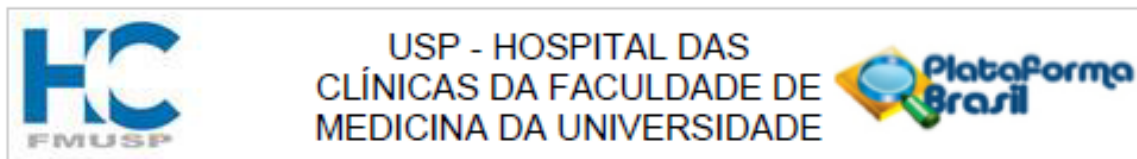
- Homologous Protein in Aortic Regurgitation-Induced Cardiac Remodeling in Mice. *J Cardiovasc Transl Res* 2021. doi:10.1007/s12265-021-10162-4.
- 39 Barrias ES, de Carvalho TMU, De Souza W. Trypanosoma cruzi: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol* 2013; **4**: 1–10.
- 40 Didié M, Galla S, Muppala V, Dressel R, Zimmermann W-H. Immunological Properties of Murine Parthenogenetic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Engineered Heart Muscle. *Front Immunol* 2017; **8**. doi:10.3389/fimmu.2017.00955.
- 41 Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S *et al.* CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2018; **63**: 40–47.
- 42 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676.
- 43 Chou B-K, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 2011; **21**: 518–529.
- 44 Chou B-K, Gu H, Gao Y, Dowey SN, Wang Y, Shi J *et al.* A Facile Method to Establish Human Induced Pluripotent Stem Cells From Adult Blood Cells Under Feeder-Free and Xeno-Free Culture Conditions: A Clinically Compliant Approach. *Stem Cells Transl Med* 2015; **4**: 320–332.
- 45 Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA. From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals. *Front Physiol* 2017; **8**: 1–9.
- 46 Fernandes S, Talwadekar M, Agarwal R, Nair V, Kale V, Limaye L. Generation and characterization of human iPSC line from CD34+cells isolated from umbilical cord blood belonging to Indian origin. *Stem Cell Res* 2017; **18**: 60–63.
- 47 Attwood S, Edel M. iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic

- Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? *J Clin Med* 2019; **8**: 288.
- 48 Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: A methods overview. *Circ Res* 2012; **111**: 344–358.
- 49 Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature . *Parasite* 2014; **21**: 38.
- 50 Kessler RL, Gradia DF, Pontello Rampazzo R de C, Lourenço ÉE, Fidêncio NJ, Manhaes L *et al.* Stage-Regulated GFP Expression in *Trypanosoma cruzi*: Applications from Host-Parasite Interactions to Drug Screening. *PLoS One* 2013; **8**: e67441.
- 51 Velge P, Kusnierz J - P, Ouaisi A, Marty B, Pham BN, Capron A. *Trypanosoma cruzi*: Infection of T lymphocytes and their destruction by antibody- dependent cell- mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2145–2152.
- 52 Souza PEA, Rocha MOC, Menezes CAS, Coelho JS, Chaves ACL, Gollob KJ *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun* 2007; **75**: 1886–1894.
- 53 Alvim JM. *Efeito da rapamicina na infecção de cardiomiócitos humanos por Trypanosoma cruzi*. 2020. doi:10.11606/D.5.2020.tde-28012020-163518.
- 54 Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, Singh A, Crowe SM. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine* 2016; **6**: 31–41.
- 55 Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO *et al.* Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors* 2015; **8**:

- 154.
- 56 Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H *et al.* TLR-Dependent Induction of IFN- β Mediates Host Defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2006; **177**: 7059–7066.
- 57 Gil-Jaramillo N, Rocha AP, Raiol T, Motta FN, Favali C, Brigido MM *et al.* The First Contact of Human Dendritic Cells With *Trypanosoma cruzi* Reveals Response to Virus as an Unexplored Central Pathway. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–16.
- 58 Ferreira LRP. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol* 2014; **6**: 782.
- 59 Deghaide NHS, Dantas RO, Donadi EA. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. *Dig Dis Sci* 1998; **43**: 246–252.
- 60 Fonseca R, Salgado RM, da Silva HB, do Nascimento RS, D'Império-Lima MR, Alvarez JM. Programmed cell death protein 1-PDL1 interaction prevents heart damage in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.00997.
- 61 Nde PN, Lima MF, Johnson CA, Pratap S, Villalta F. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–10.
- 62 Udoko AN, Johnson CA, Dykan A, Rachakonda G, Villalta F, Mandape SN *et al.* Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; **10**: 1–23.
- 63 Libisch MG, Faral-Tello P, Garg NJ, Radi R, Piacenza L, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitochondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1–14.
- 64 Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants Redox Signal* 2014; **21**: 396–413.

8. ANEXOS

ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica

Pesquisador: Jose Eduardo Krieger

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 89242218.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.670.606

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental, para avaliar a interação entre o parasita *T. cruzi* e células cardíacas humanas provenientes de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) de pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas, tanto na fase indeterminada como apresentando cardiomiopatia chagásica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar a infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CMs) de pacientes chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica. **Objetivo Secundário:** Realizar a reprogramação de eritroblastos de indivíduos chagásicos em hiPSCs, e diferenciá-las em cardiomiócitos (hiPSC-CMs); Avaliar a resposta transcricional das hiPSC-CMs após a infecção por *T. cruzi* através da técnica de RNA-seq; Comparar a dinâmica e eficiência da infecção e replicação de *T. cruzi* em hiPSC-CMs de indivíduos com cardiomiopatia chagásica vs. fase indeterminada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão relacionados com a coleta de uma amostra de sangue. O estudo não traz benefícios diretos ao participante, uma vez que se trata de um estudo experimental com foco na

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.670.606

padronização de técnicas laboratoriais para cultura de células-tronco e análises de biologia celular e molecular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com boa fundamentação teórica, metodologia adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito em linguagem clara e compreensível.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequado para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1046557.pdf	08/05/2018 14:52:31		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_signed_2.pdf	08/05/2018 14:51:56	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	SGP_RETIFICADO.pdf	28/03/2018 11:33:07	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Theo_2018_24_01.pdf	21/02/2018 08:43:29	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	08/12/2017 17:13:37	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Carta_2017_08_12.pdf	08/12/2017 11:42:41	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Solicitacao_de_ad_referendum_2017_	08/12/2017	Jose Eduardo	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.670.606

Outros	08_12.pdf	11:41:40	Krieger	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao1_2017_04_12.pdf	08/12/2017 11:41:09	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	04/12/2017 11:30:51	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Carta_anuencia.pdf	04/12/2017 11:29:25	Jose Eduardo Krieger	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Maio de 2018

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HC/FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

I. DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa – “Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica”

Pesquisador principal – Prof. José Eduardo Krieger

Departamento/Instituto – Instituto do Coração (InCor)- Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

II. DESCRIÇÃO E OBJETIVOS DA PESQUISA

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica” que será desenvolvida no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, sob a coordenação do Prof. José Eduardo Krieger (CRM: 61539).

O objetivo desse estudo é produzir células do coração de pacientes com doença de Chagas (cardiomiopatia chagásica) e de paciente sem sintomas da doença, para comparar as diferenças no comportamento dessas células quando infectadas pelo parasita *Trypanosoma cruzi*.

Com essa pesquisa poderemos estudar, em laboratório, as características que definem o porque de alguns indivíduos apresentarem problemas no coração por conta da doença de Chagas e outros não.

III. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E MÉTODOS EMPREGADOS

Serão coletados 16ml de sangue (mais ou menos 1 colher de sopa - dois tubos de 8ml) para separação das células sanguíneas. A coleta seguirá as normas de higiene e segurança estabelecidas, e será efetuada por profissionais treinados. O sangue será armazenado em biorepositório até serem extraídas as células que, podem se transformar em outras células, e utilizadas para produzir células do coração em laboratório.

IV. RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS

Riscos:

Os riscos são referentes a coleta de sangue que pode formar um hematoma (mancha roxa) no local, a região onde se realizou a coleta pode ficar dolorida. Todo material utilizado será descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado.

Benefícios esperados para o participante:

Rubrica do participante _____

Rubrica do responsável pela pesquisa _____

Versão 1 - 4 de dezembro 2017

Não há benefícios diretos na sua participação com esse estudo, mas sua participação nos ajudará a padronizar de técnicas laboratoriais para cultura de células que podem se transformar em outros tipos de células, células do coração humano e análises de seu funcionamento.

V. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você tem plena liberdade de não autorizar a coleta de material biológico a ser utilizado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material biológico para essa pesquisa só será feito após a leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento. Da mesma forma, você terá plena liberdade de tirar seu consentimento a qualquer momento caso não deseje mais participar do estudo.
2. Você terá acesso, em qualquer momento do estudo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas.
3. **Direito de confidencialidade:** para manter sua privacidade, um número de registro será fornecido à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido em absoluto sigilo e não serão divulgados em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador da pesquisa.
4. Eventuais resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
5. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, porém também não receberá nenhum retorno financeiro ou material.
6. Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da USP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
7. Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido e receberá, por direito, uma das vias para controle pessoal.
8. **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. José Eduardo Krieger que poderá ser encontrado no seguinte endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 10º Andar, Bloco II, no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular. Telefone: (11) 2661-5579. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º Andar. Telefone: (11)2661-7585, 2661-1548, 2661-1549. E-mail: cappesq.adm@hc.fmusp.br.
9. O material biológico obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011, em biorrepositório do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular. Após os testes, o material será mantido no biorrepositório, localizado no Instituto do Coração (InCor/HCFMUSP), 10º andar, Bloco II. O material será mantido no biorrepositório durante a vigência do projeto e a utilização desse material para outras pesquisas só será realizada após novo consentimento e aprovação do sistema CEP-CONEP.

Rubrica do participante_____

Rubrica do responsável pela pesquisa_____

Versão 1 - 4 de dezembro 2017

Fui suficientemente informado(a) a respeito do estudo "Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. José Eduardo Krieger) ou pessoa(s) por ele delegada(s) (Théo Gremen Mimary de Oliveira) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante legal

Data __/__/__

Assinatura da testemunha

Data __/__/__

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data __/__/__

Rubrica do participante _____

Rubrica do responsável pela pesquisa _____

Versão 1 - 4 de dezembro 2017

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ APTO: _____

COMPLEMENTO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ APTO: _____

COMPLEMENTO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROJETO: Caracterização da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs de indivíduos chagásicos na fase indeterminada e com cardiomiopatia chagásica.

2. PESQUISADOR: Prof. José Eduardo Krieger Nº CRM: 61539

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular.

UNIDADE DO HC/FMUSP: Instituto do Coração (InCor/HCFMUSP).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DE PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

Rubrica do participante _____

Rubrica do responsável pela pesquisa _____

ANEXO III – Sequências dos *primers* utilizados para RT-PCR

Gene	Primer	Sequência	Tamanho	Tamanho do produto
<i>KLF4</i>	K1_FW	AATGAGGCAGCCACCTGG	18	131 pb
	K1_RV	AGCGGTTATTCGGGGCAC	18	
<i>REX1</i>	X1_FW	GTAACAGGGGTTGGAGTGCA	20	178 pb
	X1_RV	TGTTTCAGCTCAGCGATGGT	21	
<i>GAPDH</i>	H1_FW	TGACCTCAACTACATGGTTTACA	23	332 pb
	H1_RV	TGCTGATGATCTTGAGGCTGT	22	
<i>OCT4</i>	CT1_FW	AGGAGATATGCAAAGCAGAAACC	23	178 pb
	CT1_RV	AACCACACTCGGACCACATC	20	
<i>NANOG</i>	OG1_FW	TCACACGGAGACTGTCTCTC	20	281 pb
	OG1_RV	TCACCTGTTTGTAGCTGAGGT	21	
<i>LIN28A</i>	A1_FW	GCAGTTTGCAGGTGGCTG	18	225 pb
	A1_RV	TCCATGTGCAGCTTACTCTGG	21	

ANEXO IV – Links para visualização de hiPSC-CM

Nos links abaixo é possível observar a contração dos hiPSC-CM no D20:

1 - <https://youtu.be/8kMOcpAkbKY>

2 - https://youtu.be/Ugo3_zUS4_4

ANEXO V –Tabela de resultados de GSEA com termos significativos e não significativos

Termo Original	ES	NES	p-valor	FDR	Tam.	Genes Leading-edge	Genes
Termos associados à IND							
INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	-0.627	-3.31	0.002	0.0221	36	28	SOCS3/NFKBIA/DDX60/GCH1/TNFSF10/DDX58/SAMHD1/IFIH1/CXCL11/PSME1/NAMPT/SLC25A28/CD38/IFI35/SECTM1/IFI27/CM PK2/IFI44/IFIT1/HERC6/MT2A/MX2/RSAD2/IFI44L/PSMB9/UBE2 L6/CASP1/CXCL10
INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	-0.684	-3.01	0.002	0.0221	21	15	IFIH1/CXCL11/PSME1/SLC25A28/IFI35/IFI27/CMPK2/IFI44/HERC 6/RSAD2/IFI44L/PSMB9/UBE2L6/CASP1/CXCL10
KRAS_SIGNALING_DN	-0.589	-1.90	0.004	0.0612	9	7	ARPP21/CKM/IFI44L/NR6A1/RSAD2/SHOX2/SNCB
KRAS_SIGNALING_UP	-0.401	-1.45	0.087	0.4516	13	3	CA2/CXCL10/DOCK2
IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	-0.498	-1.43	0.116	0.3979	7	3	CD38/CXCL10/CXCL11
COMPLEMENT	-0.337	-1.40	0.100	0.3695	19	11	ADRA2B/APOBEC3F/APOBEC3G/CA2/CASP1/CD55/GCA/L3MBT L4/LAP3/LGALS3/PSMB9
MITOTIC_SPINDLE	-0.415	-1.36	0.132	0.3738	10	4	ARHGAP27/ARHGEF3/DOCK2/LRPPRC
UV_RESPONSE_UP	-0.350	-1.32	0.157	0.3949	14	12	CA2/E2F5/ENO2/GCH1/HLA- F/IRF1/NFKBIA/PPIF/RET/SHOX2/SOD2/TAP1
OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	-0.516	-1.27	0.186	0.4322	5	2	ATP1B1/LRPPRC
IL2_STAT5_SIGNALING	-0.320	-1.21	0.221	0.4294	14	4	CA2/CDCP1/CXCL10/LRRC8C
Termos associados à CC							
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	0.548	2.130	0.002	0.022	19	12	MMP2/BMP1/CXCL12/COL1A2/TNC/LRP1/COL6A2/SPARC/COL5 A1/FBLN2/PMEPA1/CDH11
UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	0.547	2.21	0.002	0.022	13	12	CHAC1/IARS1/ASNS/SLC7A5/KDEL3/MTHFD2/XPOT/FKBP14/TA RS1/PSAT1/CEBPG/HYOU1
MTORC1_SIGNALING	0.530	1.96	0.005	0.039	15	10	PHGDH/ASNS/SLC7A5/SHMT2/IDH1/EPRS1/MTHFD2/SLC6A6/PS AT1/TRIB3
MYOGENESIS	0.413	1.57	0.053	0.204	18	6	APLNR/COL6A2/EPHB3/IGF1/PLXNB2/SPARC
APICAL_JUNCTION	0.410	1.44	0.085	0.314	14	8	BMP1/CDH11/DLG1/MAPK14/MMP2/MYH10/PCDH1/SRC
GLYCOLYSIS	0.424	1.36	0.132	0.378	11	6	CHPF/CHPF2/COL5A1/HDLBP/IDH1/KDEL3
XENOBIOTIC_METABOLISM	0.364	1.25	0.207	0.481	13	4	IDH1/IGF1/PYCR1/SHMT2
UV_RESPONSE_DN	0.363	1.22	0.214	0.467	13	6	COL1A2/DLG1/FYN/KALRN/MAPK14/SLC7A1
NOTCH_SIGNALING	0.474	1.15	0.286	0.519	5	3	HEYL/JAG1/MAML2
ADIPOGENESIS	0.393	1.01	0.418	0.543	6	6	ALDH2/COL15A1/DNAJC15/IDH1/PTGER3/SCARB1