



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



**TRANSFERÊNCIA DE DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
PARA RETROTRANSPOSONS LINE-1 DE
CAMUNDONGOS CHAGÁSICOS TRATADOS COM
NITRODERIVADO BENZONIDAZOL**

Alessandro Oliveira de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Antonio Raimundo Lima Cruz Teixeira

Brasília, 2012

Alessandro Oliveira de Sousa

**TRANSFERÊNCIA DE DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
PARA RETROTRANSPOSONS LINE-1 DE
CAMUNDONGOS CHAGÁSICOS TRATADOS COM
NITRODERIVADO BENZONIDAZOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Brasília, 2012

Trabalho produzido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas junto ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq e Capes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à pessoa que ilumina o meu viver, ao amor da minha vida, àquela cujas virtudes não podem ser exprimidas com contentamento em meras palavras: **Camila Abgail Lima Rodrigues Oliveira**. Sem a sua presença e apoio incondicional em todos os momentos a realização desse trabalho não seria possível.

Dedico este trabalho aos meus pais **Francisco Domingues de Sousa Neto, Maria Abadia Luiz de Sousa e Marilene José de Oliveira Sousa** que me concederam a vida, que me ensinaram o que é o amor, que me formaram como pessoa humana e cidadão, e que se sacrificaram para que eu pudesse ter a educação adequada para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Antônio Teixeira** por ter confiado no meu potencial, pela dedicação e fé inabaláveis que se mostraram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, e, por estar presente não apenas como mentor da minha formação científica, mas como um verdadeiro amigo.

Às Professoras **Nadjar Nitz** e **Mariana Hecht** pelo apoio e troca de idéias que auxiliaram na elaboração dos experimentos aqui descritos.

Aos colegas e amigos do LMPDC que me acompanharam desde que ingressei no laboratório como aluno de iniciação científica, o ambiente desse lugar permitiu encontrar verdadeira alegria no trabalho. Sou grato a cada um de vocês: **Adriana Benevides, Adriano Rios, Dra. Ana Carolina Bussacos, Dra. Ana de Cássia, Ester Rose, Geraldo Raposo, Hevelly Hashimoto, Luiz Araujo Neto, Márcia Peres, Miguel Ribeiro dos Santos, Osmar Oliveira Neto, Perla Araújo, Rafael Andrade e Rozeneide Magalhães.**

Em especial sou grato aos amigos **Ciro Cordeiro, David Neves, Hugo de Almeida, Carlos Fernando Pimentel, Maria Carolina Cambraia** e aos **Professores Eduardo Leonardecz e Luciana Hagstrom** que sempre me ajudaram com conselhos, críticas e bom humor nos momentos de inquietação.

Agradeço também aos **Professores Jaime Santana e Kelly Magalhães** pelo auxílio com equipamentos e pelo apoio.

Agradeço aos meus sogros **Maria Betânia de Lima Gontijo e Elcy Mendes Borges** por sempre estarem ao meu lado, me acolhendo com suporte e afeto nessa fase da minha vida.

Agradeço aos meus irmãos **Fernando Oliveira de Sousa e Priscila Luiz de Sousa**, por estarem presentes e me apoiarem sempre.

RESUMO

As publicações de pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sugerem que a patogênese da doença de Chagas pode ser explicada pela auto-imunidade de origem genética (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011). A hipótese que levou as investigações sobre transferência de DNA do *Trypanosoma cruzi* para o genoma do hospedeiro mamífero foi feita depois que se observou que coelhos tratados com a droga tripanocida benzonidazol desenvolveram lesões destrutivas no coração com intensidade semelhante àquela encontrada nos coelhos chagásicos que não tinham recebido a droga. Entretanto, pesquisadores de outros centros consideram que o tratamento das infecções pelo *T. cruzi* com o nitroderivado benzonidazol é eficaz nos casos agudos da doença. Ademais, há os que tratam chagásicos com a infecção crônica, na expectativa de aliviar sintomas e melhorar o prognóstico do caso. Não obstante, vários autores sugerem que o tratamento com o nitroderivado não elimina a infecção pelo *T. cruzi* e não melhora o quadro da doença clínica. Esta polêmica tem mais que importância semântica, pois, se a quimioterapia da doença de Chagas fosse satisfatória poderia esclarecer os papéis das infecções persistentes e da autoimunidade na patogênese da doença. Os estudos prévios de Nitz e cols., 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011, mostram que sequências de minicírculo de DNA mitocondrial de *T. cruzi* (kDNA) integram frequentemente em retrotransposons LINE-1 no genoma hospedeiro, e sugerem que clones de linfócitos geneticamente modificados atacam e destroem o coração chagásico. Este estudo foi iniciado com o propósito de tentar falsear a teoria da origem genética da autoimunidade na doença de Chagas. Para isto, empregaram-se vários esquemas terapêuticos pelos quais grupos de camundongos com as infecções recentes pelo *T. cruzi* eram tratados com o nitroderivado benzonidazol, em dose quatro vezes acima (43 mg/kg) daquela usada para tratar a doença em humanos, e que era utilizado, alternativamente, em combinação com zidovudina (AZT) e ciprofloxacino (CIPRO), respectivamente, inibidores da

transcriptase reversa e da Topoisomerase II. Essas enzimas bloqueiam vias metabólicas essenciais na integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma (Rosa, 2005). Os resultados da investigação mostraram que os grupos de animais chagásicos tratados apenas com benzonidazol, ou em combinação com os inibidores, tiveram diminuição da quantidade de tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue. Entretanto, jamais se observou cura parasitológica e imunológica (ausência de anticorpos específicos) nos animais submetidos aos diferentes esquemas terapêuticos. Ademais, todos os animais nos grupos tratados obtiveram positividade nos exames PCR específicos para identificação de DNA nuclear (nDNA) e de (kDNA) do protozoário. Diante desses resultados, foram conduzidos experimentos para avaliar se os esquemas terapêuticos empregados tinham bloqueado a integração do kDNA no genoma dos camundongos, infectados e infectados-tratados. Os resultados desses experimentos mostraram integrações de kDNA em retrotransposons LINE-1 do genoma de animais chagásicos que foram submetidos aos vários esquemas de tratamento, com frequências similares aquelas documentadas nos genomas dos camundongos controle positivos, infectados com *T. cruzi* e deixados sem tratamento. As populações de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, $\gamma\delta$, e β (V β e V β 1) atacam e destroem o coração chagásico. O conjunto de resultados desses experimentos mostra que não foi possível refutar (negar) a teoria auto-imune da patogênese da doença de Chagas. Lamentavelmente, confirmou-se que o tratamento das infecções pelo *T. cruzi* com o nitroderivado é insatisfatório.

ABSTRACT

The investigations conducted at the Chagas Disease Multidisciplinary Research Laboratory at the Faculty of Medicine of the University of Brasilia suggest that the origin of the pathogenesis of Chagas Disease may be explained by the genetically driven autoimmune rejection of the target host tissues. Early experiments had shown that chagasic rabbits treated with the anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivative benznidazole developed destructive lesions in the heart similar to those found in chagasic, but untreated animals. This observation led to the hypothesis that the parasite DNA retained in the body could call out autoimmune mechanisms in Chagas disease. This hypothesis spurred further investigations on the transfer of *T. cruzi* DNA to the host's genome. Inasmuch some researchers continue to believe that the treatment of the *T. cruzi* infections with the nitroderivative benznidazole cure the Chagas disease, and others argue that the treatment should benefit those with the acute *T. cruzi* infections; prescriptions of the nitroderivative to treat the chronic infections aim at the prevention of disease outcome, alleviation of symptoms, and improvement of prognostics are recommended. Nevertheless, experimental and clinical investigations have shown that the treatment with the nitroderivative does not eradicate the *T. cruzi* infections and, therefore, the prognosis of the disease remains unchanged. This study subject bears practical importance, because it can show whether or not the chemotherapy of Chagas disease is satisfactory. Furthermore, its investigation in a suitable animal model may demonstrate any role played by the parasite persistence in the pathogenesis of the disease. Previous studies (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011) showed that the mitochondrial DNA minicircle sequence of *T. cruzi* integrates frequently into LINE-1 of the host's genome, and they suggest that clones of cytotoxic T lymphocytes, undergoing genotype modifications, attack and destroy the chagasic heart. This study was undertaken with the aim of falsifying the theory of the genetically driven autoimmune rejection of the heart in Chagas disease. We used several groups of mice with the *T. cruzi* infections, which were treated with the nitroderivative

benznidazole four fold (43 mg/kg) above the dose used to treat human Chagas disease. Also, groups of chagasic mice were treated with benznidazole (43mg/ml) combined with either zidovudine (AZT) or ciprofloxacin (CIPRO), or with both, inhibitors of reverse transcriptase and of topoisomerase II, respectively. These enzymes were used to halt metabolic pathways for the integration of kDNA minicircle sequences into the host cell genome (Rosa, 2005). The results of these investigations showed that animals treated with benznidazole alone, or in combination with AZT, CIPRO, or with both inhibitors, diminished the number of *T. cruzi* trypomastigotes in the blood. However, the parasitologic cure was never achieved, for specific anti-parasite antibodies remained in tissues, regardless of the therapeutic regime used. Moreover, treated mice yielded positive PCR exams that identify the *T. cruzi* nuclear DNA (nDNA) and kDNA. Accordingly, further experiments were carried on to finding out whether the therapeutic regimes used had prevented the kDNA integration into the chagasic mice genome. These results revealed that the kDNA minicircle sequences integrated into retrotransposons LINE-1 of mice, which had received the therapeutic regimes, in a frequency not different from that observed in the positive control group of *T. cruzi*-infected mice, which did not receive any therapeutic regime. It was further shown that subsets of cytotoxic T lymphocytes CD8+, $\gamma\delta$, and β ($V\beta$ and $V\beta 1$) attacked and destroyed the chagasic heart. The results of these experiments reveal that it was not possible to falsify (deny) the genetically driven auto-immune theory that explains the pathogenesis of Chagas disease. Unfortunately, it was confirmed that the treatment of the *T. cruzi* infections with the nitroderivative benznidazole is unsatisfactory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais hospedeiros vertebrados e invertebrados do <i>Trypanosoma cruzi</i> e formas encontradas em cada um deles	24
Figura 2. Ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 3. Estrutura molecular dos principais medicamentos já utilizados contra a doença de Chagas	29
Figura 4. Mecanismo de ação de benzonidazol e nifurtimox e vias de detoxificação do <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 5. Estrutura molecular da zidovudina e do ciprofloxacina	32
Figura 6. Radioautografia de produtos de PCR de camundongos dos diversos grupos experimentais	55
Figura 7. Características do infiltrado inflamatório no coração de camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com coquetel de drogas	56
Figura 8. Uso da tpTAIL-PCR na identificação de sítios de inserção de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma de <i>Mus musculus</i>	58
Figura 9. Eletroforese e radioautografia dos produtos obtidos do terceiro ciclo da tpTAIL-PCR	60
Figura 10. Validação da tpTAILPCR	61
Figura 11. Integrações de sequências de minicírculos de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> em retrotransposons LINE-1 em diversos cromossomos do genoma murino.	63
Figura 12. Elementos repetitivos encontrados nos sítios de integrações de sequências de kDNA no genoma de camundongos chagásicos.....	65
Figura 13. Quimeras formadas pela integração de sequências de minicírculos de kDNA no genoma de camundongos chagásicos.	66
Figura 14. Alinhamento de sítios de integração de kDNA no genoma de <i>Mus musculus</i>	67

Figura 15. Aspectos histopatológicos da miocardiopatia inflamatória na doença de Chagas murina.	72
Figura 16. Aspectos da adesão e da destruição das fibras cardíacas de feto murino de 16 dias de gestação pelos linfócitos efetores de chagásicos singênicos in vitro.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> específicos para LINE-1 de <i>Mus musculus</i>	44
Tabela 2. <i>Primers</i> específicos para <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Tabela 3. Ciclos empregados nas ampliações da <i>tpTAIL-PCR</i>	59
Tabela 4. Integrações de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos diferentes grupos experimentais	62
Tabela 5. Elementos repetitivos associados às sequências de kDNA integradas.	64
Tabela Suplementar 1. Integrações de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma de camundongos chagásicos crônicos.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
³² P	Isótopo radioativo fósforo-32
A	Adenina
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Aloficocianina
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxi-3,4-diidrotimidina
BALB/c	<i>Bagg albino inbred mouse strain</i>
BD	<i>Becton, Dickinson and Company</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina bovina do soro
C	Citosina
C&T	Ciência & Tecnologia
C57BL/6	<i>C57 black 6</i>
Ca ²⁺	Cálcio
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CSBs	<i>Conserved Sequence Blocks</i>
CuSO ₄	Sulfato de cobre
Cy3	Cianina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídio trifosfato
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ERV	<i>Endogenous retrovirus</i>
Fe ³⁺	Ferro
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Guanina

g	Grama
gRNAs	RNA guia
GSH	Glutathiona
GSSG	Dissulfeto de Glutathiona
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAL1	<i>Half-L1</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IAP	<i>Intracisternal particle A</i>
IFN-γ	Interferon gama
IgG1 κ	Imunoglobulina G1 kapa
IgG2a κ	Imunoglobulina G2a kapa
IL-2	Interleucina 2
kb	Quilobase
kDNA	DNA do cinetoplasto
kg	Quilograma
L1	<i>Long Interspersed (nuclear) Element</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LGT	<i>Lateral Gene Transfer</i>
LINE-1	<i>Long Interspersed (nuclear) Element</i>
LkDT	<i>Lateral kDNA Transfer</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
Mb	Megabases
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNAs	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nDNA	DNA de origem nuclear
ng	Nanograma

NH ₂	Amina
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
nr	<i>non-redundant</i>
nts	Nucleotídeos
Numts	<i>Nuclear Mitochondrial DNA</i>
O ₂	Oxigênio
OD	Densidade Óptica
OH ⁻	Hidroxila
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ORF2	<i>Open Reading Frame 2</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina-cianina 5
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
PEG	Poliétileno Glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
poli-A	Poli-adenina
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
R-NHOH	Radical Hidroxilamino
R-NO ₂ ⁻	Radical Nitro
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Tampão Salino Citrato de Sódio
SSPE	Tampão Salino Fosfato de Sódio - EDTA
T(S) ₂	Dissulfeto de Tripanotiona
T(SH) ₂	Tripanotiona
TAIL-PCR	<i>Thermal Asymmetric InterLaced PCR</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TCRβ	<i>T-Cell Receptor Beta</i>
TCRγδ	<i>T-Cell Receptor Gama-Delta</i>
TCRαβ	<i>T-Cell Receptor Alfa-Beta</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
Th1	<i>T helper - 1</i>

<i>tp</i> TAIL-PCR	<i>targeting primer Thermal Asymmetric Interlaced-PCR</i>
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade Internacional
USH1C	<i>Usher syndrome 1C</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v/v	Volume/volume
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
V β 1	Cadeia variante beta 1
V β 12	Cadeia variante beta 12
V β 5	Cadeia variante beta 5
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ Ci	Microcurie
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
μ g	Micrograma

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
ÍNDICE	17
INTRODUÇÃO	19
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	20
O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	22
<i>Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi</i>	22
<i>Organização Genômica</i>	24
O MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS	26
<i>Imunologia</i>	27
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	28
TRATAMENTO MULTIDROGAS DA DOENÇA DE CHAGAS.....	31
PATOGENESE DA DOENÇA DE CHAGAS	32
<i>Persistência do Parasito</i>	33
<i>Autoimunidade</i>	33
TRANSFERÊNCIA GÊNICA LATERAL (LGT)	34
<i>Transferência de DNA mitocondrial (Nuclear Mitochondrial DNA, Numts)</i>	36
TRANSFERÊNCIA LATERAL DE kDNA (LkDT)	37
JUSTIFICATIVA	39
OBJETIVO GERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIAIS E MÉTODOS	41
ANIMAIS EXPERIMENTAIS E INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i>	41
TRATAMENTO MULTIDROGAS.....	42
COLETA DE TECIDOS.....	43
EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	43
<i>TPTAIL-PCR</i>	43
<i>SOUTHERN BLOT</i>	45
SONDA DE DNA E MARCAÇÃO RADIOATIVA	45
HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA RADIOATIVA.....	46
CLONAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO	46
ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	47
HISTOPATOLOGIA.....	48

COLORAÇÃO HEMATOXILINA/EOSINA	48
IMMUNOHISTOQUÍMICA	49
ISOLAMENTO E CULTIVO DE CARDIOMIÓCITOS	49
ENRIQUECIMENTO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E T CD8 ⁺	50
COCULTIVO DE FIBRAS CARDÍACAS E LINFÓCITOS.....	51
IMMUNOFLUORESCÊNCIA.....	51
ANTICORPOS	52
ANÁLISES AO MICROSCÓPIO	53
RESULTADOS.....	54
EMPREGO DA <i>TPTAIL</i> -PCR PARA IDENTIFICAR MUTAÇÕES DE <i>KDNA</i> NO MODELO MURINO	56
OBTENÇÃO DE <i>PRIMERS</i> DE <i>LINE-1</i> MURINO	57
<i>Mapeamento das integrações de KDNA no genoma murino.....</i>	<i>61</i>
RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA POR MICROHOMOLOGIA RICA EM <i>A/C</i> INTERMEDEIA A INTEGRAÇÃO DO <i>KDNA</i> NO GENOMA MURINO.....	65
IDENTIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE CÉLULAS IMUNES QUE REJEITAM O CORAÇÃO NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL.....	68
EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	70
<i>Adesão de Linfócitos e Lise de Célula Cardíaca de Feto de Camundongo Isogênico Sadio.....</i>	<i>70</i>
DISCUSSÃO	73
PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXO I.....	106

INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Americana é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A zoonose é encontrada nas Américas entre os paralelos 42° N, na Califórnia, EUA, e 42° S, em Chubute, na Argentina. A complexa cadeia de fatores que promove a circulação do *T. cruzi* na natureza inclui cerca de 40 espécies de insetos-vetores (Hemiptera:Reduviid) e 180 espécies de mamíferos sabidamente permissivos às infecções pelo protozoário flagelado (Diotaiuti, 2009; Noireau e cols., 2009). Mas acredita-se que até 1150 espécies de mamíferos podem fazer parte dessa cadeia (Patterson, 1994). No início, as infecções enzoóticas teriam sido adquiridas pela via oral quando mamíferos onívoros ingeriam triatomíneos contaminados com o *T. cruzi*. Mas, à medida que muitos mamíferos tornaram-se infectados, sua transmissão pelos insetos hematófagos passou a ter papel preponderante na propagação da zoonose (Diotaiuti, 2009). Estima-se que essa via de transmissão tenha sido iniciada há cerca de 90 milhões de anos, quando os elementos que sustentam a cadeia de transmissão já estavam estabelecidos nos ecossistemas terrestres. Porém, foi a hematofagia dos triatomíneos que teria feito com que o parasito fosse adquirido durante ingestão de sangue mamíferos já infectados pelo *T. cruzi* (Teixeira e cols., 2006)

O homem teria entrado nesta cadeia de transmissão possivelmente há menos de 50 mil anos, como sugerem fósseis datados que indicam a presença de *Homo sapiens* no continente americano (Guidon e Delibrias, 1986; Bahn, 1993). No deserto de Atacama, foi encontrado cadáver de ameríndio, mumificado há nove mil anos, com evidência de cardiopatia similar à chagásica sugerida pela análise de DNA positiva para *T. cruzi* (Aufderheide e cols., 2004).

A doença de Chagas humana é endêmica na América Latina, mas sete casos autóctones de doença de Chagas foram encontrados nos Estados Unidos (Castro e cols., 2009; Bern e cols., 2011). Em aproximadamente um terço dos casos de infecções chagásicas registradas na população humana são detectadas as manifestações clínico-patológicas conhecidas como doença de Chagas (Prata, 2001).

No que diz respeito à endemia chagásica humana, as principais espécies de triatomíneos transmissores do *T. cruzi* são: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis*, e *Triatoma sordida* (Diotaiuti, 2009). Esses triatomíneos, contaminados durante o repasto de sangue em mamíferos infectados pelo *T. cruzi*, transmitem a infecção ao homem pela contaminação do sítio da picada com os dejetos contendo as formas metacíclicas do protozoário. A transmissão do *T. cruzi* também pode ocorrer pela ingestão acidental de alimentos contaminados, mas acredita-se que a transmissão pelos triatomíneos tem maior importância epidemiológica nas áreas endêmicas (Chagas, 1909a; b; Brasil, 2005a; b; Yoshida, 2009).

As infecções pelo *T. cruzi* também são transmitidas via placentária, da mãe chagásica para o filho, e pela transfusão de sangue de chagásico. Além disso, pode ocorrer transmissão do *T. cruzi* por transplante de órgãos e acidentalmente em laboratórios de pesquisa, bancos de sangue, e hospitais (Prata, 2001; Schmunis, 2007). A migração de chagásicos das regiões endêmicas para os cinco continentes têm feito com que as infecções pelo *T. cruzi* assumam grande interesse na saúde pública global (Castro e cols., 2009).

Aspectos Epidemiológicos

Dados do primeiro Inquérito Sorológico Nacional sobre a Doença de Chagas revelaram prevalência de anticorpos anti-*T. cruzi* em 6% da população do Brasil. Naquela época, a população brasileira era de 100 milhões de habitantes (Camargo e cols., 1984), e a população humana nos demais países da América Latina era cerca de 300 milhões. Então, estimou-se que o total de chagásicos era de 18 milhões. Considerando-se apenas a população de áreas endêmicas, onde havia transmissão ativa pelo *T. cruzi*, foi estimado que 100 milhões de pessoas estivessem sob risco de adquirirem as infecções pelo protozoário flagelado. Detalhes sobre essas estimativas são encontrados em publicações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002; 2007). Tendo em conta que as infecções agudas pelo *T. cruzi* geralmente são assintomáticas e que cerca um terço dos infectados falecem em consequência da doença de Chagas, geralmente três ou mais décadas depois da aquisição da infecção, é a

doença crônica que impõe ônus econômico e social aos países da região. O panorama existente hoje em dia não deve ser muito diferente daquele de 1985, exceto pelo aumento exponencial da população e pelo desalojamento do *T. infestans* domiciliado nas choupanas nos ecossistemas do cerrado e caatinga (WHO, 2002). Não obstante o perfil conhecido de morbidade-mortalidade, publicações recentes têm sugerido que existiriam apenas 7,7 milhões de pessoas com as infecções pelo *T. cruzi* (WHO, 2007). Essa discussão não é semântica e tem seu valor prático: As primeiras estimativas (WHO, 2002) eram de 21 mil mortes/ano em consequência da doença de Chagas, enquanto que as estimativas recentes são de 12,5 mil mortes/ano (WHO, 2007). Essa diferença de estimativa precisa ser analisada criticamente, pois, ainda que a transmissão vetorial tenha sido reduzida pelo desalojamento de uma das principais espécies (*T. infestans*) transmissora do *T. cruzi*, o curso natural da doença demanda, na maior parte dos casos, mais que apenas duas décadas, e só então seria possível registrar queda espetacular nos índices de morbidade e mortalidade pela doença de Chagas humana. Uma explicação lógica para tal disparidade pode ser devida ao desencontro entre os métodos de análises (WHO, 2002; 2007).

Por outro lado, não traz benefício à saúde pública as declarações de “território livre da transmissão da doença de Chagas pelo seu principal vetor peridomiciliar, o *Triatoma infestans*” (Schofield e cols., 2006; WHO, 2007). Mesmo porque, sem que seja possível evitar que os triatomíneos transponham fronteiras a partir do ecossistema vizinho, onde as várias espécies de triatomíneos continuam a vicejar, o conceito de território livre não tem base científica. Ainda, mesmo que se desaloje apenas uma espécie de triatomíneo ficam quarenta outras que transmitem o *T. cruzi*. E, por último, o desalojamento de uma espécie de triatomíneo domiciliado em uma região pode não ser suficiente para produzir efeito espetacular em outras regiões onde a mesma espécie mantém hábitos silvestres. As investigações precisam continuar, pois, sabe-se que o *T. infestans* e quarenta outras espécies de triatomíneos continuam a transmissão ativa do *T. cruzi*, sem limite preciso entre a cidade e o campo (Teixeira e cols., 2006).

Pela razão exposta, é aconselhável registrar que houve expressiva redução da transmissão das infecções pelo *T. infestans* naqueles ecossistemas

onde essa espécie era o principal vetor do *T. cruzi* nos domicílios. Talvez fosse justo lembrar que a dificuldade em processar dados oriundos de diferentes regiões seja devida ao emprego de diferentes metodologias, produzindo resultados heterogêneos que não satisfazem o entendimento da realidade presente, e que pode ser explicada pelo conhecimento científico disponível sobre a complexa cadeia de transmissão das infecções pelo *T. cruzi*, sua persistência ao longo da vida do hospedeiro e, principalmente, a história natural da doença que afeta uma parcela dos indivíduos infectados décadas depois da infecção inicial (WHO, 2007).

Diante dessas considerações, as estimativas de transmissão vetorial continuam inaceitavelmente altas no Brasil e demais países da América Latina. Ademais, a população brasileira duplicou nas últimas três décadas, mas não temos dados atualizados sobre o crescimento demográfico e sua influência sobre o total de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e doença de Chagas.

O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta família inclui o grupo de protozoários pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (*T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmanias* sp., entre outros), de grande importância para a medicina humana e veterinária (Teixeira e cols., 2006). As *Leishmanias* são encontradas nos vários continentes. O *T. brucei* é restrito ao continente Africano e o *T. cruzi* é encontrado comumente no continente Americano.

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui ciclo de vida que alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. A cadeia que sustenta a circulação do *T. cruzi* na natureza possui um riquíssimo nicho de hospedeiros, compreendendo várias classes de mamíferos com cerca de 180 espécies já identificadas, incluindo o homem (Noireau e cols., 2009). Os invertebrados são hospedeiros intermediários, enquanto que os répteis que podem albergar o *T. cruzi* em infecções crípticas (Ames e cols., 1954; Neves e De Castro, 1970). Com grande capacidade

adaptativa, verifica-se que o *T. cruzi* infecta e multiplica-se numa grande variedade de células nos tecidos de hospedeiros vertebrados (Diotaiuti, 2009; Teixeira e cols., 2011b). Evidências mostram que esse protozoário pode ter reprodução sexuada em certas ocasiões (Sturm e cols., 2003).

Existem quatro estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*: as formas amastigota e tripomastigota, encontradas nos hospedeiros vertebrados; e os epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos nos insetos vetores (Figura 1). Estes estágios diferem tanto em aspectos morfológicos quanto bioquímicos (Fernandes e Andrews, 2012).

Em resumo, o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas do *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado. No intestino médio, o protozoário se transforma em epimastigota e se divide. Posteriormente, ocorre migração para o intestino posterior onde há transformação em tripomastigota metacíclico. Durante novo repasto sanguíneo, as formas metacíclicas eliminadas nas fezes do inseto penetram pela abrasão feita na pele pela picada, ou podem contaminar as mucosas dos olhos e da boca. As formas tripomastigotas invadem células no local e, após ciclos de multiplicação intracelular, ganham a corrente circulatória e são levadas para outros tecidos no corpo. Quando no citosol da célula hospedeira, as tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas que dividem por fissão binária. Ao final de cerca de nove ciclos de replicação (Dvorak e Hyde, 1973), as amastigotas preenchem o citoplasma da célula hospedeira e voltam a se transformar em tripomastigotas, antes de serem liberadas. As tripomastigotas iniciam novos ciclos de infecção em outras células de vários tecidos do corpo. Ocasionalmente, podem ser sugadas pelo triatomíneo e transmitidas para o próximo hospedeiro (Teixeira e cols., 2011b).

No curso da infecção o *T. cruzi* interage com moléculas receptoras na superfície das células e estimula vias metabólicas dependentes de Ca^{2+} que produzem remodelamento do citoesqueleto celular e recrutamento com fusão de lisossomos no sítio de entrada na célula hospedeira (Tardieux e cols., 1994; Andrade e Andrews, 2004; Woolsey e Burleigh, 2004; Tyler e cols., 2005).

A indução da entrada do *T. cruzi* na célula acontece com o desenvolvimento de um vacúolo parasitóforo, formado pela invaginação da membrana plasmática fusionada com os lisossomos recrutados. O parasita

envolvido pela membrana vacuolar pode permanecer ali por longo tempo ou evadir-se para o citosol (Nogueira e Cohn, 1976; De Araujo-Jorge, 1989).

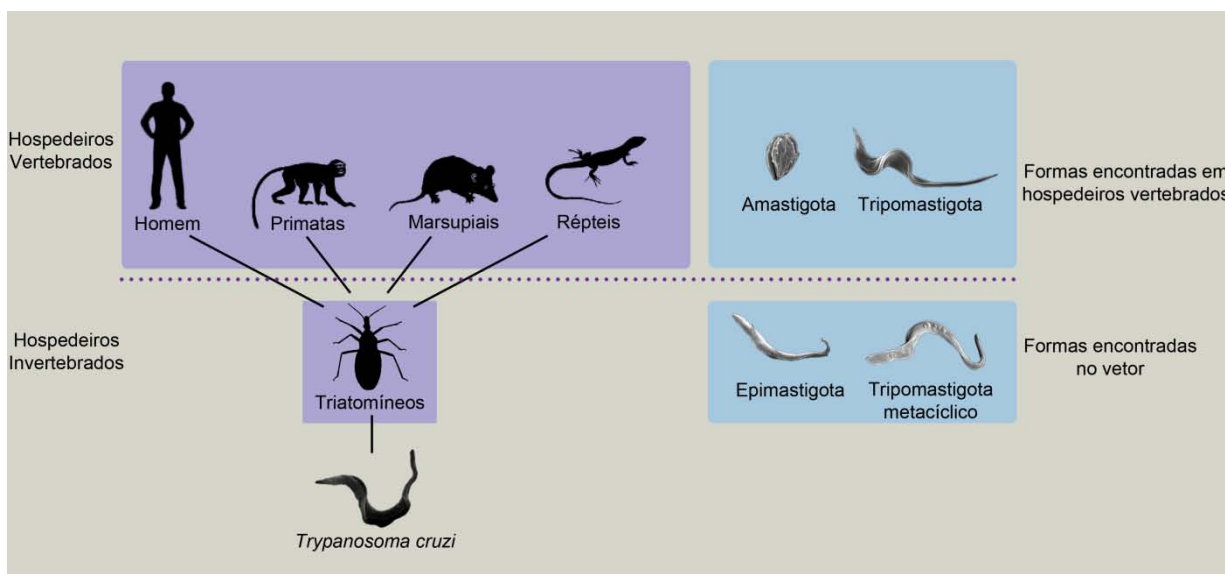


Figura 1. Principais hospedeiros vertebrados e invertebrados do *Trypanosoma cruzi* e formas encontradas em cada um deles.

Organização Genômica

O genoma do isolado CL Brener de *T. cruzi* já foi seqüenciado e é utilizado como referência (*RefSeq*). As espécimes de *T. cruzi* Esmeraldo e Sylvio X10/1 também foram seqüenciados e seus genomas estão parcialmente montados e disponibilizados (El-Sayed, 2005; NCBI, 2005).

Ainda que a montagem final (*assembly*) das sequências não esteja concluída, estima-se que os genomas dos diferentes espécimes exibem considerável diferença de tamanho: 55 Mb para CL Brener e 44 Mb para Sylvio X10/1 (El-Sayed, 2005; Franzen e cols., 2011). Variações no número de cromossomos foram documentadas e consideradas como resultantes de aneuploidias (Gibson e Miles, 1986; Vargas e cols., 2004; Weatherly e cols., 2009; Minning e cols., 2011).

Os tripanossomos, da Ordem cinetoplastida, têm como característica fundamental uma estrutura em forma de disco em sua única mitocôndria localizada numa região especializada, adjacente ao corpúsculo basal do flagelo. Esta organela, designada de cinetoplasto, é constituída por um intrincado arranjo de DNA, único entre os eucariotos (Figura 2), que concentra

entre 20 e 25% do conteúdo total de DNA da célula (Souza, 2003). A arquitetura singular de moléculas circulares de DNA do cinetoplasto (kDNA), composta por maxicírculos e minicírculos, está organizada em rede concatenada e altamente condensada (Simpson, 1973).

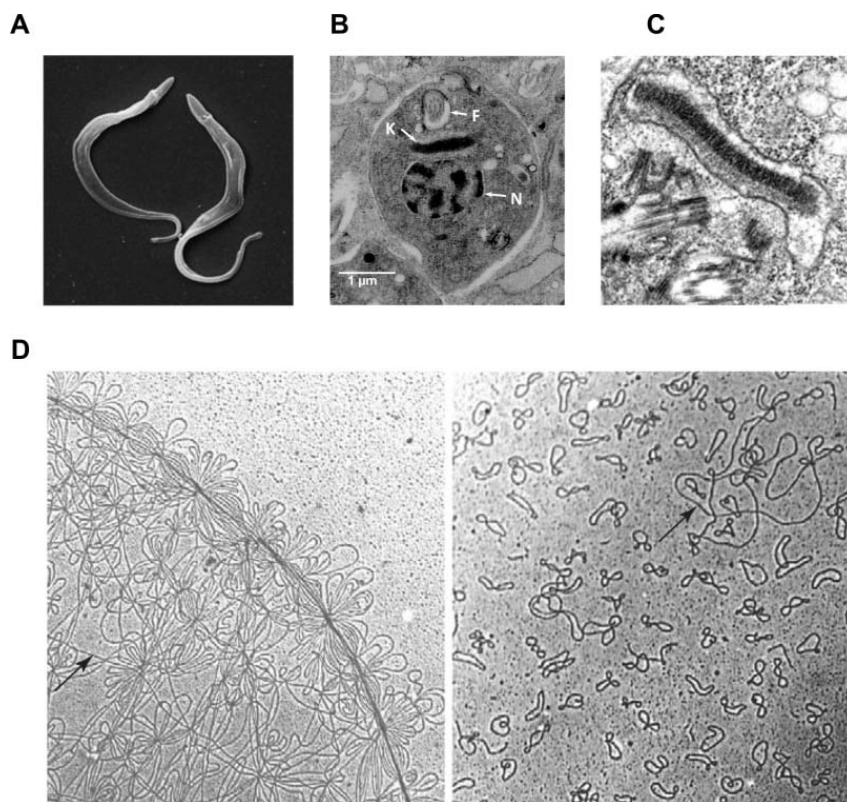


Figura 2. Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*. **A:** Microscopia de varredura de tripomastigotas de *T. cruzi* (Menna-Barreto e cols., 2009). **B:** Microscopia eletrônica de amastigota de *T. cruzi* dentro de uma célula muscular (Teixeira e cols., 2011b). **C:** Cinetoplasto e base do flagelo de uma forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* (Liu e cols., 2005). **D:** À esquerda - rede de kDNA de *Crithidia fasciculata* contendo maxicírculos (seta) e minicírculos. À direita - kDNA tratado com topoisomerase II (Liu e cols., 2005). K, cinetoplasto; N, núcleo; F, flagelo.

Os maxicírculos são macromoléculas com tamanho variando entre 21 a 39 kb, presentes em algumas dúzias de cópias por parasita (Westenberger e cols., 2006). Além disso, suas sequências apresentam consideráveis variações tanto entre diferentes espécies de tripanosomatídeos como entre cada linhagem (Westenberger e cols., 2006). De certa maneira, os maxicírculos

assemelham-se ao DNA mitocondrial convencional de mamíferos ou leveduras, possuindo sequências codificadoras para RNAs ribossômicos (rRNAs) e proteínas envolvidas na produção de energia pela mitocôndria (Leon e cols., 1980; Affranchino e cols., 1986; Torri e cols., 1996). A maioria dos transcritos dos maxicírculos passa por um processo especial de editoração de suas sequências, onde trechos variáveis de resíduos de uridina são inseridos ou retirados de sítios específicos (Shaw e cols., 1988; Blum e cols., 1991; Lukes e cols., 2002; Hajduk e Ochsenreiter, 2010).

Os minicírculos do *T. cruzi* existem em milhares de cópias que possuem aproximadamente de 1,4 kb de tamanho. Cada minicírculo tem quatro regiões com sequência conservada de 122 pb, intercaladas por quatro sequências variáveis de aproximadamente 238 pb. As regiões variáveis têm altíssima dissimilaridade num mesmo ou em minicírculos diferentes. Cada região variável transcreve, potencialmente, uma molécula de RNA guia (gRNA). Esses gRNAs estão envolvidos na editoração dos mRNAs dos maxicírculos, única função conhecida dos minicírculos (Lukes e cols., 2002).

O Modelo Murino da Doença de Chagas

O curso da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos varia de acordo com fatores genéticos do parasito e do hospedeiro. A infecção aguda produz intensa parasitemia que pode, em alguns casos, levar à morte nas primeiras semanas pós-infecção. A parasitemia cede e a infecção subclínica, na ausência de sintomas, significa que poucos ninhos de amastigotas podem ser encontrados na musculatura cardíaca, esquelética e em outros tecidos. (Brenner, 1973). Talvez, a falta de sistematização na condução dos experimentos explique a enorme discrepância nos achados clínicos e histopatológicos relatados no modelo murino. Mas, em geral, a infecção do *T. cruzi* em camundongos produz pico de parasitemia entre o 9º e o 45º dia pós-infecção (Olivieri e cols., 2005; Sá, 2008; Medeiros e cols., 2009). À medida que a infecção crônica, registram-se casos de cardiomiopatia chagásica com infiltrados de células mononucleares do sistema imune e dano tecidual. No curso da infecção crônica registram-se os efeitos da cardiomiopatia chagásica: focos inflamatórios confluentes; dano tecidual e preenchimento de áreas

danificadas por tecido fibroso. Este progressivo acometimento do coração é tido como o principal fator debilitante da doença crônica e responsável pela insuficiência cardíaca. (Dos Santos e cols., 2001)

Imunologia

Após a infecção, o grande número de parasitas encontrados no sangue é logo controlado por mediadores microbicidas produzidos por macrófagos e células *natural killer*. O reconhecimento de âncoras de glicofosfatidilinositol e de DNA do parasito, pelos TLR 2 e 9, ativa vias dependentes de MyD88 e TRIF que propiciam a montagem de uma resposta pró-inflamatória contra o *T. cruzi* que controla a infecção inicial (Campos e cols., 2004; Bafica e cols., 2006)

A imunodominância de certo repertório de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Martin e cols., 2006) é importante na redução do número de parasitas, mas também contribui para a persistência do *T. cruzi* que também se utiliza de diversos mecanismos para se evadir do sistema imune do hospedeiro (Argibay e cols., 2002; Alcaide e cols.; 2004; DaMatta, 2007).

Recentemente, foi sugerido que o *T. cruzi* induz células sanguíneas a aumentar a produção de microvesículas que se ligam a C3 convertase, inibindo a opsonização, a lise deste parasito e formação das anafilotoxinas C3a e C5a (Cestari e cols., 2012).

O papel da autoimunidade, mediada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, na iniciação e progressão das lesões ao coração tem sido documentado por muitos autores (Dos Santos e cols., 2001; Tekiel e cols., 2005; Bixby e Tarleton, 2008). Já foi relatada maior predominância de linfócitos T CD8⁺ que T CD4⁺ nos focos inflamatórios cardíacos na fase crônica. A distribuição dos linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺ no miocárdio reflete um perfil de expressão CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} presente em linfócitos periféricos. As moléculas de adesão expressas pelo endotélio vascular e pelo miocárdio contribuem para a entrada e manutenção destas células no tecido inflamado. Estes linfócitos têm padrão de produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias Th1, em especial de IFN-γ. A lesão tecidual pode ser observada tanto em áreas contendo antígenos de *T. cruzi* como também livre deles (Dos Santos e cols., 2001).

Em camundongos, ocorre uma redução no número absoluto de moléculas de TCR $\alpha\beta$, CD8 e CD3 em linfócitos T CD8⁺ parasito-específicos presentes no baço e sangue periférico de camundongos chagásicos crônicos (Grisotto e cols., 2001). Essas células não apresentam perfil de marcadores de ativação, não secretam citocinas espontaneamente e se comportam como células de memória quando estimuladas por antígenos de *T. cruzi* ligadas a células apresentadoras de antígenos, APCs (Grisotto e cols., 2001; Bixby e Tarleton, 2008). Em contraste, as células de memória T CD8⁺ produtoras de IFN- γ têm sido relacionadas às formas clínicas severas da doença de Chagas em pacientes crônicos (Fiuza e cols., 2009).

Já foi relatada expansão preferencial de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺ periféricos com cadeias V β 5 e V β 12 de TCR em camundongos chagásicos crônicos C57BL/6 e BALB/c (Leite-De-Moraes e cols., 1994; Mendes-Da-Cruz e cols., 2003).

Tratamento da Doença de Chagas

Até o início da década de 60, ao menos 27 compostos e 30 antibióticos conhecidos já haviam sido experimentados como agentes químico terapêuticos contra o *T. cruzi* (Brener, 1968). Dentre as compostos que demonstraram ação sobre a parasitemia se destacou a pesquisa com os nitrofuranos e, mais tarde, com as nitrofurazonas. Experimentos em camundongos utilizando a nitrofurazona 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Furacin), administrada oralmente por 53 dias, promoveram suposta cura em 62 dos 65 animais tratados (95,4%). Todavia, a administração dessa droga em pacientes chagásicos foi acompanhada de severos efeitos adversos, que obrigaram a interrupção do seu uso na terapia clínica (Coura e cols., 1961; Coura e cols., 1962; Cançado e cols., 1964).

No início da década de 70 surgiram dois novos compostos com potente atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*. O nifurtimox, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, foi comercializado pelos laboratórios Bayer sob o nome comercial de Lampit[®]. O benzonidazol, N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida, foi fabricado e comercializado pela Roche como Rochagan[®] (Figura 3).

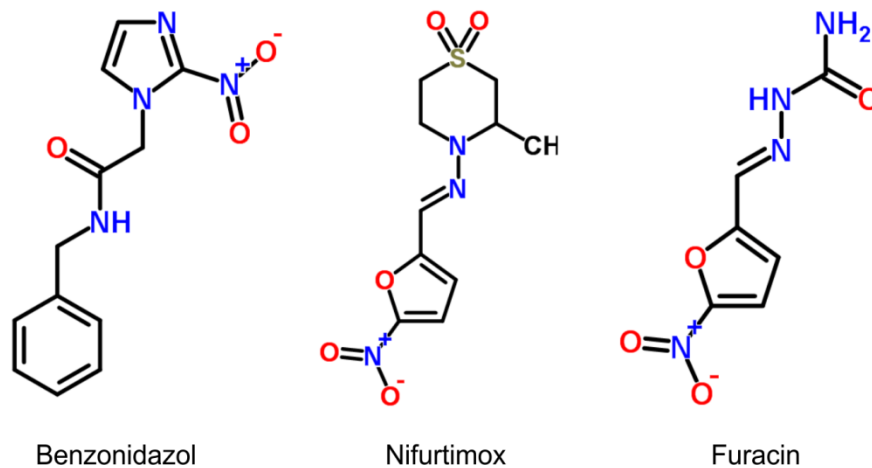


Figura 3. Estrutura molecular dos principais medicamentos já utilizados contra a doença de Chagas. Imagens obtidas no ChemSpider (www.chemspider.com).

Apesar de reduzirem a parasitemia na fase aguda, esses medicamentos não possuem eficácia sobre a fase crônica da doença. A progressão das lesões encontradas no coração dos chagásicos não é alterada com o uso deste medicamento (Lauria-Pires e cols., 2000; Caldas e cols., 2008; Santos e cols., 2012).

O *T. cruzi* é um organismo deficiente em certas vias de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e tanto o benzonidazol como o nifurtimox atuam supostamente pela formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. Sob ação de diversas nitroredutases, o radical nitro NO_2 é reduzido a radical amino NH_2 . A reação é inicialmente catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase (EC 1.6.2.4) que forma o intermediário com radical nitro (R-NO_2^\cdot) e formação de hidroxilamina (R-NHOH). No nifurtimox, o oxigênio é reduzido e forma o íon superóxido O^{2-} . Esse íon pode ser captado pela superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) e gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Hidroxila (OH^\cdot) formada na presença de íons Fe^{3+} é o principal radical livre que promove o efeito tripanocida por ligação aos lipídeos, proteínas e ao DNA. No caso do benzonidazol, o radical nitro NO_2^\cdot se liga covalentemente às macromoléculas do tripanosomatídeo, independente da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mason e Holtzman, 1975; Docampo e cols., 1981a; Docampo e cols., 1981b; Docampo e cols., 1981c; Moreno e cols., 1982; Docampo e

Moreno, 1984; Diaz De Toranzo e cols., 1988; Temperton e cols., 1998; Romanha e cols., 2002; Maya e cols., 2003; Maya e cols., 2007).

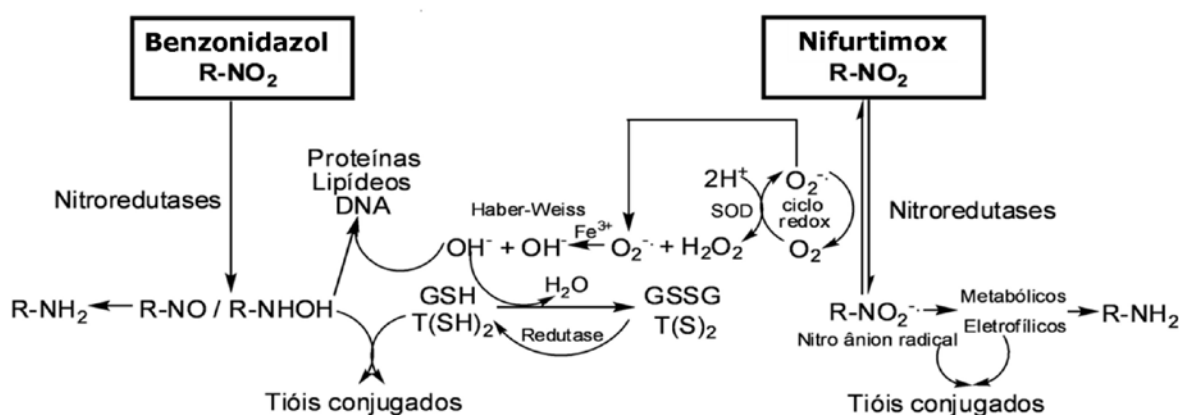


Figura 4. Mecanismo de ação de benzonidazol e nifurtimox e vias de detoxificação do *Trypanosoma cruzi*. GSH, glutationa; T(SH)₂, tripanotiona; GSSG, dissulfeto de glutationa; T(S)₂, dissulfeto de tripanotiona [reproduzido de (Dias e cols., 2009)].

A baixa seletividade de vias bioquímicas destes medicamentos acaba afetando também o paciente que recebe o tratamento (Docampo, 1990; Irigoien e cols., 2008). Entre os efeitos adversos do benzonidazol existem as reações de hipersensibilidade como dermatites, erupções cutâneas, edemas e dores articulares e musculares; alterações hematológicas graves como neutropenia, agranulocitose, púrpura trombocitopênica e até mesmo depressão da medula óssea; e danos neurológicos periféricos, polineuropatias como parestesias, polineurite e até convulsões (Coura e De Castro, 2002).

Em decorrência da produção de radicais livres e metabólitos reativos sobre o DNA, o benzonidazol possui atividades mutagênicas comprovadas (Walton e Workman, 1987; Walton e cols., 1989). Além disso, há vários relatos sobre aparecimento de tumores malignos em cobaias tratadas com benzonidazol (Ferreira e cols., 1988; Teixeira e cols., 1990a; Teixeira e cols., 1990c; Santos e cols., 1994).

A administração de benzonidazol em chagásicos submetidos a transplante de coração coincide com maior incidência de neoplasia maligna (Bocchi e cols., 1998). Em adição aos efeitos mutagênicos, o benzonidazol também tem efeito imunossupressor que facilita o desenvolvimento de tumores,

especialmente quando combinado com outros imunossupressores como a ciclosporina (Andrade e cols., 2003).

A partir dos anos 80 o Nifurtimox teve sua comercialização descontinuada no Brasil e em outros países da América Latina. Mas, o benzonidazol ainda é indicado no tratamento da doença de Chagas ([Brazilian Consensus on Chagas disease], 2005). Tudo isso parece ser uma contingência do exíguo mercado de consumidores que não justifica investimento da indústria farmacêutica para sintetizar novas drogas para tratar a doença de Chagas. Já se faz mais de 100 anos desde a descoberta da doença por Carlos Chagas e ainda não há um único medicamento seguro e eficaz para o tratamento deste mal.

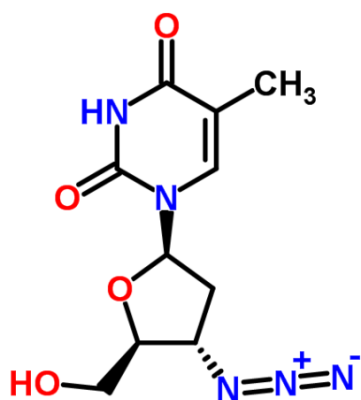
Tratamento Multidrogas da Doença de Chagas

No nosso Laboratório, verificou-se que a digestão de DNA de macrófagos murinos infectados com *T. cruzi* com a enzima Nsil gera fragmentos de 0,36; 1,2; 1,8 e 2,2 kb que hibridizam com sonda radioativa de região conservada de kDNA de *T. cruzi*. A banda de menor tamanho corresponde ao trecho do minicírculo clivado quatro vezes. Já as bandas de maior tamanho servem de indicativo de evento de integração de kDNA no genoma dos macrófagos (Simoies-Barbosa e cols., 2006). Entretanto, o tratamento destes macrófagos com ciprofloxacina, inibidor de topoisomerase II, preveniu a formação das bandas de 1,2; 1,8 e 2,2 kb após a infecção. A modificação do padrão de bandas no DNA do hospedeiro clivado pela Nsil sugeriu que o inibidor de topoisomerase II preveniu a transferência do kDNA exógeno para a célula hospedeira (Rosa, 2005).

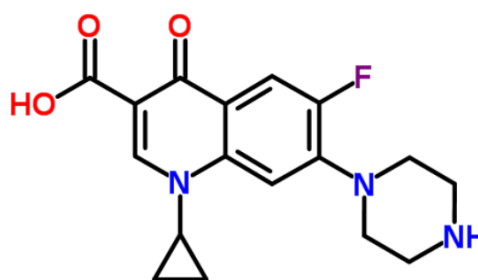
A ciprofloxacina (1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazino-1-yl-quinolina-3-ácido carboxílico) é um derivado carboxiquinoléico fluorinado com amplo espectro como bactericida, tendo seu principal uso no tratamento de infecções sistêmicas e do trato urinário. Como inibidor da topoisomerase II previne a replicação do DNA em procariotos. O mesmo efeito também pode ser observado em tripanosomatídeos tratados com ciprofloxacina (Rosa, 2005). A topoisomerase II é muito importante na regulação da estrutura do DNA do cinetoplasto, onde a reorganização da armação concatenada de minicírculos e

maxicirculos é fundamental nos processos transcricionais e replicativos. A ação do fármaco sobre a enzima produz considerável redução no crescimento do *T. cruzi* (Zuma e cols., 2011).

Ana de Cássia Rosa (2005), também mostrou que o tratamento do *T. cruzi* com Zidovudina, antes da infecção da célula hospedeira, impede a transferência lateral de kDNA para os macrófagos *in vitro*. A zidovudina (3'-Azido-2',3'-dideoxi-3,4-diidrotimidina), ou AZT, é um análogo nucleosídeo da timidina e um dos primeiros medicamentos utilizados na terapia antiretroviral em pacientes com HIV. Este fármaco sofre sucessivas fosforilações dentro da célula e compete com a timidina trifosfato na incorporação das cadeias crescentes de DNA complementar produzidas pela transcriptase reversa viral (Langtry e Campoli-Richards, 1989). Por este mecanismo de ação, a zidovudina inibe, também, a retrotransposição de LINE-1 em células humanas (Jones e cols., 2008).



Zidovudine



Ciprofloxacin

Figura 5. Estrutura molecular da zidovudina e do ciprofloxacina.
Imagens obtidas no Chempider (www.chemspider.com).

Patogênese da Doença de Chagas

O achado histopatológico característico da doença de Chagas (Rossi, 1995; Teixeira e cols., 2009; Teixeira e cols., 2011b) é uma miocardite difusa, com infiltrado de células inflamatórias mononucleares, miocitólise e fibrose. Tal achado é verificado na cardiomiopatia e nos megas chagásicos. Então, existem duas teorias que tentam explicar os mecanismos relacionados com a origem

das lesões na doença de Chagas. Essas teorias são discutidas, brevemente, a seguir.

Persistência do Parasito

Esta teoria sugere que a divisão das formas amastigotas intracelulares produziria a ruptura mecânica da célula hospedeira e que a inflamação subsequente é importante para a limpeza dos resíduos do parasito e do tecido destruído pelo *T. cruzi*. Desta maneira, as células do sistema de defesa que se infiltram no coração seriam importantes para o controle da infecção local e reabsorção de material liberado pelas células rompidas (Vianna, 1911; Torres, 1930; Higuchi Mde e cols., 2003).

O encontro de ninhos do *T. cruzi* em células de vários tecidos do corpo na fase aguda da infecção, ainda que o indivíduo não tenha doença clínica detectável, e em cerca de 10% dos casos crônicos da doença de Chagas, faz com que se considere que o parasito seja a causa da destruição dos tecidos.

A dificuldade com essa teoria está na falta de correlação entre parasitismo e doença, pois os pacientes geralmente não morrem de infecção aguda quando o parasitismo é mais intenso. Entretanto, a doença de Chagas crônica mata quando a infecção torna-se críptica, três ou mais décadas após a aquisição do *T. cruzi*. Outra inconsistência é a ausência do parasito nos sítios das lesões e regiões circunvizinhas. Por isso, a teoria da persistência do parasito tem sofrido críticas (Teixeira e cols., 2006; Teixeira e cols., 2011b).

Autoimunidade

A teoria autoimune sugere que a patogênese da doença de Chagas está relacionada com a rejeição das células do coração ou de outros tecidos do corpo pelo próprio sistema de defesa. Desta forma, células efectoras podem destruir as fibras cardíacas e neurônios sem que estejam parasitados (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Cunha-Neto e cols., 1996; Teixeira e cols., 2011a). Na tentativa de explicar a rejeição da célula cardíaca pelas células do sistema imune, foi sugerido que haveria "mimetismo" molecular entre proteínas (antígenos) do parasito e do hospedeiro. Foram relatadas semelhanças estruturais entre epítomos de proteínas de *T. cruzi* e proteínas do hospedeiro. O

"mimetismo" entre essas moléculas induziria o reconhecimento cruzado desses antígenos com as células imunes do próprio hospedeiro, e rejeição do coração na fase crônica da doença (Cerban e cols., 1994; Cunha-Neto e cols., 1996; Girones e cols., 2001; Leon e cols., 2001; Leon e cols., 2004).

Diversos modelos experimentais de doenças auto-imunes (encefalomielite autoimune, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes) muitas vezes se utilizam de animais transgênicos para avaliar características da patogênese. Em boa parte dos casos, esses animais são detentores de alelos codificadores para certas regiões específicas de moléculas de receptor de linfócito T (TCR), ou ainda com outras estruturas peculiares que intermedeiam a reação autoimune (Berlo e cols., 2006; Krishnamoorthy e cols., 2009; Stojakovic e cols., 2010).

O estudo em animais com diferentes *background* genéticos permite a observar vários aspectos da doença humana. Por exemplo, tem sido observado que alterações do sistema imune em animais geneticamente modificados fazem-nos adequados para reagir contra alguns imunógenos, evidenciando a patologia resultante de resposta celular usualmente envolvendo clones de linfócitos T citotóxicos. Porém, a realidade encontrada na clínica tem suas nuances peculiares que, às vezes, podem destoar dos resultados obtidos experimentalmente em animais de laboratório. Por este motivo, as extrapolações devem ser feitas com cautela, no sentido de se evitar os vieses que dificultam a compreensão sobre mecanismos de indução das doenças autoimunes.

Transferência Gênica Lateral (LGT)

A transferência gênica lateral consiste na transferência de material genético entre indivíduos de espécies evolutivamente distantes e que podem ser transmitidos para as progênes pela reprodução sexuada. O material genético transferido é comumente o DNA, mas fortes evidências também indicam a possibilidade de transferência de RNA (Liu e cols., 2010; Routh e cols., 2012).

Os primeiros indícios de LGT surgiram com os experimentos de transformação de uma cepa rugosa de *Streptococcus pneumoniae* em outra

com morfologia e virulência distintas (Griffith, 1928). Este achado foi inicialmente considerado mera contaminação ou falta de controles adequados (Downie, 1972). Porém, outros experimentos demonstraram a possibilidade de trocas genéticas pelo contato direto entre duas células, e o fenômeno descrito em *Escherichia coli* foi designado conjugação, (Lederberg e Tatum, 1946). Mais tarde, o grupo de Lederberg mostrou que a transmissão de DNA pode ser realizada por um intermediário viral, independente do contato físico entre as duas células, fenômeno designado transdução (Lederberg e cols., 1951). Foram descritos os sistemas de transdução por fagos λ , e o fator de fertilidade (F) (Lederberg e cols., 1952; Morse e cols., 1956). Assim, foram iniciados os primeiros estudos a respeito da rápida aquisição de resistência de bactérias aos antibióticos. Esses estudos levaram ao achado de LGT entre espécies de *Shigella* e foi descrita a transferência de genes de resistência para outras linhagens de bactérias, inclusive em *E. coli* (Ochia e cols., 1959). Mais tarde, foi descrita a integração de DNA no gene *gal* de *E. coli*, quando se reconheceu um efeito dos elementos de inserção (Shapiro, 1969). A presença desses elementos em plasmídeos conjugativos, tais como genes de resistência a antibióticos foram amplamente relatados (Hedges e Jacob, 1974; Crisona e Clark, 1977; Herrmann e cols., 1978).

As evidências acumuladas ao longo de décadas fundamentaram a hipótese de que a transferência lateral de genes seria um fenômeno de grande importância biológica associada com a história da evolução de espécies (Syvanen, 1985).

De fato, uma grande quantidade de estudos identificou eventos de LGT entre procariotos. Em contraste, a ausência de informação sobre LGT em eucariotos, poderia ser devida à escassez de dados sobre esses genomas. Outra explicação para a falta de documentação sobre LGT, talvez, seja encontrada na dificuldade de instrumentação científica adequada para identificar o DNA que, putativamente, estaria sendo transferido para outra espécie e, mais especificamente, aonde o elemento exógeno se insere no genoma hospedeiro. Certamente, deve ser muito difícil documentar eventos de LGT sem qualquer informação prévia para servir de guia ao pesquisador, talvez, como se procurasse um chapéu preto na escuridão total. Ainda, deve-se considerar que existe resistência de setores da sociedade em aceitar a

existência de trocas genéticas entre eucariotos. (Stanhope e cols., 2001; Andersson, 2005).

Transferência de DNA mitocondrial (Nuclear Mitochondrial DNA, *Numts*)

A LGT em eucariotos geralmente ocorre de duas maneiras: **a)** migração de material genético de organelas de possível origem endossimbiótica, *numts* ("new-mights") em mitocôndria e *nupts* ("new-peats") em plastídios, para o núcleo (Timmis e cols., 2004; Hazkani-Covo e cols., 2010); **b)** transferência de DNA entre espécies filogeneticamente distantes.

Atualmente, fragmentos de DNA de organelas já são reconhecidos como um achado comum em cromossomos de eucariotos. Os *numts* referem-se aos fragmentos de DNA de origem mitocondrial inseridos no genoma nuclear da célula eucariótica. Estudos indicaram que o genoma humano possui pelo menos 296 *numts*, com tamanhos entre 106 pb e 14.654 pb, representativos de quase toda uma alça do genoma mitocondrial (mtDNA) (Mourier e cols., 2001). Outros estudos mostram 612 inserções de mtDNA no genoma humano (Tourmen e cols., 2002). Essas diferenças podem ser resultantes de diferentes critérios empregados para identificação dos *numts*, mas, ainda assim, os dados refletem a magnitude do conteúdo genético que uma célula eucarionte pode adquirir pela endossimbiose ao longo de éons.

Apesar do caráter aparentemente neutro destas inserções, já foram identificados cinco *numts* causadores de doenças genéticas em humanos. Em um indivíduo foi encontrado *numt* de 251 pb inserido num sítio de *splicing* do gene do Fator VII o qual foi relacionado com defeito na cascata de coagulação do sangue (Borensztajn e cols., 2002). Em outro caso, identificou-se uma inserção de 36 pb no exon 9 do gene USH1C, associado com a síndrome de Usher tipo IC (Ahmed e cols., 2002).

Por outro lado, alguns *numts* também já foram confundidos com sequências defectivas do genoma mitocondrial (Thangaraj e cols., 2003; Yao e cols., 2008). Tais achados precisam ser considerados ao longo de estudos filogenéticos e diagnóstico molecular. O mtDNA, frequentemente utilizado como marcador molecular, já foi considerado inadequado em alguns tipos de estudos

filogenéticos em primatas, devido a presença desses pseudogenes nucleares de origem mitocondrial (Van Der Kuyl e cols., 1995; Thalmann e cols., 2004).

Transferência Lateral de kDNA (LkDT)

A transferência gênica lateral de kDNA (LkDT) envolve a integração de minicírculos de DNA do cinetoplasto do parasito no genoma da célula hospedeira. LkDT tem sido documentada em mamíferos e aves, nos quais fragmentos de sequências de minicírculos de kDNA integram em sítios de diversos cromossomos (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a). Postula-se que as mutações insercionais de kDNA geram alterações genotípicas que devem estar diretamente relacionadas com a proliferação clonal de linfócitos citotóxicos encontrados nas injúrias teciduais e com o aparecimento subsequente de sintomas clínicos e da patologia na doença de Chagas (Teixeira e cols., 2011a; Teixeira e cols., 2011b).

Aqui, o problema que parece mais sensível à crítica diz respeito aos papéis desempenhados, independentemente, pela persistência do parasito e pela auto-imunidade na patogênese da doença de Chagas. Para resolver o impasse e definir claramente o papel da auto-imunidade foi necessário reproduzir a doença de Chagas num modelo experimental “limpo”. As aves são refratárias à infecção pelo *T. cruzi*, e, por isso, o emprego desse modelo poderia eliminar a persistência do parasito como fator contribuinte para a patogênese da doença de Chagas. Estudos prévios em nosso laboratório mostram que é possível estabelecer a infecção no ovo fértil durante a primeira semana de desenvolvimento do embrião, antes do amadurecimento do sistema imune da ave. Mas, a partir da segunda semana, a resposta imune inata do embrião erradica o *T. cruzi*; e o pintinho que eclode sem a infecção fica apenas com o kDNA retido no corpo. Este modelo “limpo” pode ser usado para excluir o papel do parasito na gênese da auto-imunidade da doença de Chagas. (Teixeira e cols., 2011a).

As formas amastigotas do *T. cruzi* multiplicam nas células do embrião até que são eliminadas pela imunidade inata a partir do fim da primeira semana de infecção. De grande interesse é a tolerância imunológica na ave que nasce sem capacidade de formar anticorpos contra antígenos do *T. cruzi*. Devido ao

estado de tolerância imunológica encontrado nos pintos nascidos de ovos inoculados com *T. cruzi*, as integrações de kDNA que formam novas ORFs putativas, potencialmente codificadoras de novas proteínas, não induzem resposta imune específica contra esses neo-antígenos. Esta é a explicação para a ausência de resposta imune produtora de anticorpos anti-*T. cruzi* nessas aves tolerizadas pela infecção intra-ovo (Teixeira e cols., 2011a; Teixeira e cols., 2011b). A diferença básica entre experimento convencional de doença auto-imune e o modelo trans-filo que desenvolve cardiomiopatia chagásica em *Gallus gallus* com mutação de kDNA é a ausência de antígeno. De fato, as aves nascidas de ovos infectados com *T. cruzi* desenvolvem a patologia na ausência de antígeno do parasita. O fenômeno de tolerância imunológica a auto-antígeno surge quando a infecção ocorre antes do desenvolvimento do sistema imune (Billingham e cols., 1953). Sir McFarlane Burnet também teorizou sobre o papel de mutações na gênese de doença auto-imune em animais tolerizados (Burnet, 1972).

Os pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas notaram que o tratamento de coelhos com nitroderivado anti-*T. cruzi*, nos quais a parasitemia desaparecia, desenvolviam lesões ativas no coração similares às aquelas documentadas nos grupos de coelhos infectados, porém, não-tratados com a droga. Diante deste fato, os pesquisadores postularam que se o DNA do parasito ficasse retido no genoma dos coelhos, então, haveria a possibilidade de que as mutações poderiam desencadear a rejeição autoimune nos animais chagásicos (Nitz e cols., 2004). Em seguida os pesquisadores produziram cardiopatia em aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, que retinham apenas as mutações de kDNA no genoma (Teixeira e cols., 2011a). Apenas as alterações genética (mutações de kDNA), na ausência de infecção, dão origem à cardiopatia auto-imune.

A hipótese original de LkDT teve origem em observação sobre experimentos conduzidos em animais tratados com droga anti-*T. cruzi*, mas muitos autores sugerem que o tratamento com nitroderivados “cura” a doença de Chagas (Andrade e cols., 1991; Dutra e cols., 1996; Bahia-Oliveira e cols., 2000; Romanha e cols., 2002; Bustamante e cols., 2008). Os achados desses autores, que obtiveram cura da infecção chagásica pelo tratamento com benzonidazol contrastam com aqueles de outros autores que mostram o

tratamento com nitroderivados é insatisfatório, visto que não elimina a infecção chagásica (Lauria-Pires e cols., 2000; Caldas e cols., 2008; Santos e cols., 2012). Devido a grande importância prática envolvida nessa questão, esse contraditório precisa ser investigado por dois motivos principais: *i*) a cura da doença de Chagas é o objetivo primordial da ciência nessa área de investigação; *ii*) Se a cura é alcançada pelo tratamento com nitroderivado, então a hipótese de autoimunidade pode ser descartada.

No sentido de esclarecer esses dois motivos principais e esclarecer a informação discrepante na literatura científica referente à cura da infecção chagásica em animais tratados com nitro-derivados, decidimos fazer o tratamento com nitroderivados, utilizando vários esquemas terapêuticos, talvez, visando à falseabilidade (Kuhn, 1962; Popper, 1963; Chalmers, 1976) da teoria da autoimunidade sugerida nos experimentos relatados nos parágrafos anteriores. Essa decisão tem a finalidade de avaliar se a teoria que propõe a doença de Chagas tem origem genética (mutações de kDNA e modificações genotípicas). Nesse sentido, a proposta também deverá investigar se inibidores da topoisomerase II e da transcriptase reversa, que impede a integração do kDNA do *T. cruzi* em macrófagos humanos *in vitro* (Rosa, 2005), são eficazes *in vivo*.

Em resumo, visando a negar que a doença de Chagas tem origem genética, foram elaborados esquemas de tratamento multidrogas da infecção pelo *T. cruzi* em murino. A demonstração da eficácia do esquema terapêutico multidrogas excluiria a hipótese de transferência lateral de DNA do *T. cruzi* para o hospedeiro que fora enunciada depois que o tratamento de coelhos chagásicos com nitroderivados não impediu as lesões ativas da cardiomiopatia chagásica (Teixeira e cols., 1990a; Teixeira e cols., 1990b; Teixeira e cols., 1990c).

JUSTIFICATIVA

Como relatado anteriormente, já foi demonstrada a transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma da célula hospedeira durante o curso natural da infecção em diversos animais vertebrados, e, também, no

homem (Teixeira e cols., 1991; Teixeira e cols., 1994; Simoes-Barbosa e cols., 1999; Nitz e cols., 2004; Simoes-Barbosa e cols., 2006; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a; Teixeira e cols., 2011b). Verificou-se que, em mamíferos, as sequências integram frequentemente em elementos retrotransponíveis LINE-1 ou L1 (Nitz e cols., 2004; Simoes-Barbosa e cols., 2006; Hecht e cols., 2010). Em aves com mutações de kDNA no genoma, documentou-se uma cardiomiopatia inflamatória semelhante àquela da doença de Chagas humana, na ausência de parasitismo (Teixeira e cols., 2011a).

Entretanto, a literatura científica ainda registra que o tratamento da doença de Chagas experimental e humana com nitroderivado tripanocida reduz a parasitemia e diminui a mortalidade (Romanha e cols., 2002; Olivieri e cols., 2005; Bustamante e cols., 2008). Essas diferenças precisam ser esclarecidas, pois não é aceitável impedir que chagásicos sintomáticos tenham esperança de obter tratamento eficaz. Mas, por outro lado, sabe-se que a droga tem efeitos adversos severos, entre os quais se citam mutagenicidade, cancerogenicidade além de comprovados efeitos sobre o sistema reprodutor e teratogenicidade em animais experimentais (Favaretto e cols., 1990; Castro e cols., 2006). Se, por um lado, a eficácia do tratamento é questionada e, por outro, a droga tem efeitos tóxicos severos, há necessidade de a pesquisa científica negar o tratamento ou confirmá-lo. O esclarecimento desta questão entra no capítulo da obrigação ética do pesquisador.

OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desta Tese é investigar se há integrações de minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* no genoma de camundongos BALB/c infectados e tratados com diferentes esquemas multidrogas, e se os animais tratados apresentam lesões com as mesmas características daquelas documentadas nos chagásicos não-tratados.

Objetivos Específicos

- Identificar os sítios de integração e caracterizar as possíveis sequências quimeras de minicírculos de kDNA-DNA murino;
- Avaliar possíveis variações no padrão das integrações de kDNA identificados no genoma de indivíduos, tratados e não-tratados com esquemas terapêuticos multidrogas;
- Identificar fenótipos celulares presentes no infiltrado inflamatório cardíaco em camundongos chagásicos BALB/c;
- Isolar os linfócitos com fenótipos presentes no infiltrado e mostrar o seu efeito citotóxico sobre fibras cardíacas embrionárias singênicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de tecidos e de DNA utilizadas nos experimentos descritos nesta tese foram obtidas por Adriana Alves de Sá (Sá, 2008).

Animais experimentais e infecção com *T. cruzi*

Foram utilizados camundongos BALB/c com 6 a 8 semanas de idade e peso médio variando entre 20 a 25 g. Formas tripomastigotas virulentas do *Trypanosoma cruzi* Berenice foram colhidas do sobrenadante de cultura da linhagem L6 de célula muscular esquelética de *Rattus norvegicus*. Os parasitos

foram contados em câmara de Neubauer e fez-se diluição com DMEM para concentração de 5×10^4 tripomastigotas/ml. Dessa maneira, foram inoculados por via intraperitoneal 10^4 parasitas em 0,2 ml de DMEM com o auxílio de seringas descartáveis de 1 ml, 13 x 0,45 mm, 26 G $\frac{1}{2}$ (BD Biosciences).

Tratamento Multidrogas

As drogas foram escolhidas de acordo com atividades sobre vias metabólicas conhecidas que afetam a multiplicação e a viabilidade do *T. cruzi* e da célula hospedeira *in vitro*, conforme descrito por Rosa, 2005.

A administração de cada regime terapêutico foi iniciada no 5º dia após a infecção e teve duração de 30 ou 60 dias, conforme protocolo desenhado para cada grupo experimental. Cada medicamento era separado em alíquotas para administração diária. Nos protocolos de associação terapêutica, os medicamentos eram reunidos no momento da administração, suspendendo-os em volume de água destilada suficiente para que cada camundongo recebesse 0,3 ml da suspensão por via oral. A administração das drogas era via gavagem com o auxílio de uma seringa de 1 ml (BD Biosciences) conectada a sonda uretral nº 2 (MarkMed®).

As drogas utilizadas e as doses administradas foram: benzonidazol (Rochagan®, Roche) 43 mg/kg, (0,86 mg/camundongo/dia); ciprofloxacina (Neo Química) 60 mg/kg, (1,20 mg/camundongo/dia); zidovudina (LAFEPE) 60 mg/kg, (1,20 mg/camundongo/dia).

Os seguintes grupos de dez camundongos foram empregados nos experimentos:

1. Controles negativo (não-infectado);
2. Camundongos infectados, não-tratados;
3. Camundongos infectados tratados com benzonidazol;
4. Camundongos infectados tratados com benzonidazol + zidovudina (AZT)
5. Camundongos infectados tratados com benzonidazol + e ciprofloxacina
6. Camundongos infectados tratados com benzonidazol + zidovudina + ciprofloxacina

Coleta de Tecidos

Os camundongos foram mortos 30, 60 ou 120 dias após o término do tratamento. Fragmentos do coração, intestino grosso (cólon descendente/sigmóide), músculo esquelético (quadríceps) e baço foram retirados de cada animal. Parte de cada um desses tecidos foi utilizada para extração de DNA e a outra parte foi fixada em formol 10% tamponado em PBS, pH 7,4, para confecção de lâminas histológicas.

Extração de DNA Genômico

Com o auxílio de bisturis estéreis, diferentes tecidos de cada animal foram lacerados e os fragmentos do *pool* de tecidos de um mesmo animal foi incubado em 2 ml tampão de extração com proteinase K (Gibco) a 100 µg/ml por 12 h a 37 °C. Procedeu-se, então, duas extrações com clorofane (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico; 25: 24: 1) com proporção volumétrica 1:1 da amostra em processamento, seguida de uma extração com clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico; 24:1). Em cada uma destas etapas os solventes foram misturados às amostras por inversão e os tubos centrifugados a 4500 x *g* por 10 min. à temperatura ambiente em centrífuga Eppendorf 5804R. Em cada uma das etapas, a fração aquosa foi coletada e utilizada na extração subsequente.

O DNA genômico foi precipitado com etanol absoluto 1:10 (v/v) a -80 °C, precipitado e lavado 2 vezes com etanol 70% (20.800 x *g* a 4 °C por 15 minutos). Após as lavagens e evaporação do álcool etílico, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.0) com RNase (Invitrogen) a 200 µg/ml. A quantificação das amostras foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

*tp*TAIL-PCR

A *targeting primer Thermal Asymmetric Interlaced*-PCR trata-se de uma modificação da técnica de TAIL-PCR inicialmente descrita por Liu & Whittier (Liu e cols., 1995; Liu e Whittier, 1995). A *tp*TAIL-PCR é uma técnica aninhada que utiliza combinação de *primers* específicos de LINE-1 com *primers*

sucessivamente mais internos de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, em três ciclos de reações. A *tpTAIL-PCR* procede com variações de temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos nos diversos ciclos de cada uma das reações. Cada amostra de DNA é submetida a ampliações sucessivas de cada uma das combinações de *primers* de kDNA e de retroelemento. O ciclo da *tpTAIL-PCR* foram realizados em tampão *High Fidelity* (INVITROGEN) contendo 2 mM de MgCl₂; *primers* (IDT Technologies) a 0,4 µM cada; dNTPs (a 0,2 mM; 1,5 U de *Taq Platinum* (INVITROGEN) e 200 ng de DNA em termociclador BIORAD MyCycler™. A Figura 8 é um esquema ilustrativo dos ciclos de reações. Os *primers* utilizados nos experimentos estão descritos nas Tabela 1 e Tabela 2. As temperaturas empregadas nas reações da *tpTAIL-PCR* estão indicadas na Tabela 3. Nas reações de amplificação foram selecionadas amostras representativas de cada um dos esquemas terapêuticos (média de 4 animais por grupo).

Tabela 1. *Primers* específicos para LINE-1 de *Mus musculus*.

<i>Primer</i>	Alvo	Família	Sequência (5'→3')
L1cam – 5' UTR F Sense	5' UTR	F	ACC TTC CCT GTA AGA GGA GAG
L1cam – 5' UTR F Antisense	5' UTR	F	GCT CTC CTC TTA CAG GGA AGG T
L1cam – 5' UTR A Sense	5' UTR	A	GAC CTC TGG TGA GTG GAT CAC
L1cam – 5' UTR A Antisense	5' UTR	A	GTG ATC CAC TCA CCA GAG GTC
L1cam – 5' UTR T _F Sense	5' UTR	T _F	TTA GTC TGA ACA GGT GAG AGG
L1cam – 5' UTR T _F Antisense	5' UTR	T _F	CCT CTC ACC TGT TCA GAC TAA
L1cam – 5' UTR G _F Sense	5' UTR	G _F	GCG CCA TCT TCA GCT CCA GA
L1cam – 5' UTR G _F Antisense	5' UTR	G _F	TCT GGA GCT GAA GAT GGC GC
L1 cam – 2	ORF 1	Todas	CTA TGA AAG CCA GAA GAG CCT G
L1 cam – 3	ORF 2	Todas	ACA GCC ACA AGA ACA GAA TGC
L1 cam – 4	3' UTR	Todas	GCC TAG TCG GCC ATC ACT G
L1 cam – 5 (L1cam 4 Antisense)	3' UTR	Todas	CAG TGA TGG CCG ACT AGG C
L1 cam – 6 (L1cam 3 Antisense)	ORF 2	Todas	GCA TTC TGT TCT TGT GGC TGT
L1 cam – 7 (L1 cam 2 Antisense)	ORF 1	Todas	CAG GCT CTT CTG GCT TTC ATA G
ORF2(01) Sense	ORF 2	Todas	GAG TGC CTC CAA GAA GAA ACG
ORF2(01) Antisense	ORF 2	Todas	CGT TTC TTC TTG GAG GCA CTC
ORF2(02) Sense	ORF 2	Todas	TCA TCC ATC CTG ACC AAG TAG G
ORF2(02) Antisense	ORF 2	Todas	CCT ACT TGG TCA GGA TGG TGA

Tabela 2. Primers específicos para *Trypanosoma cruzi*.

Primer	Alvo	Sequência (5'→3')
S 34	Minicírculo de kDNA	ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC
S 67	Minicírculo de kDNA	GGT TTT GGG AGG GG(G/C)
S 35	Minicírculo de kDNA	ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC
S 35 reverso	Minicírculo de kDNA	GCA TCT CMC CCG TAC ATT AT
S 67 reverso	Minicírculo de kDNA	GAM SSC CCC TCC CAA AAC C
S 36	Minicírculo de kDNA	GGT TCG ATT GGG GTT GGT G

Southern Blot

Brevemente, os produtos da *tpTAIL*-PCR foram separados eletroforeticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,3 µg/ml) e observados sob luz ultravioleta. Após isto, utilizou-se método de transferência alcalina. O método consiste na desnaturação do DNA contido no gel por tratamento com solução de NaOH e na utilização da capilaridade como método de transferência dos ácidos nucléicos contidos no gel para uma membrana (*HybondTM-N+*, Amersham GE Healthcare) onde ficam imobilizados (Sambrook e Russell, 2001).

Sonda de DNA e marcação radioativa

O kDNA purificado de cultura de epimastigotas de *T. cruzi* foi utilizado como molde para marcação radioativa com dATP α -³²P (PerkinElmer). Usou-se o kit *Random Primers Labelling System* (Invitrogen) em reação com volume final de 50,0 µl, deoxinuclotídeos trifosfato dCTP, dGTP e dTTP a 20 µM; 3 U do fragmento recombinante *Klenow* de DNA polimerase I, 15,0 µl de *Random primer buffer mixture*; além de 5,0 µl de dATP radiomarcado (3000 µCi). A reação durava 3 horas, seguida de purificação da sonda radiomarcada em coluna de Sephadex G-25.

Hibridização com sonda radioativa

As membranas de nylon contendo DNA imobilizado passaram por tratamento de bloqueio com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SDS 7%, SSPE 1,5% e DNA de esperma de salmão 100 µg/ml) de à 65° C por 2 h. A hibridização foi realizada também a 65° C por 12h. Após este período, procederam-se duas lavagens com SSC 2X (NaCl 3M, citrato de sódio 30 mM, pH 7,0)/SDS 0,1% seguidas de mais duas com SSC 0,1X/SDS 0,1%. Todas as lavagens foram realizadas à 65 °C por 15 minutos. Em seguida, as membranas eram inseridas em cassetes (Kodak BioMax) para exposição de filmes sensíveis a emissões de raios X (Kodak T-MAT) e armazenadas a -80° C. A revelação dos filmes foi feita com soluções de revelação e fixação também da marca Kodak.

Clonagem, Extração de DNA Plasmidial e Sequenciamento

As amostras da terceira reação da *tpTAIL*-PCR com sinais de hibridização mais intensos com sonda de kDNA foram selecionadas para clonagem. De cada camundongo foi obtida amostra de DNA que foi subdividida em oito alíquotas para amplificação. De cada reação foram escolhidos quatro produtos amplificados para ligação. Esta foi feita em *pGEM T-easy* (Promega) pela ação da T4 ligase à 4 °C por 12 h. *Escherichia coli* competente da linhagem XL10-Gold (Stratagene), tratada com cloreto de rubídio foi utilizada para transformação pelo método de choque térmico (Protocols and Applications Guide, Third Edition, 1996). As células transformadas foram inoculadas em meio LB (USB Corp.) a 37 °C por 3 horas até atingir OD 600 entre 0,3 e 0,4. As células foram centrifugadas e semeadas em placas de Petri com meio de seleção LB Luria Bertani ágar (HIMEDIA Labs.) contendo X-Gal a $4,8 \cdot 10^{-2}$ µg/ml e ampicilina a 0,1 µg/µl .

A seleção dos recombinantes se deu pela observação de colônias brancas resistentes a ampicilina. Essas colônias foram transferidas para crescimento sobre membrana de nylon, e posteriormente tratadas para hibridização com sonda de kDNA e seleção dos recombinantes com sinal de

hibridização intenso (Sambrook e Russell, 2001). O DNA plasmidial foi extraído com uso do kit *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) para verificação de tamanho dos insertos. Para liberação do inserto, utilizou-se a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. Insertos com variados tamanhos e com fortes sinais de hibridização foram enviados para Genomic Engenharia Molecular Ltda., que realizou as reações de sequenciamento usando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da Applied Biosystems. Os produtos destas reações foram seqüenciados em um *3130xl Genetic Analyzer* da Applied Biosystems.

Análise das Sequências

As sequências obtidas foram analisadas comparando-se a similaridade destas com sequências de *Mus musculus* ou *Trypanosoma cruzi* depositadas no GenBank/NCBI. As buscas foram realizadas inicialmente na base de dados *nr* (antiga "*non-redundant*") que abrange todo o GenBank/EMBL/DDBJ e *RefSeqs*. Para isto foi utilizada a versão 2.2.25 do Blastn com parâmetros gerais padrões (*e-threshold*: 10; *word size*: 11) e os seguintes parâmetros de cálculo de escore: *Match/Mismatch Scores* (1,-2); *Gap costs* (*existence*: 5; *extension*: 2) (Altschul e cols., 1997).

Para uma rápida identificação e mapeamento de *repeats* presentes nas sequências, fez-se uso do *repeat masker* CENSOR (Kohany e cols., 2006). Em algumas ocasiões, a base de dados GIRI não dá retorno a informação sobre a família de LINE-1. Para obter classificação, essas sequências foram alinhadas contra membros de LINEs das famílias A, T_F e G_F. Alinhamentos com melhores escores usando Blastn definiram o "parentesco" dos clones. As sequências referenciais foram L1Md_A2 (M13002.1) para a família A, L1spa (AF016099.1) para a T_F, e L1Md_GF62 (MGI:2178803) para a G_F, (Akagi e cols., 2008). O teste *One-way ANOVA-F* foi empregado para a avaliação da variação na distribuição das integrações entre grupos experimentais.

Histopatologia

Órgãos dos camundongos experimentais foram coletados, lavados com PBS 1X e fixados em solução de formaldeído a 4% por 72 horas. A desidratação dos tecidos foi realizada em banhos com concentrações crescentes de álcool etílico: incubação por 30 minutos em etanol a 70%; 80%; 90%; e três banhos com álcool etílico absoluto. A pré-diafanização foi realizada em solução de álcool etílico absoluto e xileno na razão de 1: 2 (etanol: xileno).por 15 minutos. Os tecidos diafanizados foram postos em 3 banhos de xileno por 30 minutos cada. Após isso, os tecidos foram incubados em parafina em estufa a 60° C em um ciclo de 10 minutos e dois de 30 minutos. A inclusão foi feita em parafina fundida a 60° C, e os blocos foram resfriados à temperatura ambiente. As seções histológicas com espessura de 4 µm foram obtidas em micrótomo Leica RM2135 com navalhas Duraedge. As seções foram montadas em lâminas de vidro (Exacta). As lâminas foram incubadas em estufa a 60 °C por 1 hora para desparafinização.

Coloração Hematoxilina/Eosina

Para uma completa desparafinização, foram feitos três banhos com xileno por 5 minutos. Seguiu-se a hidratação com concentração decrescente de álcool etílico: etanol absoluto por 5 minutos e mais quatro banhos de etanol 100%; 90%; 80% e 70% por 2 minutos cada. As lâminas foram incubadas em Hematoxilina de Harris (Newprov) por 10 minutos e lavadas em água corrente para remoção do excesso. Foi feita incubação em diferenciador alcoólico (etanol 95%/ HCl 5%) por 30 segundos seguido de lavagem em água corrente. Após isso, foi feita incubação em solução aquosa de amoníaco a 1% por 30 segundos, seguido de lavagem em água corrente. Para a contra-coloração, as lâminas foram submersas em solução de Eosina-Floxina B por 5 minutos. Seguiu-se, então, a desidratação das amostras com banhos com concentrações crescentes de álcool etílico: etanol a 96% por 2 minutos; e três ciclos de etanol absoluto também por 2 minutos. Após isso, foi feito banho etanol absoluto:xileno (1:2) por 2 minutos seguidos de três banhos com xileno

por 5 minutos cada. A montagem das lâminas foi feita com Entellan (Merck) e lamínulas de 24 x 60 mm (Perfecta).

Imunohistoquímica

Após a deparafinização e hidratação das amostras, foi realizada a recuperação antigênica induzida por calor em forno de microondas. Brevemente, as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato de sódio 10 mM Tween 20 0,05% pH 6.0 aquecido (aproximadamente 100° C) e mantidas por 20 minutos no forno de microondas em potência máxima. As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente, ainda mergulhadas no mesmo tampão, por 20 minutos e lavadas com PBS 1X. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, as amostras foram cobertas com quantidade suficiente de tampão de bloqueio com leite em pó (Molico) desnatado a 5% em PBS 1X pH 7,2 por 40 minutos. Após isto, o excesso de tampão foi removido.

Os anticorpos primários foram utilizados em diluição de 1:20 em tampão de bloqueio e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos cada. A coloração por hematoxilina procedeu por 1 minuto e o excesso foi removido com água corrente. Para redução da autofluorescência das células cardíacas e hemácias, emitida principalmente por lipofuscinas, as amostras foram tratadas com CuSO_4 5 mM em tampão acetato de amônio 50 mM pH 5,0 por 90 minutos. Por fim as amostras foram desidratadas com banhos com teor crescente de álcool etílico, incubadas em três banhos de xileno por 5 minutos cada e montadas com Entellan.

Isolamento e cultivo de cardiomiócitos

Fêmeas de camundongos BALB/c entre o 15° e o 18° dia de gestação, foram mortas após eutanásia em câmara de CO_2 . Os fetos foram removidos do útero e os corações colocados em placa de Petri contendo PBS 1X gelado. Os átrios foram descartados e os ventrículos cortados em múltiplos fragmentos com lâmina de bisturi. Os fragmentos foram lavados em PBS 1X gelado e transferidos para um béquer de 50 ml. Após remoção do PBS, os fragmentos

de miocárdio foram digeridos em ciclos com 5 ml de tampão de tripsina 0,25% (DIFCO) pré-aquecido a 37 °C, e submetidos a agitação orbital em incubadora com por 10 minutos. Ao fim de cada ciclo, os fragmentos maiores foram deixados decantar durante 1 minuto e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e transferido para tubo Falcon contendo 5 ml de meio DMD-F12 (SIGMA) com 20 % de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab) e piruvato de sódio a 3 mM. Após centrifugação a 300 g por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 1 ml de DMEM/ SFB 10%.

As células ressuspensas em meio DMEM foram coradas com *Trypan Blue* para avaliar a viabilidade (95%). As células viáveis foram semeadas em placa de 100 x 20 mm e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ por 2 horas. As células não aderidas, presentes no sobrenadante, foram contadas câmara de Neubauer (Bright-Line/SIGMA) e o total de 1x10⁴ células foi semeado em câmaras de crescimento (*chamber-slides* Labtek, Nunc) com DMEM/SFB 10 %. O meio de cultura era trocado a cada 48 horas, e as células cultivadas formaram camadas confluentes ao terceiro dia, quando foram usadas nos experimentos.

Enriquecimento de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Esplenócitos de camundongos chagásicos e sadios, obtidas após maceração dos órgãos, foram suspensos em RPMI 1640 e passadas em peneira (*cell strainers*) com poros de 70 µm (BD Biosciences). Estas células foram lavadas com PBS 1X/BSA 0,5 %/EDTA 2 mM e ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640/SFB 10 % para contagem em câmara de Neubauer.

O enriquecimento em frações celulares contendo linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ foi realizado por seleção negativa utilizando os reagentes MACS[®] CD4⁺ *T Cell Isolation Kit II* e CD8a⁺ *T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec). Esses kits contêm coquetéis de anticorpos biotinizados que se ligam especificamente às suas moléculas alvo. O coquetel para isolamento de células T CD4⁺, por exemplo, não contém anticorpos contra a molécula de CD4⁺, logo, os linfócitos T CD4⁺ tendem a não ser marcados por estes anticorpos biotinizados.

A suspensão celular é, então, incubada com *microbeads*, feitas de material superparamagnético, conjugadas com anticorpos contra biotina (IgG1

de camundongo). Esta interação anticorpo-biotina permite que as células marcadas sejam retidas quando submetidas a campo magnético. As células não marcadas (fração enriquecida) foram coletadas e utilizadas para os experimentos de imunofluorescência e de citotoxicidade. Todos esses procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante à risca. Para avaliar a pureza da fração enriquecida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences). Os linfócitos foram mantidos em RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 30 U/ml de IL-2 recombinante de camundongo (INVITROGEN).

Cocultivo de fibras cardíacas e linfócitos

Foram contados os cardiomiócitos em *chamber-slides* em 10 campos sob objetiva de 10X em microscópio invertido. A estimativa de densidade celular foi feita se considerando a área de cada campo sob a objetiva utilizada e a área total da câmara. Os cardiomiócitos isolados de fetos de camundongos foram cultivados em *chamber-slides* por três dias até atingir densidade de $4,76 \times 10^4$ células/cm². Linfócitos T CD8⁺, isolados de baço de camundongo chagásico crônico e camundongo controle sadio, singênicos, foram incubados com as fibras cardíacas em proporção de 1:10 (cardiomiócito: linfócito) por 12 horas.

Imunofluorescência

Foi removido o meio de cultura das *chamber-slides* que foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 1 minuto para remoção das células não aderidas. A fixação foi realizada com metanol à -20 °C por 10 minutos. As amostras foram coradas com eosina por 5 minutos. O excesso do corante foi lavado com álcool etílico a 95% por 2 minutos e mais uma lavagem com PBS 1X por 2 minutos.

Após incubação com tampão de bloqueio PBS1X/BSA 0,5% por 30 minutos as lâminas foram incubadas com anticorpos primários diluídos 1:10 no mesmo tampão à temperatura ambiente por 40 minutos. O excesso de anticorpos foi removido por duas lavagens com PBS 1X por 2 minutos seguido

da incubação com os anticorpos secundários diluídos 1:100 em PBS 1X/BSA 0,5% no escuro e à temperatura ambiente em câmara úmida por mais 40 minutos. O excesso de anticorpos secundários também foi lavado duas vezes com PBS 1X por 2 minutos. A montagem foi feita com glicerina tamponada pH 8.4 à qual se adicionou DAPI em concentração final de 3 nM.

Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos anti-camundongo: CD4 PE-Cy7 (Rat IgG2b κ , cloneGK1.5); CD8 PE-Cy5 (Rat IgG2a κ , 53-6.7); TCR β PE (Armenian hamster IgG, clone H57-597); TCR $\gamma\delta$ FITC (Armenian hamster IgG, clone UC7-13D5); Rat IgG2b κ isotype control PE-Cy7; Rat IgG2a κ isotype control PE-Cy5 e Armenian hamster IgG isotype control FITC adquiridos da eBioscience, San Diego, CA, USA. Anti-mouse CD25 FITC (Rat IgG1, clonePC61.5.3) e F4/80 FITC (Rat IgG2b κ , Cl:A3-1) da AbD serotec, Oxford, UK. Anti Troponin I-C (goat polyclonal) e mouse anti-goat IgG FITC da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.

Também foram utilizados: CD8 α FITC (Rat IgG2a κ , 53-6.7); TCR $\alpha\beta$ (Armenian hamster IgG, clone H57-597); TCR $\gamma\delta$ (Armenian hamster IgG, clone UC7-13D5); CD19 PE (Rat IgG2a κ , 6D5); CD45RB PE (Rat IgG2a κ , C363.16A) e CD69 (VEA) R-PE (Armenian hamster IgG, H1.2F3) da SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA.

Adicionalmente, foram testados os seguintes anticorpos biotinizados anti-chicken: CD4 (mouse IgG1 κ , CT-4); CD8 α (mouse IgG2b κ , EP-72); CD28 (mouse IgG1 κ , AV7); CD45 (mouse IgM κ , LT40) da SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA. Para evidenciar a ligação destes anticorpos primários, foi feita incubação com streptavidina conjugada com FITC (GIBCO). Além disso, foram testados anti-chicken CD8 α FITC (mouse IgG1 κ , CT-8); CD44 FITC (mouse IgG1 κ , AV6); Monocyte/macrophage FITC (mouse IgG1 κ , KUL01 da SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA.

Todos os anticorpos biotinizados ou conjugados a fluorocromos foram utilizados em razão 1: 20. A streptavidina conjugada com FITC foi utilizada em razão 1: 100.

Análises ao microscópio

As imagens histológicas e fluorescentes foram capturadas por uma câmera DP72 (Olympus) acoplada a um microscópio BX51 (Olympus) e auxílio do software CellSens versão 1.5 (Olympus).

RESULTADOS

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar se o tratamento de camundongos com altas doses do nitroderivado benzonidazol modifica o curso da infecção pelo *T. cruzi* e traz benefício ao indivíduo, à medida que reduz morbidade e mortalidade, melhorando o prognóstico das infecções. Concomitantemente, o estudo visou à re-avaliar os dados da literatura (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011b) que sugerem a origem da patogênese da doença de Chagas está relacionada com modificações genótípicas decorrente da integração de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. Os resultados apresentados a seguir mostram que marcadores genéticos de nDNA e de kDNA persistem indistintamente em grupos de animais infectados e em animais infectados-tratados com dose do nitroderivado benzonidazol quatro vezes (43 mg/kg peso) acima daquela empregada no tratamento de chagásicos. Nos animais tratados verificou-se a presença de amplicons de nDNA e de kDNA de *T. cruzi*, mostrando que o tratamento não eliminou a infecção e, também, não interferiu sobre a morbidade e a mortalidade dos animais infectados e tratados, visto que os amplicons eram encontrados nos grupos controles, infectados mas não-tratados. Os resultados deste estudo mostram que o regime terapêutico que associou o benzonidazol com inibidores de topoisomerase II e de transcriptase reversa também não produziram a cura e os marcadores genéticos da infecção e da integração de kDNA continuaram presentes (Figura 6).

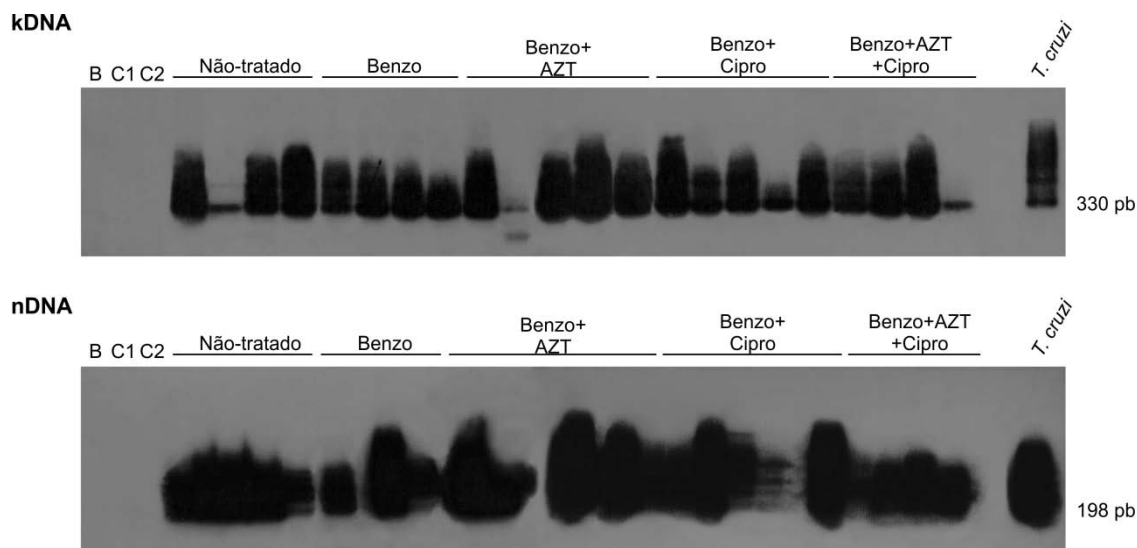


Figura 6. Radioautografia de produtos de PCR obtidos de DNA de camundongos chagásicos dos grupos experimentais e do grupo controle.

Painel acima kDNA : Hibridização de produtos de PCR de DNA do cinetoplasto (kDNA) do *Trypanosoma cruzi* com sonda de kDNA total. Painel abaixo (nDNA): Hibridização de produtos de PCR de DNA de origem nuclear (kDNA) do *Trypanosoma cruzi* com sonda específica. B, Branco (reação sem DNA); C1 e C2, camundongos não infectados; Benzo, benzonidazol; AZT, zidovudina; Cipro, ciprofloxacina.

A Figura 7 mostra que o tratamento multidrogas das infecções chagásicas não preveniu as lesões típicas da doença de Chagas no coração dos camundongos.

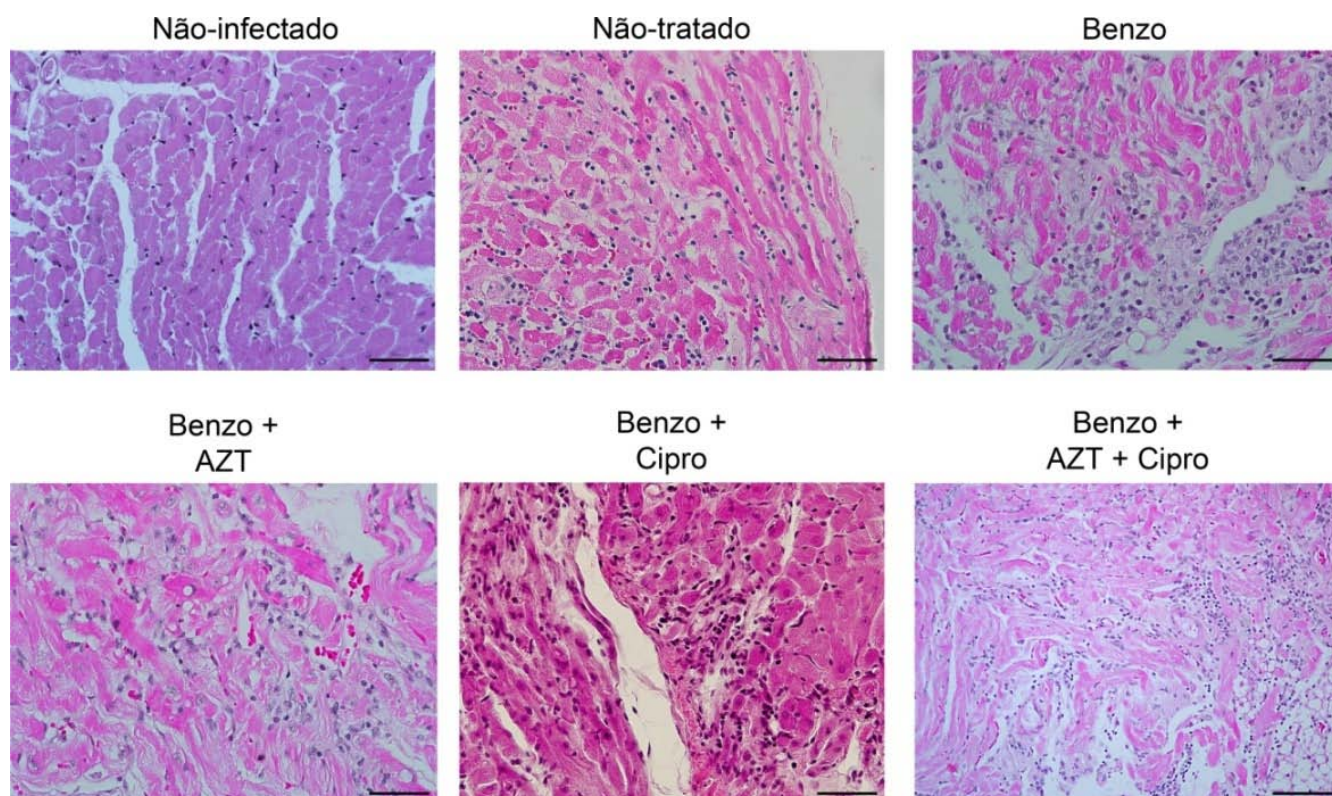


Figura 7. Características do infiltrado inflamatório no coração de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com coquetel de drogas: Benzo, benznidazol; AZT, zidovudina; Cipro, ciprofloxacina (Barra = 50 µm). Note que a inflamação destrutiva está presente no coração de camundongo tratado com Benzo, Benzo + AZT Benzo + Cipro, e Benzo + Cipro + AZT.

Emprego da *tpTAIL*-PCR para identificar mutações de kDNA no modelo murino

Trabalhos prévios mostraram que coelhos e humanos chagásicos provenientes de diferentes regiões do Brasil, têm sequências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* integradas no genoma (Nitz e cols., 2004). O principal sítio de integração do kDNA é o retrotransposon LINE-1 situado em diversos cromossomos (Hecht e cols., 2010). Esses achados prévios orientaram o presente estudo que teve como um objetivo mostrar se o tratamento das infecções chagásicas no modelo murino impede a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma. Com esta finalidade, as mutações de kDNA foram

identificadas com o emprego da técnica de *tpTAIL-PCR* e as inserções de sequências de minicírculos no genoma de *Mus musculus* foram mapeadas (Anexo I - Tabela Suplementar 1).

A fácil manipulação e o relativo baixo custo da manutenção de camundongos justificam o uso desse modelo animal na presente investigação. Além disso, grande parcela do investimento das empresas de biotecnologia ligadas à pesquisa básica é conduzida em *Mus musculus* para facilitar a reprodução dos experimentos em outros laboratórios. Ademais, a investigação é facilitada pela disponibilidade comercial de reagentes específicos para análises de respostas imunes neste modelo animal.

Obtenção de *Primers* de LINE-1 Murino

Cada família de LINE-1 de camundongo possui um tipo de promotor situado à montante (*upstream*) da extremidade 5' UTR. Cada promotor é composto por um monômero específico que, juntamente com a região 5' UTR, é a porção mais importante na caracterização da família do elemento identificado (Padgett e cols., 1988). Existem várias famílias diferentes de LINE-1 nos genoma de camundongo, tais como: A; F; V; e, mais recentemente foram identificados as famílias T_F e G_F (Padgett e cols., 1988; Adey e cols., 1991; Schichman e cols., 1992; Schichman e cols., 1993; Adey e cols., 1994; Hardies e cols., 2000; Goodier e cols., 2001; Mears e Hutchison, 2001). Os promotores A ou F, particularmente, são formados por monômeros de aproximadamente 200 pb. A estrutura do promotor V é incerta devido à pequena quantidade de elementos tipo V caracterizados, que apresentam extensa fragmentação (Padgett e cols., 1988; Adey e cols., 1991; Schichman e cols., 1993; Hardies e cols., 2000; Mears e Hutchison, 2001).

De posse destas informações e de consensos gerados para os monômeros das famílias F (Adey e cols., 1994); A (Loeb e cols., 1986; Shehee e cols., 1987), T_F (Deberardinis e cols., 1998) e G_F (Goodier e cols., 2001), os bancos de dados de nucleotídeos GenBank, EMBL e DDBJ foram pesquisados, visando a identificar depósitos de sequências das diferentes famílias destes elementos, inclusive truncados. O conjunto de depósitos de membros de cada uma das famílias permitiu alinhamentos completos que produziram consensos.

Tais consensos serviram de "iscas" para a identificação e extração de novas seqüências de elementos L1, particularmente dos monômeros específicos de cada família, ainda não anotadas no *assembly* do genoma de *Mus musculus* Build 37.1 (NCBI, 2007). A grande quantidade de trechos de *contigs* que foi obtida permitiu a escolha de *primers* para anelamento específico, em regiões características de cada uma das famílias (Figura 8A) ou compartilhadas entre elas (Tabela 1).

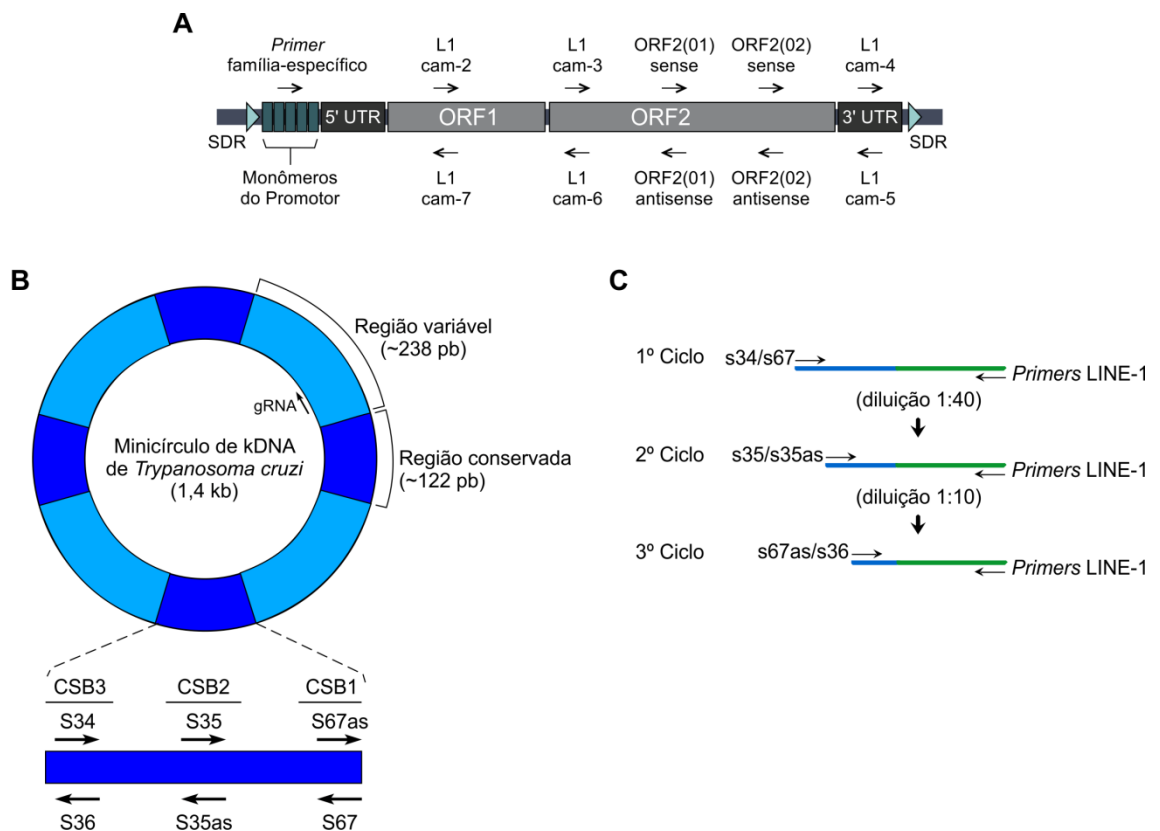


Figura 8. Uso da *tpTAIL*-PCR na identificação de sítios de inserção de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Mus musculus*. **A:** Esquema ilustrativo de um elemento LINE-1 de *M. musculus* e posição dos *primers* delineados (setas pretas). A representação não está em escala. O número de monômeros mostrado é arbitrário. **B:** Minicírculo de kDNA de *T. cruzi* mostrando as regiões variada e conservada e a posição de cada um dos CSBs. **C:** Ciclos de reamplificação empregados na *tpTAIL*-PCR. A cada ciclo de amplificação dilui-se o produto para uso na reação posterior com *primers* mais internos de kDNA. SDR, *short direct repeat*; 5' e 3' UTR, 5' e 3' *untranslated region*; ORF1 e ORF2,

open reading frame 1 e 2; A_n, cauda poli-A. CSB, *conserved sequence block*; gRNA, *guide* RNA. Azul, minicírculo de kDNA do *T. cruzi*; verde, DNA de camundongo.

Os oligonucleotídeos obtidos de regiões do retroelemento LINE-1 foram utilizados em conjunto com *primers* específicos para a região conservada de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* em três reações consecutivas de reamplificação. Os *primers* de LINE-1 foram empregados em concentração 10 vezes menor que os de kDNA.

Tabela 3. Ciclos empregados nas amplificações da *tp*TAIL-PCR.

1ª Amplificação				2ª Amplificação				3ª Amplificação			
Passo 1	1x	94 °C	5 min	Passo 1	1x	94 °C	5 min	Passo 1	1x	94 °C	5 min
Passo 2	5x	94 °C 64 °C 72 °C	30s 1 min 2 min			94 °C 64 °C 72 °C 94 °C	30s 1 min 2 min 30s	Passo 2	20x	94 °C 45 °C 72 °C	30s 1 min 2 min
Passo 3	1x	94 °C 25 °C 72 °C	30s 1 min 2 min	Passo 2	12x	64 °C 72 °C 94 °C 45 °C 72 °C	1 min 2 min 30s 1 min 2 min	Passo 3	1x	72 °C	7 min
		94 °C 64 °C 72 °C 94 °C	30s 1 min 2 min 30s					Passo 4		4 °C	∞
Passo 4	12x	64 °C 72 °C 94 °C 44 °C 72 °C	1 min 2 min 30s 1 min 2 min	Passo 3	1x	72 °C	7 min				
				Passo 4		4 °C	∞				
Passo 5	1x	72 °C	7 min								
Passo 6		4 °C	∞								

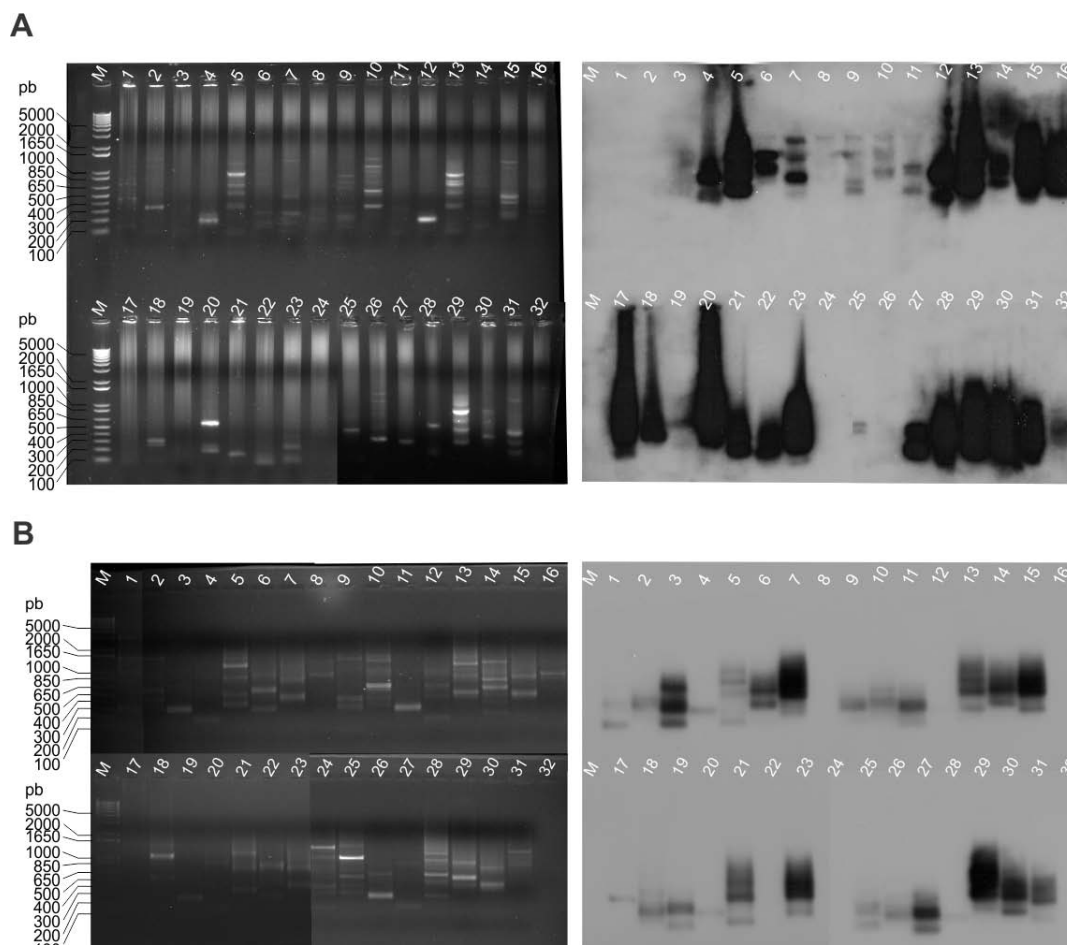


Figura 9. Eletroforese e radioautografia dos produtos obtidos do terceiro ciclo da *tpTAIL*-PCR. **A:** Último ciclo da *tpTAIL*-PCR de amostras de DNA de camundongos tratados com benzonidazol, cada amostra de DNA é amplificada com 8 combinações diferentes de *primers*. Poços 1 a 8, amostra C₁(60)I; 9 a 16, C₃(60)I; 17 a 24 C₁(120)I; 25 a 32, C₃(120). **B:** Amplificação obtida de camundongos tratados com benzonidazol em associação com zidovudina ou ciprofloxacin. Poços 1 a 8, G₁(60)I; 9 a 16, G₂(60)I; 17 a 24, H₃(60)I; 25 a 32, H₁(60)I. Esquerda em **A** e **B:** bandas resolvidas em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídio. Direita em **A** e **B:** radioautografia das membranas hibridizadas com sonda radiomarcada específica para kDNA. M, marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

A Figura 9 mostra produtos de kDNA obtidos pela *tpTAIL*-PCR a partir de DNA molde de camundongos infectados com *T. cruzi*, tratados ou não-tratados com esquema terapêutico multidrogas

A *tpTAIL*-PCR não produz amplicons quimeras de kDNA e DNA a partir de amostras de camundongos não infectados, e não forma bandas de kDNA na

radioautografia. Os testes *tp*TAIL-PCR foram convalidados pela adição de DNA de *T. cruzi* às amostras de DNA de camundongos controles, não-infectados (Figura 10). Os resultados mostram que não se formam sequências quimeras kDNA-DNA hospedeiro. Ou seja, as quimeras são encontradas apenas no DNA do camundongo chagásico. O sequenciamento dos produtos do último ciclo da *tp*TAIL-PCR mostram amplificação de trechos de DNA do hospedeiro ou de minicírculos de kDNA, mas nunca quimeras.

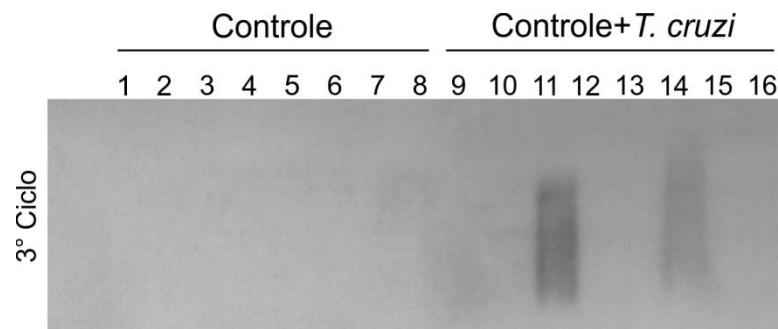


Figura 10. Validação da *tp*TAIL-PCR. Radioautografia do terceiro ciclo da *tp*TAIL-PCR usando DNA de camundongo não infectado (poços de 1-8) ou adicionado de 300 pg de DNA de *T. cruzi*.

Mapeamento das integrações de kDNA no genoma murino

Foram obtidas 78 sequências quimeras kDNA-DNA murino com tamanho médio de 504 ± 260 nts em 22 amostras de DNA de camundongos chagásicos, distribuídos nos diferentes grupos experimentais, identificados na

Tabela 4: 6 camundongos crônicos, não tratados, renderam 26 sequências. Outras 20 sequências foram obtidas de 4 camundongos tratados com benzonidazol; 3 camundongos tratados com benzonidazol + zidovudina (AZT) renderam 15 sequências. Também, foram obtidas 10 sequências de 3 animais tratados com benzonidazol + ciprofloxacina e 7 sequências foram clonadas de 3 animais tratados com benzonidazol + zidovudina + ciprofloxacina.

Tabela 4. Integrações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* nos diferentes grupos experimentais

Grupo experimental	Animal	Integrações clonadas	Tamanho médio (pb)
Não tratado	B1 (30) II	11	524
	B2 (30) II	4	558
	B1 (60) II	1	542
	B1 (120) II	2	242
	B1 120 IV	1	387
	B2 (120) V	9	246
	Subtotal	28	417
Benzonidazol	C2 (30) II	1	905
	C1 (60) I	2	321
	C3 (60) I	10	593
	C3 (120) III	6	418
Subtotal	19	560	
Benzonidazol + zidovudina	G1 (60) I	10	634
	G2 (60) I	4	465
	Subtotal	14	550
Benzonidazol + ciprofloxacina	H1 (60) I	5	831
	H3 (60) I	2	601
	H5 (60) II	3	377
	Subtotal	10	603
Benzonidazol + zidovudina + ciprofloxacina	J1 (30) II	2	561
	J2 (30) II	4	314
	J1 (60) II	1	686
	Subtotal	7	520
Total		78	504

Os resultados apresentados na

Tabela 4 mostram que os diferentes esquemas de tratamento multidrogas não impediu que sequências de kDNA do *T. cruzi* integrassem no genoma de células somáticas dos camundongos chagásico. Particularmente, os resultados mostram que o uso de dose elevada do nitroderivado benzonidazol não eliminou a infecção, não impediu a transferência do kDNA, e, portanto, não teve qualquer efeito benéfico nos vários grupos experimentais. Análise *Oneway ANOVA-F test* não revelou diferença estatística significativa ($p= 0,9414$) na distribuição das integrações do kDNA nos diferentes grupos experimentais de camundongos que receberam diferentes combinação multidrogas e que foram analisados (Figura 11A). A persistência da parasitemia e a transferência do kDNA observada nos grupos de camundongos infectados-tratados mostram que não houve qualquer efeito benéfico que pudesse ser creditado aos esquemas terapêuticos empregados nos diferentes grupos experimentais (Figura 11A).

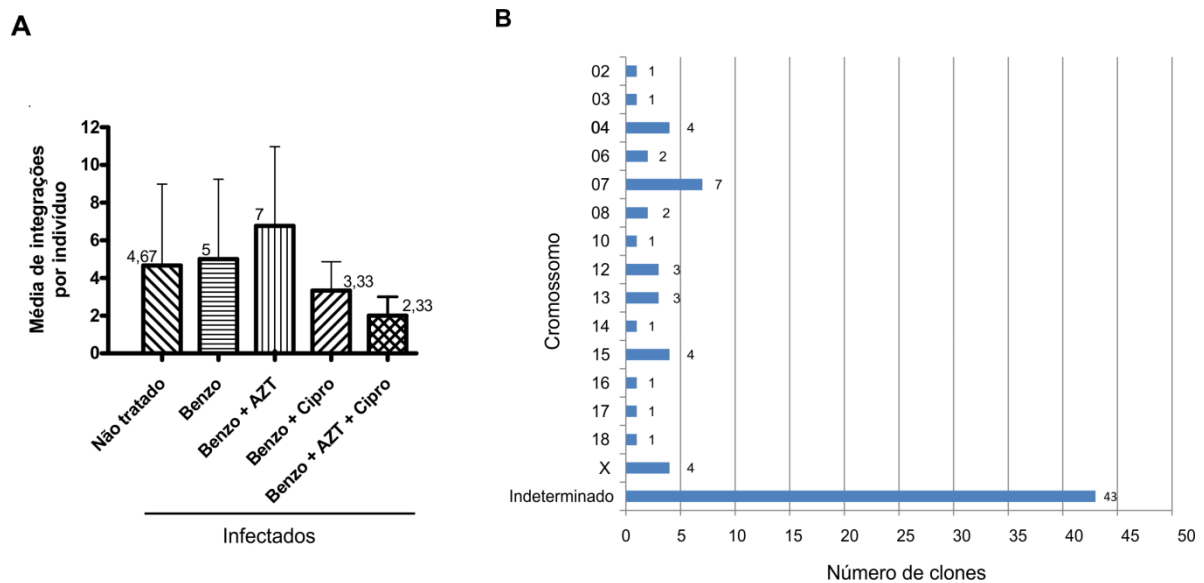


Figura 11. Integrações de sequências de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em retrotransposons LINE-1 em diversos cromossomos do genoma murino. A: Integrações de kDNA nos diferentes grupos experimentais ($p=0,9414$), tratados e não-tratados. Os valores indicados são a média e a barra mostra desvio padrão. Benzo, benzonidazol; AZT, zidovudina; Cipro, ciprofloxacina. **B:** Ampla dispersão das integrações de kDNA no genoma de *M. musculus*.

Com o uso da *tpTAIL-PCR* foi possível identificar fragmentos de minicírculos do kDNA de *T. cruzi* integrados no genoma dos camundongos chagásicos. Entretanto, observou-se que os *primers* para famílias específicas de LINE-1 tiveram um rendimento baixo, pois, apenas uma sequência foi obtida com *primer* para região 5' UTR da família F de LINE-1 murino. Em contraste, os pares de *primers* obtidos da região de ORF2 foram mais eficientes e identificaram sequências quimeras kDNA-DNA em todos os camundongos chagásicos. Entretanto, o *locus* específico da inserção não foi encontrado em 53% desses clones. Talvez, o grande número de cópias de elementos LINE-1 no genoma murino e sua distribuição em todos os cromossomos tenham sido fatores impeditivos para fazer o mapeamento das mutações de kDNA. Ainda assim, foram identificadas integrações em vários cromossomos (Figura 11B).

Diferente do que foi obtido nas análises das integrações nos genomas de *Homo sapiens* (Hecht e cols., 2010) e de aves (Teixeira e cols., 2011a), as integrações do kDNA no genoma de camundongos não tinham preferência para regiões codificadoras, e, possivelmente, isto se deve ao fato de que quase todas elas ocorreram em retroelementos. As análises das sequências repetitivas no genoma murino, feita com emprego do *repeat masker* CENSOR, revelaram que, em adição aos elementos LINE-1, o kDNA do *T. cruzi* integrou também em regiões contendo trechos de retrovírus endógeno (ERV), incluindo um IAP (*intracisternal particle A*), e em retrotransposon LTR (*long terminal repeats*) não autônomo (Tabela 5).

Tabela 5. Elementos repetitivos associados às sequências de kDNA integradas no genoma murino.

Classe	Tipo	Repeat	Fragmentos	
Retrotransposon não-LTR	LINE-1 A	L1_MM	50	
		L1P_MA2	18	
		Lx7_3end	3	
		L1_Mur3_orf2	3	
		LINE-1 T _F	Lx3B_3end	2
		LINE-1 G _F	L1B_MM	1
	LINE-1 F	L1Md_F_5end	1	
LTR	<i>Mouse putative</i> LTR	RLTR27_MM	2	
ERV	<i>Intracisternal A-type</i>	IAPLTR4_I	2	

	<i>Mouse virus-like</i> 30S LTR	RLTR6_MM	1
Sem repeats			11
Total			94

A Figura 12 mostra que a maior parte das integrações de kDNA foi localizada em elementos LINE-1 da família A (79%). Os membros de outras famílias de LINE-1 contendo integrações de kDNA somaram 4% do total. Em apenas 11 sequências quimeras (kDNA-DNA murino) não foram encontrados trechos repetitivos, à exceção de CSB1, CSB2 e CSB3 característica da região conservada de kDNA.

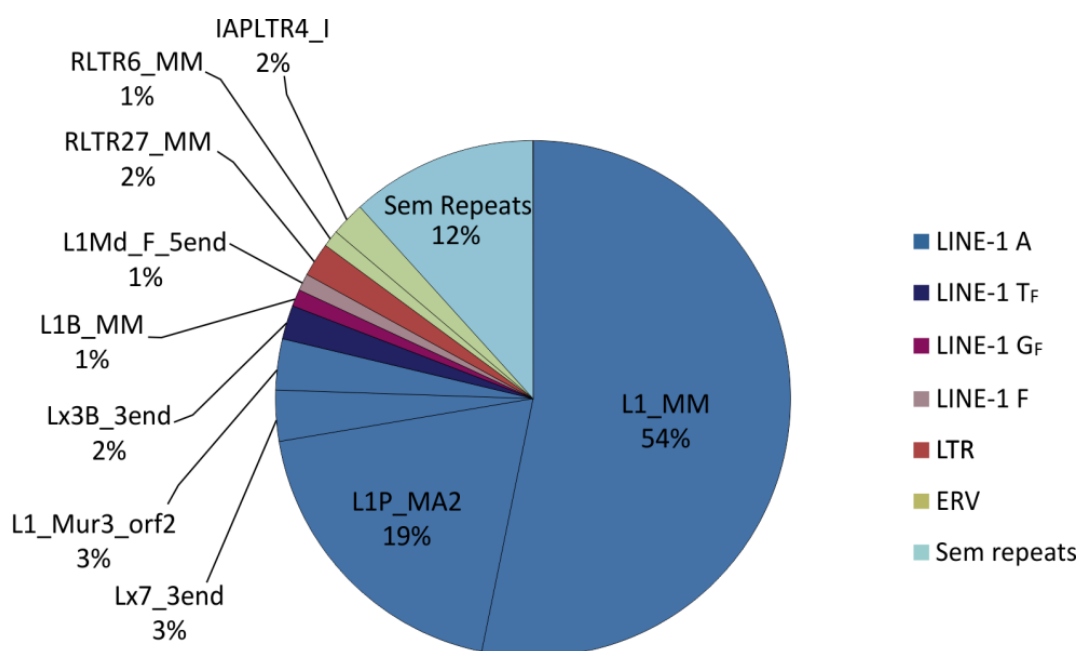


Figura 12. Elementos repetitivos encontrados nos sítios de integrações de sequências de kDNA no genoma de camundongos chagásicos. LINE-1, *long interspersed nuclear element* 1; HAL1, *half-LINE-1*; LTR, *long terminal repeat*; ERV, *endogenous retrovirus*.

Recombinação homóloga por microhomologia rica em A/C intermedeia a integração do kDNA no genoma murino

Foi interessante observar que as integrações de sequências de minicírculos de kDNA no genoma murino devem ter utilizado o mesmo mecanismo padrão de recombinação homólogo mediado por microhomologia

como nos casos descritos em humanos (Hecht e cols., 2010) e em aves (Teixeira e cols., 2011a). Em geral, verificou-se que os sítios de integração são ricos em nucleotídeos A/C (adenina/citosina), e que essas microhomologias são encontradas no DNA hospedeiro e nos blocos de região conservada (CSBs) dos minicírculos de kDNA. Esses trechos compartilhados de DNA tinham em média 14 ± 8 pb. Algumas sequências quimeras kDNA-DNA murino estão ilustradas na Figura 13. A análise também permitiu identificar consensos ricos em A/C nos flancos 5' e 3' da quimera kDNA-DNA murino (Figura 14A e B).

Identificação dos Fenótipos de Células Imunes que Rejeitam o Coração na Doença de Chagas Experimental

A incubação das secções histológicas com anticorpos monoclonais mostrou a presença de subtipos de linfócitos T, mais frequentemente CD8⁺, nas áreas de lesões de fibras musculares cardíacas. Nos infiltrados linfocitários são identificados *subsets* de CD8⁺ α e β e, também, linfócitos com fenótipos TCR β e $\gamma\delta$. Todos esses subtipos de linfócitos T CD8⁺ podem aderir a cardiomiócitos não parasitados, produzindo lise (Figura 15). Com esses resultados, foram usados marcadores de moléculas de superfície de linfócitos T CD8⁺ no sentido de identificar os subtipos de linfócitos citotóxicos que aderem às fibras cardíacas *in vitro*. Os resultados desses experimentos são consistentes com a teoria auto-imune que associa citotoxicidade timo-dependente e auto-imunidade no coração chagásico que rejeita suas fibras cardíacas não-parasitadas. A Figura 15 mostra os fenótipos dos principais clones de linfócitos citotóxicos que destroem células cardíacas na doença de Chagas experimental murina.

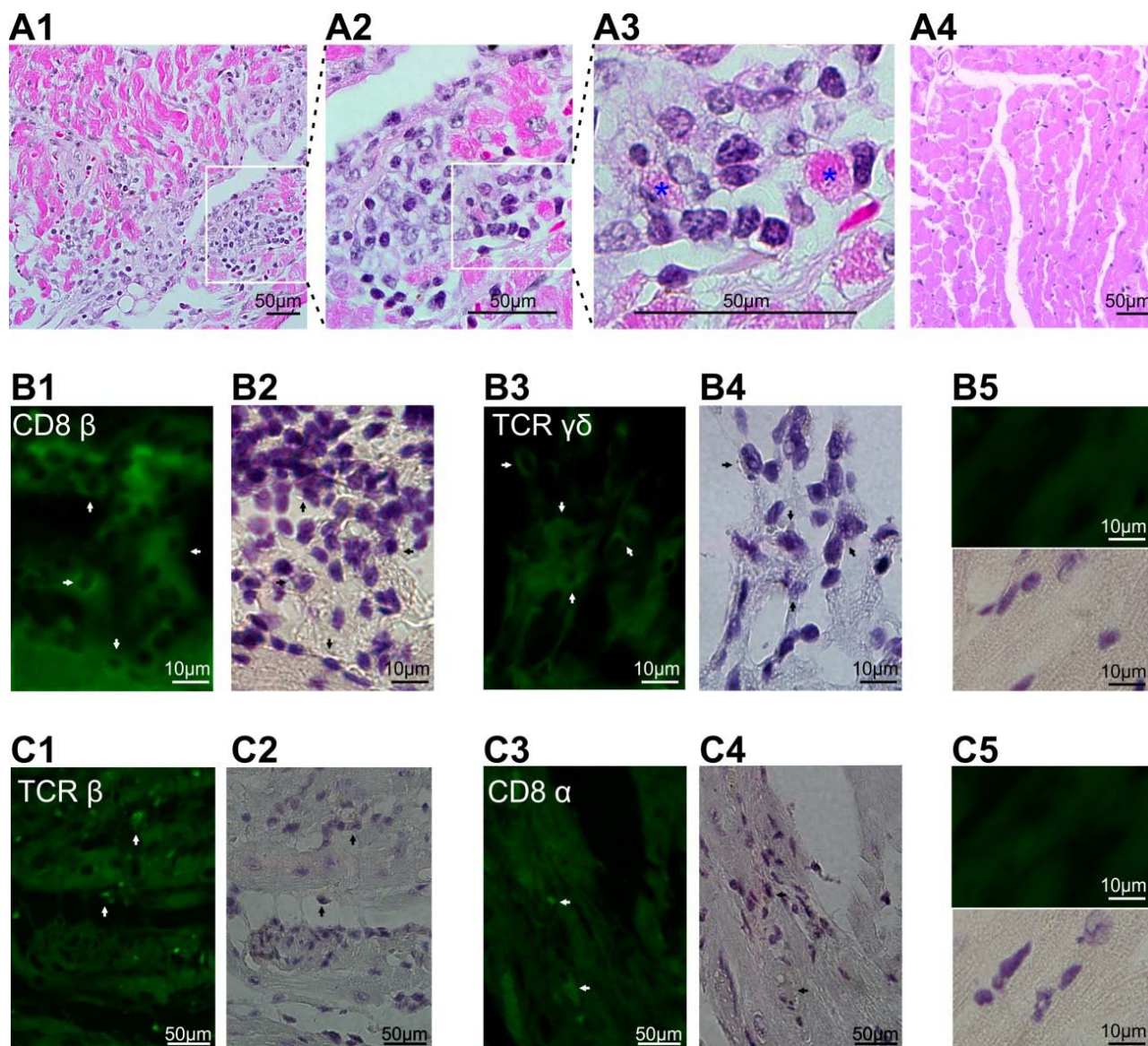


Figura 15. Aspectos histopatológicos da miocardiopatia inflamatória na doença de Chagas murina. A1: Miocardite com destruição de fibras por células mononucleares do sistema imune. **A2:** Unidades confluentes de rejeição na miocardite difusa. **A3:** Detalhes de unidades mínimas de rejeição onde se vêem restos de fibras musculares (asteriscos) destruídas pelas células imunes efetoras. **A4:** Histologia do coração de camundongo controle, normal. **B1:** Presença de linfócitos CD8 β em lesões de coração chagásico por identificados pelo anticorpo monoclonal específico. **B2:** Aspecto da mesma região corada pela hematoxilina. **B3:** Miocardite com linfócitos efetores CD8⁺TCR $\gamma\delta$ fenotipados pelo anticorpo monoclonal. **B4:** Mesma região corada pela hematoxilina. **B5:** Acima, Coração normal tratado com anticorpo anti-

CD8 fluoresceinado. Abaixo, mesma região corada com hematoxilina. **C1:** Infiltrado de linfócitos CD8⁺TCR β identificado pelo anticorpo monoclonal marcado com isotiocianato de fluoresceína. **C2:** Idem, coloração com hematoxilina. **C3:** Miocardite com células efetoras CD8 α marcadas pelo anticorpo monoclonal específico. **C4:** A mesma região corada com hematoxilina. **C5:** Acima, coração normal corado com anticorpo fluoresceinado anti-CD8 α . Abaixo, mesma região corada com hematoxilina.

Experimentos de Citotoxicidade *in vitro*

Adesão de Linfócitos e Lise de Célula Cardíaca de Feto de Camundongo Isogênico Sadio

A população de células imunes nos grupos de camundongos: i) chagásicos sem tratamento; ii) chagásicos tratados com benzonidazol; iii) Idem, tratados com o nitroderivado associado à zidovudina; iv) Idem, tratados com o nitroderivado mais ciprofloxacina; e, ainda, v) grupo controle sadio, foram usadas em experimentos de citotoxicidade. Os linfócitos dos grupos experimentais e controles foram obtidos do baço aos seis meses de idade, ou seja, sessenta dias após o tratamento. O total das células esplênicas de camundongo foi obtido pela dissecação do baço e filtração do *pool* de células em mechas de 70 μ m, conforme descrito em materiais e métodos. Alíquotas dessas células com fenótipos CD4⁺ e/ou CD8⁺ foram obtidas de camundongos chagásicos crônicos submetidos aos diferentes regimes terapêuticos, mediante seleção negativa utilizando *beads* magnéticas Miltenyi Biotec[®] (Vide métodos). No experimento controle foi empregado o mesmo protocolo de separação de linfócitos esplênicos de camundongos chagásicos.

Os linfócitos de chagásicos e controles foram então incubados com as fibras cardíacas singênicas em cultivo (proporção cardiomiócito: linfócito) 1: 10, pelo período de 12 horas. Após este período, as células no sobrenadante foram descartadas e as demais aderidas nas fibras cardíacas não foram removidas após duas lavagens em PBS, pH 7,4. Então, linfócitos e células cardíacas singênicas fortemente aderidos foram fixados em metanol. Depois da secagem

ao ar livre, as preparações foram coradas com eosina e, em seguida, tratadas com anticorpo monoclonal primário anti-CD8 ou anti-CD4, e, posteriormente marcados com anticorpo secundário acoplado a fluorocromo Cy3.

Nesses experimentos as subpopulações de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ de camundongos chagásicos ou de controles sadios foram usadas para avaliar citotoxicidade de linfócitos efetores contra células cardíacas. Quando linfócitos CD4⁺ chagásicos foram empregados, raramente eram vistos aderidos na membrana dos cardiomiócitos. Entretanto, quando a mesma quantidade de linfócitos T CD8⁺ foi incubada com os cardiomiócitos, verificou-se intensa interação da célula efetora com o alvo (Figura 16A e B). Os resultados desses experimentos revelam que apenas linfócitos T CD8⁺ de chagásicos exibiram maior reconhecimento e lise da fibra cardíaca alvo. Esses experimentos também mostraram que linfócitos T CD8⁺ de camundongos tratados com combinação de benzonidazol com drogas que inibem a integração do kDNA *in vitro* também aderiram as fibras cardíacas de maneira idêntica àquela descrita para os grupos de camundongos chagásicos sem tratamento ou tratado apenas com benzonidazol. No experimento controle raramente eram encontrados linfócitos aderidos nas fibras cardíacas singênicas. Em resumo, apenas linfócito de camundongo chagásico adere e lisa célula alvo. Linfócitos não reativos eram eliminados durante as lavagens das lâminas com PBS. Os experimentos com células imunes de linfonodos axilares de camundongos chagásicos incubados com células cardíacas singênicas *in vitro* tiveram resultados similares àqueles obtidos com células esplênicas.

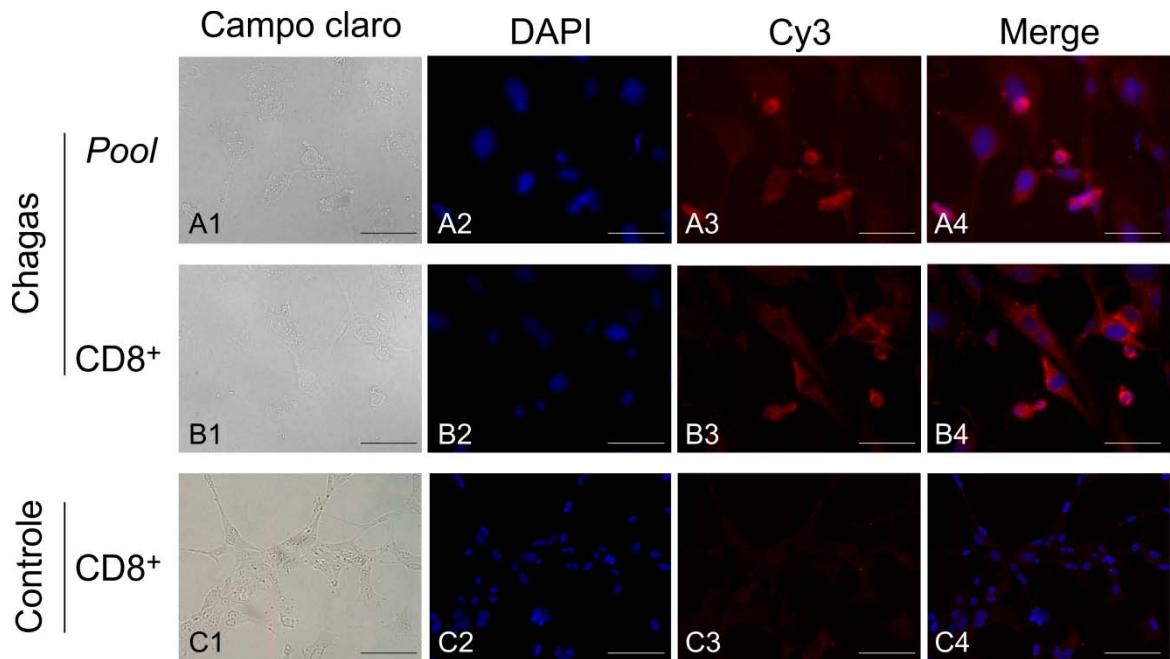


Figura 16. Aspectos da adesão e da destruição das fibras cardíacas de feto murino de 16 dias de gestação pelos linfócitos efetores de chagásicos singênicos *in vitro*. **A1:** Fibras de coração após três dias de cultivo. Fotografia em campo claro. **A2:** O mesmo campo mostra núcleos das células coradas com DAPI após incubação com células do baço de camundongo chagásico. **A3:** Idem, tratadas com anticorpo monoclonal anti-CD8⁺ e marcadas com o fluorocromo Cy3. **A4:** *Merge* das imagens anteriores: azul, com DAPI; vermelho, Cy3. **B1:** Aspecto das fibras do coração de feto murino após três dias em cultivo. **B2:** O mesmo campo mostra núcleos azuis (DAPI) em cardiomiócitos e linfócitos CD8⁺ isolados de baço de camundongo chagásico. **B3:** Idem, identificadas em vermelho pelo anticorpo monoclonal anti-CD8 e marcado com o fluorocromo Cy3. **B4:** *Merge* do azul com vermelho nas imagens das células marcadas com DAPI e Cy3. **C1:** Campo claro mostrando fibras cardíacas de feto murino após três dias em cultivo. **C2:** Mesmo campo mostrando cor azul dos núcleos de cardiomiócitos marcados com DAPI após incubação com linfócitos CD8⁺ isolados do baço de camundongo controle, não-infectado. **C3:** Idem, identificadas com anticorpo monoclonal anti-CD8⁺ marcado com o fluorocromo Cy3. **C4:** *Merge* das imagens anteriores marcadas com DAPI e Cy3. Barra = 50 µm.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que camundongos BALB/c infectados pelo *T. cruzi* e tratados com benzonidazol, associado com inibidores de topoisomerase II e ciprofloxacina, não erradicam as infecções e, portanto, não curam a doença de Chagas. Foi interessante observar que o tratamento específico com o benzonidazol, na dose quatro vezes acima daquela usada para o tratamento da doença em humano, não curou as infecções e não evitou as lesões no coração dos animais chagásicos. Esses resultados mostram que o tratamento experimental de animais com o benzonidazol não melhora o prognóstico do chagásico. Ou seja, as lesões destrutivas no coração chagásico persistem e evoluem com as mesmas características de rejeição destrutivas nos animais chagásicos infectados-tratados e não-tratados.

A documentação da miocardiopatia em animais chagásicos com genoma modificado pelas mutações de kDNA de *T. cruzi* sustentam a hipótese original de que as modificações do genoma do chagásico podem explicar a patogênese da doença de Chagas (Figura 7). Em vista desses resultados, a teoria autoimune que sugere origem genética da patogênese da doença de Chagas tem reprodutibilidade experimental e não pode ser refutada.

Este estudo foi precedido pelo trabalho de Rosa (2005) que identificou drogas inibidoras de vias metabólicas específicas e preveniu a integração do kDNA parasita no genoma de macrófagos *in vitro*. Os inibidores AZT e CIPRO empregados neste estudo são encontrados em qualquer drogaria licenciada pela ANVISA. O AZT é intercalante de DNA que inibe a transcriptase reversa codificada pela ORF2 de LINE-1. Ciprofloxacina é inibidor de topoisomerase II de origem bacteriana, essencial para clivagem e decatenação de minicirculos durante a replicação intracelular das formas amastigotas do *T. cruzi*. Enfim, esses inibidores foram empregados em esquemas que combinaram benzonidazol com cada um deles, ou as três drogas foram administradas conjuntamente (Sá, 2008). As análises dos resultados mostraram que o tratamento multidrogas não teve efeito benéfico sobre o curso da infecção chagásica murina.

O benzonidazol administrado em dose quatro vezes acima daquela indicada para uso em humanos (10 mg/kg de peso) não eliminou a parasitemia, cujos níveis nos animais tratados ficaram mais baixos que no grupo infectado e não-tratado (Sá, 2008). Nos grupos experimentais tratados com benzonidazol houve queda da parasitemia, e era rara a observação de tripomastigotas em gota de sangue periférico examinada ao microscópico (Sá, 2008). De grande interesse, os animais nos grupos experimentais sobreviveram à infecção aguda e mantiveram os anticorpos específicos anti-*T. cruzi* ao longo de um ano de observação, mostrando que os diferentes esquemas terapêuticos não curaram a infecção chagásica (Sá, 2008).

Resultados similares foram verificados nos demais grupos de camundongos que receberam combinação de drogas durante o tratamento experimental (vide métodos). A associação de benzonidazol com CIPRO teve efeito similar ao tratamento apenas com a primeira droga, mas a associação do benzonidazol com AZT mostrou tendência a redução moderada da parasitemia. Por exemplo, a parasitemia no grupo de camundongos infectados e não-tratados teve picos de até $1,2 \times 10^7$ tripomastigotas/ml de sangue, enquanto que no grupo infectado e tratado com benzonidazol mais zidovudina a parasitemia (pico de 1×10^6 parasitos/ml) foi comparativamente baixa (Sá, 2008).

Considerando que os esquemas terapêuticos foram administrados apenas cinco dias após a infecção, o tratamento das infecções murinas com combinação de inibidores e altas doses de benzonidazol falhou espetacularmente. Mesmo porque, se os regimes terapêuticos tivessem eliminado o *T. cruzi* do sangue, acredita-se que teria sido possível evitar ou reduzir significativamente o número de mutações de kDNA nas células hospedeiras (Simoies-Barbosa e cols., 2006). Todavia, a terapia multidrogas não inibiu a integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma dos camundongos e, aparentemente, não produziu alteração no padrão de inserção dos minicírculos observado nos grupos experimentais infectados, tratados e não-tratados. Ao contrário do que se esperava, os resultados obtidos mostram que o tratamento da infecção pelo *T. cruzi* com benzonidazol em altas doses (Romanha e cols., 2002; Bustamante e cols., 2008), em combinação com inibidores de vias metabólicas específicas aqui utilizados, também não cura camundongos chagásicos.

A demonstração de integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de camundongos chagásicos foi feita com a inovação *tpTAIL*-PCR que é uma modificação da TAIL-PCR inicialmente descrita por Liu & Whittier (Liu e cols., 1995; Liu e Whittier, 1995). Com a modificação introduzida foi possível identificar diversos eventos de integração (Hecht e cols., 2010) do DNA exógeno no genoma humano. Os resultados obtidos com o uso da *tpTAIL*-PCR permitiram identificar vários *hotspots* de integração de kDNA e isso foi importante para obter vários pares de *primers* para melhorar o rendimento do método.

Num trabalho recente, Flegontova e cols. (2012) encontraram uma plethora de motivos ricos em A/C (34 a 35 nts) compartilhados entre o genoma de humanos e de minicírculos de *T. cruzi*. Esses autores não encontraram evidência sugestiva de integração de minicírculos de kDNA no genoma humano de referência (DNA haplóide de anglo-saxônico) e em 129 genomas de latino-americanos de origem colombiana, peruana e de outras nacionalidades disponibilizados pelo 1000 *Genomes Project*. Em vista desses achados, Flegontova e cols (2012) sugerem que, com base na variabilidade genômica disponível, a transferência lateral de kDNA e passagem dessas mutações para a prole não seria consequência comum da doença de Chagas, conforme publicado nos trabalhos dos pesquisadores da Universidade de Brasília (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010). A crítica dos pesquisadores da Universidade South Bohemia (Dubjovice, República Checa) parece ser injustificada por dois motivos: 1) Não informa se os 129 doadores de DNA de células haplóides são chagásicos ou descendentes de chagásicos; 2) Ao contrário do genoma de referência, considerado ainda não concluído mesmo com cobertura de sequências de 30 X, os demais genomas referidos naquela publicação (Flegontova e cols., 2012) possuem 5 a 7.2 coberturas e, portanto, não sustentam as conclusões imprudentes. Esses autores deveriam ter tomado uma medida de precaução se estivessem interessados em inocular o *T. cruzi* em *Mus musculus* e, posteriormente, investigar a possibilidade de encontrar o kDNA integrado no genoma dos animais chagásicos. Na ausência dos cuidados éticos indicados, pode-se afirmar que os pesquisadores da South Bohemia foram incautos. E, em vista dessa imprudência, que pode dificultar a apreciação crítica dos resultados deste trabalho e de outros do nosso grupo de

pesquisa, nós acreditamos que uma solução definitiva da questão será o sequenciamento completo do genoma de um chagásico brasileiro. A comunidade científica deveria estar interessada nesse projeto de construção coletiva do conhecimento que interessa ao chagásico. Então, o assunto precisa ser levado aos setores que fazem políticas de C&T no Brasil.

As críticas sobre os estudos em humanos mostram a importância de investigações em modelos animais que apresentam integrações de kDNA e desenvolvem doença de Chagas na ausência da infecção ativa pelo *T. cruzi*. Enquanto que o genoma diplóide humano possui entre 80 e 100 cópias ativas de L1 (Brouha, 2003), o número desses elementos ativos no genoma de camundongos de algumas linhagens é estimado em torno de 3000 (Goodier e cols., 2001). Além disso, as inserções *de novo* de L1 causadoras de doenças são mais frequentes em camundongos que em humanos (Ostertag e Kazazian, 2001). Em decorrência desse grande número de cópias de elementos LINE-1 em diferentes cromossomos murinos, não foi possível identificar os *loci* de integração em diversos eventos descritos aqui (vide Anexo I - Tabela Suplementar 1). O trabalho de Hecht e cols. (2010) mostra microhomologias ricas em A/C em três regiões (CSB 1, 2 e 3) da sequência conservada do kDNA. Tais microhomologias também estão presentes em vários sítios de múltiplos cromossomos do genoma de mamíferos. De grande interesse, esse achado explica o mecanismo de integração do DNA exógeno LkDT que foi descrito no homem, em coelho e em aves (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a). Porém, fragmentos idênticos de DNA hospedeiro associados ao kDNA estão dispersos em vários trechos do genoma do camundongo, e essa é uma característica inerente a esse modelo experimental. Esse achado explica porque não foi possível definir *hotspots* de integração do DNA exógeno nos cromossomos de *M. musculus* (Anexo I - Tabela suplementar 1).

Diferentemente da migração de *numts* da mitocôndria para o núcleo da célula, o DNA mitocondrial de *T. cruzi* que se integra no genoma nuclear deve migrar através da membrana externa do parasita, adentrando o citoplasma, e, depois atravessar longo corredor de organelas, até entrar no núcleo da célula hospedeira. Essas são barreiras físicas que necessitam de energia produzida na célula sob estresse da infecção, promovendo a viagem do DNA exógeno

para sua nova localização no genoma (Adamo e cols., 2008; Wang e cols., 2012). Lá chegando, a sequência exógena pode ser integrada em *hotspots* pré-existentes, visto que os motivos repetidos ricos em A/C, particularmente presentes na região de ORF2 de LINE-1, conduzem o DNA exógeno para o sítio de integração.

Diante dessas observações, resultantes de análises topológicas das integrações de kDNA no genoma, infere-se que o fenômeno LkDT não é aleatório. Pelo contrário, ainda que o elemento exógeno tenha vários caminhos alternativos, existe a limitação referente a uma gama de motivos A/C repetidos no genoma. Talvez seja essa a explicação para o fato de que na doença de Chagas observam-se processos autoimunes, mas neoplasias não são encontradas. De fato, a análise das sequências encontradas nos flancos das inserções revelou a presença de padrões, como mostra a Figura 14. Estas sequências recorrentes compreendem tanto trechos de regiões variáveis de kDNA como trechos de DNA do genoma hospedeiro. Isto sugere a existência de uma pressão de seleção sobre certa população de minicírculos de kDNA candidatos à inserção em sítios com características peculiares. Talvez, essa interpretação possa ser exemplificada com o andar do bêbado que, às vezes, leva a lugares não necessariamente pré-escolhidos. Em consequência dessa combinação de aleatoriedade (probabilidade) com orientação limitante tenta-se explicar porque as modificações genômicas introduzidas pelas mutações induzem doença autoimune chagásica e não outras, como o câncer. As circunstâncias fazem com que a limitação dos sítios de integração seja fator de restrição de alterações patológicas (Choi e cols., 2007; Feschotte, 2008; Faulkner e cols., 2009; Crow, 2010).

Em resumo, ao contrário de *numts* que integram quase sempre no genoma via maquinaria de *non-homologous end-joining* (NHEJ) em sítios de reparo de *double strand breaks* (DSBs) (Blanchard e Schmidt, 1996; Ricchetti e cols., 2004), a integração de sequências de kDNA mitocondrial de *T. cruzi* se faz via microhomologias situadas estrategicamente em retrotransposons LINE-1 e em regiões conservadas de minicírculos.

Adicionalmente, as análises realizadas via Blastn sempre mostraram alta similaridade entre as regiões variáveis de kDNA com regiões previamente depositadas pelo grupo de pesquisadores do nosso laboratório, o que significa

tanto um enriquecimento do número de integrações contendo regiões variáveis de kDNA de *T. cruzi* nos bancos de nucleotídeos, como também reforça o argumento sugerindo possível pressão de seleção anteriormente citada. Diante desses dados, postulou-se que as microhomologias, essenciais à integração do kDNA, estariam envolvidas com a maquinaria celular de reparo de DNA deflagrada em situações de intenso estresse celular, como ocorre durante infecções (Hecht e cols., 2010). Obviamente, há necessidade de experimentos que comprovem esta hipótese.

Os resultados que mostram integrações de kDNA em retrotransposons do genoma murino sugere que a patogênese da doença estaria relacionada com modificações genótípicas em clones de linfócitos citotóxicos (Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a), mas não requer que as mutações estejam situadas em regiões codificadoras do genoma. De acordo com essa interpretação, acredita-se que a passagem do linfócito T citotóxico de uma atividade fisiológica para a patológica dependeria de sinalizações intragenômicas resultantes das modificações pelas mutações de kDNA nas células efectoras que atacam e rejeitam o coração chagásico.

Em vista dos achados de mutações de kDNA para retransposons do genoma de camundongos chagásicos, o coração de camundongo apenas infectado com *T. cruzi*, ou infectado e tratado com benzonidazol, e, ainda coração de camundongo não-infectado, foi submetido ao estudo histopatológico. O exame microscópico das secções de coração mostrou miocardite com células imunes mononucleares aderidas as fibras cardíacas. Unidade mínima de rejeição era identificada pela adesão de linfócitos citotóxicos que invadem e produzem lise da célula cardíaca alvo. A fenotipagem das células efectoras revelou reação autoimune timo-dependente na qual linfócitos efetores CD8⁺ estão associadas com a lesão destrutiva da doença de Chagas. Porém, outros *subsets* de linfócitos T também são identificados no infiltrado inflamatório da miocardite chagásica murina. Linfócitos efetores com fenótipos CD8 α , CD8 β e, também, TCR β e $\gamma\delta$ estão presentes nas lesões. No sentido de avaliar a dinâmica da destruição da fibra cardíaca pelos linfócitos CD8⁺ foram conduzidos experimentos em células de coração de feto de camundongo singênico em cultivo. Os testes *in vitro* mostraram que, de fato, os

linfócitos T CD8⁺ são os principais efetores da destruição do coração chagásico.

A continuação do estudo mostrará tipos de mutações mais frequentemente encontradas nas subpopulações de linfócitos T efetores da lesão cardíaca na doença de Chagas murina. A identificação destas células autoreativas encaminharia uma possibilidade terapêutica mediante ablação dos clones de linfócitos geneticamente modificados. Certamente, vários caminhos devem ser abertos para que novas investigações levem ao tratamento eficaz da doença de Chagas (Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a).

Mais estudos são necessários para esclarecer o papel que algumas mutações podem ter na fisiopatologia da doença de Chagas, pois a frequência de mutações em elementos LINE-1 pode ser um referencial na busca dessas correlações (Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011b). As pesquisas publicadas recentemente (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011a) sugerem que a patogênese da doença de Chagas está associada com a rejeição autoimune do coração chagásico pelos clones de linfócitos citotóxicos genotipicamente modificados pelas mutações de kDNA. O esclarecimento do papel de cada mutação e do conjunto delas, causando alterações no genoma das células efectoras que destroem o coração chagásico, é crucial no entendimento da patogênese da doença.

PERSPECTIVAS

A informação obtida com os estudos conduzidos nesta Tese mostra que a infecção chagásica em *Mus musculus* cursa com alterações genômicas subseqüentes às integrações de kDNA em retrotransposons, particularmente em LINE-1 da família A. O estudo também mostra que os esquemas de tratamento das infecções chagásicas com droga tripanocida ou da combinação dessas com inibidor de transcriptase reversa (AZT) e de topoisomerase II (ciprofloxacina) não mudou o curso da infecção clínica. Os animais tratados tiveram marcadores imunológicos e moleculares similares àqueles obtidos nos grupos de animais infectados-não-tratados. No conjunto, essas observações mostram que não há tratamento satisfatório para a infecção chagásica murina e

que só a investigação científica poderá assegurar no futuro algum meio eficaz de tratamento da doença experimental e humana.

Particularmente, os resultados discutidos mostram que a falseabilidade da teoria auto-imune pode ser testada, mas sua reprodutibilidade nega a possibilidade da falseabilidade. Ou seja, ao tentar falsear a teoria autoimune da patogênese da doença de Chagas a pesquisa científica acabou por confirmá-la. Pois, os grupos de animais tratados não eliminaram a parasitemia e as integrações de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma murino ocorreu nas mesmas proporções nos grupos de animais infectados, tratado e não-tratado. Esses resultados mostram que a crítica da teoria auto-imune com base na argumentação de que o tratamento com o nitroderivado benzonidazol cura a doença de Chagas, não tem sustentação.

Todavia, uma perspectiva de tratamento da doença de Chagas tem sido considerada a partir da informação de que sua patogênese de origem genética é resultante de rejeição autoimune do tecido do hospedeiro. A esse respeito, o estudos aqui apresentado e outras publicações do nosso laboratório sugerem que clones de linfócitos citotóxicos, geneticamente modificados, estão associados com a destruição do coração chagásico. Com a informação produzida, duas abordagens podem ser tentadas para aliviar as manifestações clínicas e melhorar o prognóstico do chagásico. *i)* Produzir inibidores químicos ou anticorpos contra os clones de linfócitos que atacam o coração; *ii)* Transferir medula óssea de hospedeiro sadio para o chagásico com cardiopatia severa, arritmias e outros distúrbios que colocam em risco iminente a vida do paciente. Esta abordagem é semelhante àquela usada para tratamento de leucemia mielóide e também outras doenças autoimunes (Good e cols., 1983; Annaloro e cols., 2009; Ko e cols., 2010; Fisher-Shoval e cols., 2012; Nasa e cols., 2012; Shin e cols., 2012; Taddio e cols., 2012). Ou seja, a medula óssea doente deve ser destruída com drogas, citostática e antimetabólica, antes de fazer o enxerto da medula sadia, histocompatível, do doador para o chagásico. Certamente, esta guinada de 180° na abordagem estratégica que visa ao tratamento das manifestações clínicas graves em chagásicos crônicos, ainda deve ser robustecida pela crítica antes que, finalmente, caia na apreciação de todos que visam alcançar algum benefício para aliviar o sofrimento de chagásicos sem perspectiva de longa sobrevivência. De fato, estudos já sugerem efeito

benéfico do transplante de medula óssea singênica para camundongos chagásicos, com redução da inflamação e fibrose intersticial (Soares e cols., 2004; Goldenberg e cols., 2008).

Não obstante o conjunto de dados e informações sobre uma possível origem genética da patogênese da doença de Chagas (Nitz e cols., 2004; Hecht e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011b), ainda persistem dúvidas sobre os fatores reguladores da auto-imunidade, mas que poderão ser esclarecidas nos próximos estudos que adicionarão mais informações ao conhecimento já disponível. Aqui, é necessário o exame da proposta de uma mudança paradigmática que propõe interpretação nova sobre a patogênese da doença de Chagas, mediante substituição do binômio “parasito-doença” por uma teoria que sugere o parasito seja apenas o indutor de modificação genética que promove uma reação aos tecidos próprios culminando na destruição do coração chagásico. Ademais, o conhecimento sobre filosofia da ciência nos ensina que mudanças paradigmáticas são feitas com apoio de muitas experimentações, inclusive aquelas que foram planejadas e executadas nesta Tese de Doutorado, na tentativa de negação da nossa nova teoria (Popper, 1963). Finalmente, o conhecimento antigo, convencional, sobre a patogênese da doença de Chagas já pode ser descartado, pois, nós mostramos que o tratamento específico da infecção pelo *T. cruzi* com o nitroderivado benzonidazol não eliminou sintomas clínicos da doença e tampouco preveniu a patologia da Chagas. Este conhecimento poderá avançar quando houver uma droga efetiva na erradicação das infecções pelo *T. cruzi*. Então, será possível verificar se os mamíferos que erradicarem a infecção mediante tratamento desenvolverão a doença de Chagas com características semelhantes às aquelas descritas em *Gallus gallus* refratário ao *T. cruzi*.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMO, A.; PINNEY, J. W.; KUNOVA, A.; WESTHEAD, D. R.; MEYER, P. **Heat stress enhances the accumulation of polyadenylated mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS One*, V. 3, N. 8, P. E2889, 2008.
2. ADEY, N. B.; SCHICHMAN, S. A.; GRAHAM, D. K.; PETERSON, S. N.; EDGELL, M. H.; HUTCHISON, C. A., 3rd. **Rodent L1 evolution has been driven by a single dominant lineage that has repeatedly acquired new transcriptional regulatory sequences.** *Molecular Biology And Evolution*, V. 11, N. 5, P. 778-89, 1994.
3. ADEY, N. B.; SCHICHMAN, S. A.; HUTCHISON, C. A., 3rd; EDGELL, M. H. **Composite Of A and F-Type 5' terminal sequences defines a subfamily of mouse LINE-1 elements.** *Journal of Molecular Biology*, V. 221, N. 2, P. 367-73, 1991.
4. AFFRANCHINO, J. L.; SANCHEZ, D. O.; ENGEL, J. C.; FRASCH, A. C.; STOPPANI, A. O. ***Trypanosoma cruzi*: structure and transcription of kinetoplast DNA maxicircles of cloned stocks.** *The Journal of Protozoology*, V. 33, N. 4, P. 503-7, 1986.
5. AHMED, Z. M.; SMITH, T. N.; RIAZUDDIN, S.; MAKISHIMA, T.; GHOSH, M.; BOKHARI, S.; MENON, P. S.; DESHMUKH, D.; GRIFFITH, A. J.; FRIEDMAN, T. B.; WILCOX, E. R. **Nonsyndromic Recessive Deafness DFNB18 And Usher Syndrome Type IC are Allelic Mutations of USHC.** *Human Genetics*, V. 110, N. 6, P. 527-31, 2002.
6. AKAGI, K.; LI, J.; STEPHENS, R. M.; VOLFOVSKY, N.; SYMER, D. E. **Extensive Variation Between Inbred Mouse Strains Due to Endogenous L1 Retrotransposition.** *Genome Research*, V. 18, N. 6, P. 869-80, JUN 2008.
7. ALCAIDE P., FRESNO M. **The *Trypanosoma cruzi* membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin.** *International Immunology*, V. 16, P. 1365-75, 2004.
8. ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-**

- BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Research*, V. 25, N. 17, P. 3389-402, 1997.
9. AMES, C. T.; QUAN, S. F.; RYCKMAN, R. E. **Triatominae in experimental transmission of plague.** *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, V. 3, N. 5, P. 890-6, 1954.
 10. ANDERSSON, J. O. **Lateral gene transfer in eukaryotes.** *Cellular And Molecular Life Sciences*, V. 62, N. 11, P. 1182-97, JUN 2005.
 11. ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. **Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells.** *The Journal Of Experimental Medicine*, V. 200, N. 9, P. 1135-43, 2004.
 12. ANDRADE, S. G.; FREITAS, L. A.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A. R.; SADIGURSKY, M. **Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice.** *Bulletin Of The World Health Organization*, V. 69, N. 2, P. 191-7, 1991.
 13. ANDRADE, S. G.; MESQUITA, I. M.; JAMBEIRO, J. F.; SANTOS, I. F.; PORTELLA, R. S. **Treatment with benznidazole in association with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: investigation into the possible development of neoplasias.** *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, V. 36, N. 4, P. 441-7, 2003.
 14. ANNALORO, C.; ONIDA, F.; LAMBERTENGHI DELILIERIS, G. **Autologous hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases.** *Expert Review Of Hematology*, V. 2, N. 6, P. 699-715, 2009.
 15. ARGIBAY P. F.; DI NOIA J. M.; HIDALGO A.; MOCETTI E.; BARBICH M, LORENTI A. S.; BUSTOS D.; TAMBUTTI M.; HYON S. H.; FRASCH A. C.; SÁNCHEZ D. O. ***Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible.** *Glycobiology*, V. 12, N. 1, P. 25-32, 2002.
 16. AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E., JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. **A 9,000-year record of**

- Chagas' disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, V. 101, N. 7, P. 2034-9, 2004.
17. 15. BAFICA A., SANTIAGO H. C., GOLDZMID R., ROBERT C., GAZZINELLI R. T., SHER A. **Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of Immunology*, V. 177, P. :3515-19, 2006.
 18. BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; CANCADO, J. R.; FERRARI, T. C.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; MOREIRA, M. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago.** *The Journal of Infectious Diseases*, V. 182, N. 2, P. 634-8, 2000.
 19. BAHN, P. G. ARCHAEOLOGY. **50,000-year-old americans of pedra furada.** *Nature*, V. 362, N. 6416, P. 114-5, 1993.
 20. BERLO, S. E.; GUICHELAAR, T.; TEN BRINK, C. B.; VAN KOOTEN, P. J.; HAUET-BROEREN, F.; LUDANYI, K.; VAN EDEN, W.; BROEREN, C. P.; GLANT, T. T. **Increased arthritis susceptibility in cartilage proteoglycan-specific T cell receptor-transgenic mice.** *Arthritis and Rheumatism*, V. 54, N. 8, P. 2423-33, 2006.
 21. BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. ***Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States.** *Clinical Microbiology Reviews*, V. 24, N. 4, P. 655-81, 2011.
 22. BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. **Actively acquired tolerance of foreign cells.** *Nature*, V. 172, N. 4379, P. 603-6, 1953.
 23. BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. **Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of Immunology*, V. 181, N. 4, P. 2644-50, 2008.
 24. BLANCHARD, J. L.; SCHMIDT, G. W. **Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns.** *Molecular Biology and Evolution*, V. 13, N. 3, P. 537-48, 1996.
 25. BLUM, B.; STURM, N. R.; SIMPSON, A. M.; SIMPSON, L. **Chimeric gRNA-mRNA molecules with oligo(U) tails covalently linked at**

- sites of RNA editing suggest that U addition occurs by transesterification.** *Cell*, V. 65, N. 4, P. 543-50, 1991.
26. 23. BOCCHI, E. A.; HIGUCHI, M. L.; VIEIRA, M. L.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; FIORELLI, A.; UIP, D.; JATENE, A.; PILEGGI, F. **Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease.** *The Journal of Heart and Lung Transplantation : The Official Publication of the International Society For Heart Transplantation*, V. 17, N. 4, P. 399-405, 1998.
 27. BORENSZTAJN, K.; CHAFA, O.; ALHENC-GELAS, M.; SALHA, S.; REGHIS, A.; FISCHER, A. M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J. **Characterization of two novel splice site mutations in human factor VII gene causing severe plasma factor VII deficiency and bleeding diathesis.** *British Journal of Haematology*, V. 117, N. 1, P. 168-71, 2002.
 28. BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. **Doença de Chagas aguda no município de Santana - Amapá.,** 2005a.
 29. _____. **Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina.** 2005b.
 30. _____. **[Brazilian Consensus on Chagas disease].** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, V. 38 SUPPL 3, P. 7-29, 2005.
 31. BRENER, Z. **Terapêutica experimental da doença de Chagas.** CANÇADO, I. J. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 7P. 1968.
 32. _____. **Biology of *Trypanosoma Cruzi*.** *Annual Review of Microbiology*, V. 27, P. 347-82, 1973.
 33. BROUHA, B., SCHUSTAK, J., BADGE, R. M., LUTZ-PRIGGE, S., FARLEY, A. H., MORAN, J. V., KAZAZIAN, H. H., JR. **Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, V. 100, N. 9, P. 5280-5, 2003.
 34. BURNET, M. **Auto-immunity and auto-immune disease.** Philadelphia, PA: F. A. Davis Company, 1972.

35. BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. **Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease.** *Nature Medicine*, V. 14, N. 5, P. 542-50, 2008.
36. CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; DA MATTA GUEDES, P. M.; BAHIA, M. T. **Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions.** *Parasitology Research*, V. 103, N. 2, P. 413-21, 2008.
37. CAMARGO, M. E.; SILVA, G. R.; CASTILHO, E. A.; SILVEIRA, A. C. **Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, V. 26, P. 12, 1984.
38. CAMPOS M. A., CLOSEL M., VALENTE E. P., CARDOSO J. E., AKIRA S., ALVARES-LEITE J. I., ROPERT C., GAZZINELLI R. T. **Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88.** *Journal of Immunology*, V. 172, P. 1711-18, 2004.
39. CANÇADO, J. R.; MARRA, U. D.; BRENER, Z. **Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, V. 6, P. 4, 1964.
40. CASTRO, A. M.; VINAUD, M. C.; TEIXEIRA, A. R. Chagas disease: a global health problem. **Emerging chagas disease.** TEIXEIRA, A. R. C., A.M.; VINAUD, M.C. New York, NY: Bentham Science Publishing: 6 P. 2009.
41. CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (american trypanosomiasis).** *Human & Experimental Toxicology*, V. 25, N. 8, P. 471-9, 2006.
42. CERBAN, F. M.; MOTRAN, C.; LADERACH, D.; GEA, S.; GRUPPI, A.; VOTTERO-CIMA, E. ***Trypanosoma cruzi*: immunological cross-reactivity of the major cysteinyl proteinase (cruzipain) with a**

- parasite cytosol acidic antigen (fiv).** *Acta Tropica*, V. 58, N. 3-4, P. 337-43, 1994.
43. CESTARI I.; ANSA-ADDO E.; DEOLINDO P.; INAL J. M.; RAMIREZ M. I. **Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles.** *Journal of Immunology*, V.188, N. 4, P. 1942-52, 2012.
 44. CHAGAS, C. **Neue trypanosomen. Vorläufige mitteilung.** *Archiv fur Schiffs und Tropen Hygiene*, V. 13, N. 4, P. 3, 1909a.
 45. _____. **Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 1, N. 2, P. 59, 1909b.
 46. CHALMERS, A. F. **What is this thing called science?** BRISBANE: QUEENSLAND UNIVERSITY PRESS, 1976.
 47. CHOI, I. S.; ESTECIO, M. R.; NAGANO, Y.; KIM DO, H.; WHITE, J. A.; YAO, J. C.; ISSA, J. P.; RASHID, A. **Hypomethylation of LINE-1 and Alu in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors).** *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy Of Pathology, Inc*, V. 20, N. 7, P. 802-10, 2007.
 48. COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 97, N. 1, P. 3-24, 2002.
 49. COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; SAAD, E. A.; MORTEL, R. E.; J.R., S. **Tentativa terapêutica com a nitrofurazona (furacin) na forma crônica da doença de Chagas.** *O Hospital*, V. 60, P. 4, 1961.
 50. COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; SILVA, J. R. **Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas.** *O Hospital*, V. 62, P. 7, 1962.
 51. CRISONA, N. J.; CLARK, A. J. **Increase in conjugational transmission frequency of nonconjugative plasmids.** *Science*, V. 196, N. 4286, P. 186-7, 1977.
 52. CROW, M. K. **Long interspersed nuclear elements (LINE-1): potential triggers of systemic autoimmune disease.** *Autoimmunity*, V. 43, N. 1, P. 7-16, 2010.

53. CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-b13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient.** *The Journal of Clinical Investigation*, V. 98, N. 8, P. 1709-12, 1996.
54. DAMATTA R. A.; SEABRA S. H.; DEOLINDO P.; ARNHOLDT A. C.; MANHAES L.; GOLDENBERG S. **Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism.** *FEMS Microbiology Letters*, V. 266, P. 29-33, 2007.
55. DE ARAUJO-JORGE, T. C. **The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 84, N. 4, P. 441-62, 1989.
56. DEBERARDINIS, R. J.; GOODIER, J. L.; OSTERTAG, E. M.; KAZAZIAN, H. H., JR. **Rapid amplification of a retrotransposon subfamily is evolving the mouse genome.** *Nature Genetics*, V. 20, N. 3, P. 288-90, 1998.
57. DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento.** *Quimica Nova*, V. 32, N. 9, P. 13, 2009.
58. DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. **Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic dna, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** *Experientia*, V. 44, N. 10, P. 880-1, 1988.
59. DIOTAIUTI, L. Triatomine-vector of *Trypanosoma cruzi* infection. **Emerging Chagas Disease.** TEIXEIRA, A. R., VINAUD, M.C., CASTRO, A.M. New York, NY: Bentham Science Publishers, 2009.
60. DOCAMPO, R. **Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.** *Chemico-Biological Interactions*, V. 73, N. 1, P. 1-27, 1990.
61. DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; MOTTLEY, C.; MUNIZ, R. P. **Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian**

- tissues.** *The Journal of Biological Chemistry*, V. 256, N. 21, P. 10930-3, 1981a.
62. DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. **Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*.** *Reviews of Infectious Diseases*, V. 6, N. 2, P. 223-38, 1984.
63. DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; STOPPANI, A. O. **Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 207, N. 2, P. 316-24, 1981b.
64. DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; STOPPANI, A. O.; LEON, W.; CRUZ, F. S.; VILLALTA, F.; MUNIZ, R. F. **Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Biochemical Pharmacology*, V. 30, N. 14, P. 1947-51, 1981c.
65. DOS SANTOS, P. V.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R. A.; MARINO, A. P.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. **Prevalence of cd8(+) α beta t cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(low)LFA-1(high)VLA-4(high) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules.** *Microbes and Infection*, V. 3, N. 12, P. 971-84, 2001.
66. DOWNIE, A. W. **Pneumococcal transformation--a backward view. Fourth Griffith memorial lecture.** *Journal of General Microbiology*, V. 73, N. 1, P. 1-11, 1972.
67. DUTRA, W. O.; DA LUZ, Z. M.; CANCADO, J. R.; PEREIRA, M. E.; BRIGIDO-NUNES, R. M.; GALVAO, L. M.; COLLEY, D. G.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G.; CARVALHO-PARRA, J. F. **Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy.** *Parasite Immunology*, V. 18, N. 11, P. 579-85, 1996.
68. DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. ***Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels.** *Experimental Parasitology*, V. 34, N. 2, P. 268-83, 1973.

69. EL-SAYED, N. M. E. A. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease.** *Science*, V. 309, N. 5733, P. 409-15, 2005.
70. FAULKNER, G. J.; KIMURA, Y.; DAUB, C. O.; WANI, S.; PLESSY, C.; IRVINE, K. M.; SCHRODER, K.; CLOONAN, N.; STEPTOE, A. L.; LASSMANN, T.; WAKI, K.; HORNIG, N.; ARAKAWA, T.; TAKAHASHI, H.; KAWAI, J.; FORREST, A. R.; SUZUKI, H.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D. A.; ORLANDO, V.; GRIMMOND, S. M.; CARNINCI, P. **The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells.** *Nature Genetics*, V. 41, N. 5, P. 563-71, 2009.
71. FAVARETTO, A. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIEIRA, C. L.; LAMANO-CARVALHO, T. L. **Pituitary-testicular axis in benznidazole-treated rats.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, V. 23, N. 8, P. 719-22, 1990.
72. FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence.** *FEMS microbiology reviews*, V. 36, N. 3, P. 734-47, 2012.
73. FERREIRA, R. C.; DE MELO, M. E.; MORAES JUNIOR, M. A.; FERREIRA, L. C. **Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, V. 21, N. 5, P. 1069-77, 1988.
74. FESCHOTTE, C. **Transposable elements and the evolution of regulatory networks.** *Nature Reviews Genetics*, V. 9, N. 5, P. 397-405, 2008.
75. FISHER-SHOVAL, Y.; BARHUM, Y.; SADAN, O.; YUST-KATZ, S.; BEN-ZUR, T.; LEV, N.; BENKLER, C.; HOD, M.; MELAMED, E.; OFFEN, D. **Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in the EAE mouse model of MS.** *Journal of Molecular Neuroscience*, 2012.
76. FIUZA, J. A.; FUJIWARA, R. T.; GOMES, J. A.; ROCHA, M. O.; CHAVES, A. T.; DE ARAUJO, F. F.; FARES, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; CANCADO, G. G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Profile of central and effector memory T**

- cells in the progression of chronic human Chagas disease.** *Plos Neglected Tropical Diseases*, V. 3, N. 9, P. E512, 2009.
77. FLEGONTOVA, O.; LUKES, J.; FLEGONTOV, P. **Lack of evidence for integration of *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA in south american human genomes.** *International Journal For Parasitology*, V. 42, N. 5, P. 437-41, 2012.
78. FRANZEN, O.; OCHAYA, S.; SHERWOOD, E.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; ANDERSSON, B. **Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio x10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener.** *Plos Neglected Tropical Diseases*, V. 5, N. 3, P. E984, 2011.
79. GIBSON, W. C.; MILES, M. A. **The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*.** *The EMBO Journal*, V. 5, N. 6, P. 1299-305, 1986.
80. GIRONES, N.; RODRIGUEZ, C. I.; CARRASCO-MARIN, E.; HERNAEZ, R. F.; DE REGO, J. L.; FRESNO, M. **Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease.** *The Journal of Clinical Investigation*, V. 107, N. 8, P. 985-93, 2001.
81. GOLDENBERG, R. C.; JELICKS, L. A.; FORTES, F. S.; WEISS, L. M.; ROCHA, L. L.; ZHAO, D.; CARVALHO, A. C.; SPRAY, D. C.; TANOWITZ, H. B. **Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model.** *The Journal of Infectious Diseases*, V. 197, N. 4, P. 544-7, 2008.
82. GOOD, R. A.; KAPOOR, N.; REISNER, Y. **Bone marrow transplantation--an expanding approach to treatment of many diseases.** *Cellular Immunology*, V. 82, N. 1, P. 36-54, 1983.
83. GOODIER, J. L.; OSTERTAG, E. M.; DU, K.; KAZAZIAN, H. H., JR. **A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse.** *Genome Research*, V. 11, N. 10, P. 1677-85, 2001.
84. GRIFFITH, F. **The significance of Pneumococcal types.** *The Journal of Hygiene*, V. 27, N. 2, P. 113-59, 1928.
85. GRISOTTO, M. G.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; MARINHO, C. R.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A.; ALVAREZ, J. M. **Most parasite-specific CD8+ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected**

- chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha and CD8 molecules. *Immunology*, V. 102, N. 2, P. 209-17, 2001.
86. GUIDON, N.; DELIBRIAS, G. **Carbon-14 dates point to man in the americas 32,000 years ago.** *Nature*, V. 321, P. 3, 1986.
 87. HAJDUK, S.; OCHSENREITER, T. **RNA editing in kinetoplastids.** *RNA Biology*, V. 7, N. 2, P. 229-36, 2010.
 88. HARDIES, S. C.; WANG, L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y.; CASAVANT, N. C.; HUANG, S. **LINE-1 (L1) lineages in the mouse.** *Molecular Biology and Evolution*, V. 17, N. 4, P. 616-28, 2000.
 89. HAZKANI-COVO, E.; ZELLER, R. M.; MARTIN, W. **Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (*numts*) in sequenced nuclear genomes.** *PLoS Genetics*, V. 6, N. 2, P. E1000834, 2010.
 90. HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. **Inheritance of DNA transferred from american trypanosomes to human hosts.** *PLoS One*, V. 5, N. 2, P. E9181, 2010.
 91. HEDGES, R. W.; JACOB, A. E. **Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons.** *Molecular & General Genetics*, V. 132, N. 1, P. 31-40, 1974.
 92. HERRMANN, R.; NEUGEBAUER, K.; ZENTGRAF, H.; SCHALLER, H. **Transposition of a DNA sequence determining kanamycin resistance into the single-stranded genome of bacteriophage FD.** *Molecular & General Genetics*, V. 159, N. 2, P. 171-8, 1978.
 93. HIGUCHI MDE, L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.** *Cardiovascular Research*, V. 60, N. 1, P. 96-107, 2003.
 94. IRIGOIN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHE, L.; RADI, R. **Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification.** *Free Radical Biology & Medicine*, V. 45, N. 6, P. 733-42, 2008.
 95. JONES, R. B.; GARRISON, K. E.; WONG, J. C.; DUAN, E. H.; NIXON, D. F.; OSTROWSKI, M. A. **Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors differentially inhibit human LINE-1 retrotransposition.** *PLoS One*, V. 3, N. 2, P. E1547, 2008.

96. KO, H. J.; KINKEL, S. A.; HUBERT, F. X.; NASA, Z.; CHAN, J.; SIATSKAS, C.; HIRUBALAN, P.; TOH, B. H.; SCOTT, H. S.; ALDERUCCIO, F. **Transplantation of autoimmune regulator-encoding bone marrow cells delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *European Journal of Immunology*, V. 40, N. 12, P. 3499-509, 2010.
97. KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. **Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and CENSOR.** *BMC Bioinformatics*, V. 7, P. 474, 2006.
98. KRISHNAMOORTHY, G.; SAXENA, A.; MARS, L. T.; DOMINGUES, H. S.; MENTELE, R.; BEN-NUN, A.; LASSMANN, H.; DORNMAIR, K.; KURSCHUS, F. C.; LIBLAU, R. S.; WEKERLE, H. **Myelin-specific t cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis.** *Nature Medicine*, V. 15, N. 6, P. 626-32, 2009.
99. KUHN, T. S. **The structure of scientific revolutions.** Chicago, IL: University Of Chicago Press, 1962.
100. LANGTRY, H. D.; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. ZIDOVUDINE. **A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy.** *Drugs*, V. 37, N. 4, P. 42, 1989.
101. LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C.; NITZ, N.; SIMOES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L.; TEIXEIRA, A. R. **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 63, N. 3-4, P. 111-8, 2000.
102. LEDERBERG, J.; CAVALLI, L. L.; LEDERBERG, E. M. **Sex compatibility in *Escherichia coli*.** *Genetics*, V. 37, N. 6, P. 720-30, 1952.
103. LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M.; ZINDER, N. D.; LIVELY, E. R. **Recombination analysis of bacterial heredity.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, V. 16, P. 413-43, 1951.
104. LEDERBERG, J.; TATUM, E. L. **Gene recombination in *Escherichia coli*.** *Nature*, V. 158, N. 4016, P. 558, 1946.

105. LEITE-DE-MORAES, M. C.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; MINOPRIO, P.; EISEN, H.; BANDEIRA, A. **Skewed V beta TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection.** *International Immunology*, V. 6, N. 3, P. 387-92, 1994.
106. LEON, J. S.; DANIELS, M. D.; TORIELLO, K. M.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. **A cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins.** *Infection and Immunity*, V. 72, N. 6, P. 3410-7, 2004.
107. LEON, J. S.; GODSEL, L. M.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. **Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease.** *Infection and Immunity*, V. 69, N. 9, P. 5643-9, 2001.
108. LEON, W.; FRASCH, A. C.; HOEIJMAKERS, J. H.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P.; BRUNEL, F.; DAVISON, J. **Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*.** *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 607, N. 2, P. 221-31, 1980.
109. LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E.; ENGLUND, P. T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *Trends in Parasitology*, V. 21, N. 8, P. 363-9, 2005.
110. LIU, H.; FU, Y.; JIANG, D.; LI, G.; XIE, J.; CHENG, J.; PENG, Y.; GHABRIAL, S. A.; YI, X. **Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes.** *Journal of Virology*, V. 84, N. 22, P. 11876-87, 2010.
111. LIU, Y. G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R. F. **Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR.** *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, V. 8, N. 3, P. 457-63, 1995.
112. LIU, Y. G.; WHITTIER, R. F. **Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking.** *Genomics*, V. 25, N. 3, P. 674-81, 1995.
113. LOEB, D. D.; PADGETT, R. W.; HARDIES, S. C.; SHEHEE, W. R.; COMER, M. B.; EDGELL, M. H.; HUTCHISON, C. A., 3rd. **The sequence of a large L1Md element reveals a tandemly repeated 5' end and several features found in retrotransposons.** *Molecular and Cellular Biology*, V. 6, N. 1, P. 168-82, 1986.

114. LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.** *Eukaryotic Cell*, V. 1, N. 4, P. 495-502, 2002.
115. MARTIN D. L.; WEATHERLY D. B.; LAUCELLA S. A.; CABINIAN M. A.; CRIM M. T.; SULLIVAN S.; HEIGES M.; CRAVEN S. H.; ROSENBERG C. S.; COLLINS M.H.; SETTE A.; POSTAN M.; TARLETON R. L. **CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes.** *PLoS Pathogens*, V. 2, N. 8, e77, 2006.
116. MASON, R. P.; HOLTZMAN, J. L. **The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 67, N. 4, P. 1267-74, 1975.
117. MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. ***Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives.** *Biochemical Pharmacology*, V. 65, N. 6, P. 999-1006, 2003.
118. MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative biochemistry and physiology. Part a,** *Molecular & Integrative Physiology*, V. 146, N. 4, P. 601-20, 2007.
119. MEARS, M. L.; HUTCHISON, C. A., 3rd. **The evolution of modern lineages of mouse L1 elements.** *Journal of Molecular Evolution*, V. 52, N. 1, P. 51-62, 2001.
120. MEDEIROS, G. A.; SILVERIO, J. C.; MARINO, A. P.; ROFFE, E.; VIEIRA, V.; KROLL-PALHARES, K.; CARVALHO, C. E.; SILVA, A. A.; TEIXEIRA, M. M.; LANNES-VIEIRA, J. **Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (met-rantes) results in amelioration of cardiac tissue damage.** *Microbes and Infection*, V. 11, N. 2, P. 264-73, 2009.
121. MENDES-DA-CRUZ, D. A.; DE MEIS, J.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SAVINO, W. **Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the**

- shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes and Infection*, V. 5, N. 10, P. 825-32, 2003.
122. MENNA-BARRETO, R.; SALOMÃO, K.; BARBOSA, H. S. **Bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi***. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. V 104 (Suppl I), 2009.
123. MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; FLIBOTTE, S.; TARLETON, R. L. **Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in trypanosoma cruzi strains revealed by array comparative genomic hybridization**. *BMC Genomics*, V. 12, P. 139, 2011.
124. MORENO, S. N.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEON, W.; STOPPANI, A. O. **Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 218, N. 2, P. 585-91, 1982.
125. MORSE, M. L.; LEDERBERG, E. M.; LEDERBERG, J. **Transduction in *Escherichia coli* K-12**. *Genetics*, V. 41, N. 1, P. 142-56, 1956.
126. MOURIER, T.; HANSEN, A. J.; WILLERSLEV, E.; ARCTANDER, P. **The human genome project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus**. *Molecular Biology and Evolution*, V. 18, N. 9, P. 1833-7, 2001.
127. NASA, Z.; CHUNG, J. Y.; CHAN, J.; TOH, B. H.; ALDERUCCIO, F. **Nonmyeloablative conditioning generates autoantigen-encoding bone marrow that prevents and cures an experimental autoimmune disease**. *American Journal of Transplantation*, 2012.
128. National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health. ***Trypanosoma cruzi* strain CL Brener**. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/15540>. Acesso em: 05-09-2011.
129. _____. ***Mus musculus* (laboratory mouse) genome view build 37.1**. 2007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=10090. Acesso em: 01-09-2008.
130. NEVES, D. P.; DE CASTRO, A. M. **[Behavior of *Trypanosoma cruzi* in various species of lizards]**. *Revista Brasileira de Biologia*, V. 30, N. 1, P. 111-4, 1970.

131. NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell*, V. 118, N. 2, P. 175-86, 2004.
132. NOGUEIRA, N.; COHN, Z. ***Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells.** *The Journal of Experimental Medicine*, V. 143, N. 6, P. 1402-20, 1976.
133. NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. ***Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts.** *Veterinary Research*, V. 40, N. 2, P. 26, 2009.
134. OCHIA, K.; YAMANAKA, T.; KIMURA, K.; SAWADA, O. **Inheritance of drug resistance (and its transfer) between *Shigella* strains and between *Shigella* and *E. Coli* strains.** *Hihon Iji Shimpou*, V. 1861, P. 34, 1959.
135. OLIVIERI, B. P.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; ARAUJO-JORGE, T. C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. **Benznidazole therapy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice blocks thymic involution and apoptosis of CD4+CD8+ double-positive thymocytes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, V. 49, N. 5, P. 1981-7, 2005.
136. OSTERTAG, E. M.; KAZAZIAN, H. H., JR. **Biology of mammalian L1 retrotransposons.** *Annual Review of Genetics*, V. 35, P. 501-38, 2001.
137. PADGETT, R. W.; HUTCHISON, C. A., 3rd; EDGELL, M. H. **The F-type 5' motif of mouse L1 elements: a major class of L1 termini similar to the A-type in organization but unrelated in sequence.** *Nucleic Acids Research*, V. 16, N. 2, P. 739-49, 1988.
138. PATTERSON, B. D. **Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on neotropical mammals.** *Biod. Letters*, V. 2, P. 8, 1994.
139. POPPER, K. **Conjectures and refutations: the growth of scientific knowledge.** First edition, New York, NY: Routledge, 1963.
140. PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** *The Lancet*, V. 1, N. 2, P. 92-100, 2001.

141. **Protocols and applications guide.** Third edition. PROMEGA Corporation, 1996.
142. RICCHETTI, M.; TEKAIA, F.; DUJON, B. **Continued colonization of the human genome by mitochondrial DNA.** *PLoS Biology*, V. 2, N. 9, P. E273, 2004.
143. ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. **Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure.** *The Journal of Infectious Diseases*, V. 186, N. 6, P. 823-8, 2002.
144. ROSA, A. C. **Inibição da transferência de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para a célula hospedeira.** 2005. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.
145. ROSSI, M. A. **Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis.** *Revista Paulista de Medicina*, V. 113, N. 2, P. 750-6, 1995.
146. ROUTH, A.; DOMITROVIC, T.; JOHNSON, J. E. **Host RNAs, including transposons, are encapsidated by a eukaryotic single-stranded RNA virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, V. 109, N. 6, P. 1907-12, 2012.
147. SÁ, A. A. **Tratamento multidrogas da doença de Chagas experimental.** 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.
148. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Third edition. New York, NY: Cold Spring Harbor Press, 2001.
149. SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. **The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** *The Journal of Experimental Medicine*, V. 140, N. 1, P. 38-53, 1974.
150. SANTOS, F. M.; LIMA, W. G.; GRAVEL, A. S.; MARTINS, T. A.; TALVANI, A.; TORRES, R. M.; BAHIA, M. T. **Cardiomyopathy**

- prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Nhgags' disease.** *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012.
151. SANTOS, S. J.; TAKAHASHI, C. S.; NATARAJAN, A. T. **Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells *in vitro*.** *Mutation Research*, V. 320, N. 4, P. 305-14, 1994.
 152. SCHICHMAN, S. A.; ADEY, N. B.; EDGELL, M. H.; HUTCHISON, C. A., 3rd. **L1 A-monomer tandem arrays have expanded during the course of mouse L1 evolution.** *Molecular Biology and Evolution*, V. 10, N. 3, P. 552-70, 1993.
 153. SCHICHMAN, S. A.; SEVERYNSE, D. M.; EDGELL, M. H.; HUTCHISON, C. A., 3rd. **Strand-specific LINE-1 transcription in mouse F9 cells originates from the youngest phylogenetic subgroup of LINE-1 elements.** *Journal of Molecular Biology*, V. 224, N. 3, P. 559-74, 1992.
 154. SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 102 SUPPL 1, P. 75-85, 2007.
 155. SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control.** *Trends in Parasitology*, V. 22, N. 12, P. 583-8, 2006.
 156. SHAPIRO, J. A. **Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of *Escherichia coli*.** *Journal of Molecular Biology*, V. 40, N. 1, P. 93-105, 1969.
 157. SHAW, J. M.; FEAGIN, J. E.; STUART, K.; SIMPSON, L. **Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons.** *Cell*, V. 53, N. 3, P. 401-11, 1988.
 158. SHEHEE, W. R.; CHAO, S. F.; LOEB, D. D.; COMER, M. B.; HUTCHISON, C. A., 3rd; EDGELL, M. H. **Determination of a functional ancestral sequence and definition of the 5' end of A-type mouse L1 elements.** *Journal of Molecular Biology*, V. 196, N. 4, P. 757-67, 1987.
 159. SHIN, C. R.; KIM, M. O.; LI, D.; BLEESING, J. J.; HARRIS, R.; MEHTA, P.; JODELE, S.; JORDAN, M. B.; MARSH, R. A.; DAVIES, S. M.; FILIPOVICH, A. H. **Outcomes following hematopoietic cell**

- transplantation for wiskott-aldrich syndrome.** *Bone Marrow Transplantation*, 2012.
160. SIMOES-BARBOSA, A.; ARGANARAZ, E. R.; BARROS, A. M.; ROSA, A. C.; ALVES, N. P.; LOUVANDINI, P.; D'SOUZA-AULT, M. R.; NITZ, N.; STURM, N. R.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. **Hitchhiking trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 101, N. 8, P. 833-43, 2006.
161. SIMOES-BARBOSA, A.; BARROS, A. M.; NITZ, N.; ARGANARAZ, E. R.; TEIXEIRA, A. R. **Integration of trypanosoma cruzi kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in chagas disease patients.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 94 SUPPL 1, P. 249-52, 1999.
162. SIMPSON, L. **Structure and function of kinetoplast DNA.** *The Journal of Protozoology*, V. 20, N. 1, P. 2-8, 1973.
163. SOARES, M. B.; LIMA, R. S.; ROCHA, L. L.; TAKYIA, C. M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DE CARVALHO, A. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice.** *The American Journal of Pathology*, V. 164, N. 2, P. 441-7, 2004.
164. SOUZA, W. Novel cell biology of trypanosoma cruzi. IN: **american trypanosomiasis world class parasites.** Boston: Springer, 2003.
165. STANHOPE, M. J.; LUPAS, A.; ITALIA, M. J.; KORETKE, K. K.; VOLKER, C.; BROWN, J. R. **Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfers from bacteria to vertebrates.** *Nature*, V. 411, N. 6840, P. 940-4, 2001.
166. STOJAKOVIC, M.; TATARI-CALDERONE, Z.; MARIC, C.; HOANG, A.; VUKMANOVIC, S. **Paradoxical arrest in lupus activity in BXSB mice with highly autoreactive T cells.** *LUPUS*, V. 19, N. 2, P. 182-91, 2010.
167. STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. **Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi.** *International Journal for Parasitology*, V. 33, N. 3, P. 269-79, 2003.

168. SYVANEN, M. **Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution.** *Journal of Theoretical Biology*, V. 112, N. 2, P. 333-43, 1985.
169. TADDIO, A.; BIONDI, A.; PISCIANZ, E.; VALENCIC, E.; BIAGI, E.; BADOLATO, R. **From bone marrow transplantation to cellular therapies: possible therapeutic strategies in managing autoimmune disorders.** *Current Pharmaceutical Design*, 2012.
170. TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. **Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients.** *The Journal of Experimental Medicine*, V. 179, N. 3, P. 1017-22, 1994.
171. TEIXEIRA, A. R.; ARGANARAZ, E. R.; FREITAS, L. H., JR.; LACAVA, Z. G.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mutation Research*, V. 305, N. 2, P. 197-209, 1994.
172. TEIXEIRA, A. R.; CORDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I.; SOLORZANO, E. **Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 43, N. 2, P. 146-58, 1990a.
173. TEIXEIRA, A. R.; CUNHA NETO, E.; RIZZO, L. V.; SILVA, R. **Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits.** *The Journal of Infectious Diseases*, V. 162, N. 6, P. 1420, 1990b.
174. TEIXEIRA, A. R.; GOMES, C.; LOZZI, S. P.; HECHT, M. M.; ROSA, A. C.; MONTEIRO, P. S.; BUSSACOS, A. C.; NITZ, N.; MCMANUS, C. **Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health.** *Cadernos de Saude*, V. 25 SUPPL 1, P. S32-44, 2009.
175. TEIXEIRA, A. R.; GOMES, C.; NITZ, N.; SOUSA, A. O.; ALVES, R. M.; GUIMARO, M. C.; CORDEIRO, C.; BERNAL, F. M.; ROSA, A. C.; HEJNAR, J.; LEONARDECZ, E.; HECHT, M. M. ***Trypanosoma cruzi* in the chicken model: chagas-like heart disease in the absence of parasitism.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 5, N. 3, P. E1000, 2011a.

176. TEIXEIRA, A. R.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. **Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity.** *Clinical Microbiology Reviews*, V. 24, N. 3, P. 592-630, 2011b.
177. TEIXEIRA, A. R.; LACAVA, Z.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **[Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection].** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, V. 24, N. 1, P. 55-8, 1991.
178. TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. **Evolution and pathology in Chagas disease--a review.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 101, N. 5, P. 463-91, 2006.
179. TEIXEIRA, A. R.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J. M.; RIZZO, L. V. **Malignant, non-hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes.** *Journal of Comparative Pathology*, V. 103, N. 1, P. 37-48, 1990c.
180. TEKIEL, V.; OLIVEIRA, G. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; SANCHEZ, D.; GONZALEZ-CAPPA, S. M. **Chagas' disease: TCRBV9 over-representation and sequence oligoclonality in the fine specificity of T lymphocytes in target tissues of damage.** *Acta Tropica*, V. 94, N. 1, P. 15-24, 2005.
181. TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. **Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, V. 96, N. 1-2, P. 167-76, 1998.
182. THALMANN, O.; HEBLER, J.; POINAR, H. N.; PAABO, S.; VIGILANT, L. **Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes.** *Molecular Ecology*, V. 13, N. 2, P. 321-35, 2004.
183. THANGARAJ, K.; JOSHI, M. B.; REDDY, A. G.; RASALKAR, A. A.; SINGH, L. **Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility.** *Journal of Andrology*, V. 24, N. 3, P. 388-92, 2003.
184. THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap**

- penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*, V. 22, N. 22, P. 4673-80, 1994.
185. TIMMIS, J. N.; AYLIFFE, M. A.; HUANG, C. Y.; MARTIN, W. **Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes.** *Nature Reviews Genetics*, V. 5, N. 2, P. 123-35, 2004.
186. TORRES, C. M. **Patogenia de la miocarditis cronica en la enfermedad de Chagas.** *Soc Argent Patol Reg Nort Quinta Reun*, V. 2, P. 1, 1930.
187. TORRI, A. F.; CARPENTER, L. R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast dna replication. In: Depamphilis, m. L. (ED.). **DNA replication in eukaryotic cells.** New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.31, 1996. p.1029-1042.
188. TOURMEN, Y.; BARIS, O.; DESSEN, P.; JACQUES, C.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P. **Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes.** *Genomics*, V. 80, N. 1, P. 71-7, 2002.
189. TYLER, K. M.; LUXTON, G. W.; APPLEWHITE, D. A.; MURPHY, S. C.; ENGMAN, D. M. **Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *Cellular Microbiology*, V. 7, N. 11, P. 1579-91, 2005.
190. VAN DER KUYL, A. C.; KUIKEN, C. L.; DEKKER, J. T.; PERIZONIUS, W. R.; GOUDSMIT, J. **Nuclear counterparts of the cytoplasmic mitochondrial 12s rRNA gene: a problem of ancient DNA and molecular phylogenies.** *Journal of Molecular Evolution*, V. 40, N. 6, P. 652-7, 1995.
191. VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. **Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, V. 138, N. 1, P. 131-41, 2004.
192. VIANNA, G. O. **On pathologic anatomy on Chagas disease.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 3, P. 18, 1911.
193. WALTON, M. I.; BLEEHEN, N. M.; WORKMAN, P. **Stimulation by localized tumor hyperthermia of reductive bioactivation of 2-**

- nitroimidazole benznidazole in mice.** *Cancer Research*, V. 49, N. 9, P. 2351-5, 1989.
194. WALTON, M. I.; WORKMAN, P. **Nitroimidazole bioreductive metabolism. Quantitation and characterisation of mouse tissue benznidazole nitroreductases *in vivo* and *in vitro*.** *Biochemical Pharmacology*, V. 36, N. 6, P. 887-96, 1987.
195. WANG, D.; LLOYD, A. H.; TIMMIS, J. N. **Environmental stress increases the entry of cytoplasmic organellar DNA into the nucleus in plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, V. 109, N. 7, P. 2444-8, 2012.
196. WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. **Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome.** *BMC Genomics*, V. 10, P. 255, 2009.
197. WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. ***Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region.** *BMC Genomics*, V. 7, P. 60, 2006.
198. World Health Organization. **Control of Chagas disease. Second report of a who expert committee.** p. 905 2002.
199. _____. **Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico.** 2005 - Atualizado em 2007.
200. WOOLSEY, A. M.; BURLEIGH, B. A. **Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments.** *Cellular Microbiology*, V. 6, N. 9, P. 829-38, 2004.
201. YAO, Y. G.; KONG, Q. P.; SALAS, A.; BANDELT, H. J. **Pseudomitochondrial genome haunts disease studies.** *Journal of Medical Genetics*, V. 45, N. 12, P. 769-72, 2008.
202. YOSHIDA, N. **Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 104 SUPPL 1, P. 101-7, 2009.
203. ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. **Effect of topoisomerase inhibitors and dna-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma***

cruzi. *International Journal of Antimicrobial Agents*, V. 37, N. 5, P. 449-56, 2011.

ANEXO I

Tabela Suplementar 6. Integrações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de camundongos chagásicos crônicos.

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
B ₁ 120 IV	AC 116	kDNA	gb DQ873362	282-387	42.76 (46)	29/32 (90%)	1.60e-03	GTGCATCTCACCCGTACA	6
		Hospedeiro	gb AC153997.3	1-299	499.02 (552)	286/292 (97%)	9.38e-139		
B ₁ (30) II	AC 120	kDNA	gb M19188.1	61-179; 232-350	188 (208)	114/119 (95%)	2,00E-47	CCCTCCCAAACCAA	X
		Hospedeiro	dbj AK154459.1	1-54; 165-225; 336-396	96.9 (106)	58/61 (95%)	1,00E-17		
			gb BX119986	426-451	48.2 (52)	26/26 (100%)	6.55e-03		
	AC 122	kDNA	gb M19188.1	55-172; 225-341; 395-512; 548-569; 622-740	199 (220)	115/118 (97%)	1.95e-50	CCCTCCCAAACCAA	Não foi possível definir
		Hospedeiro	dbj AK154459.1	10-69; 179-239; 349-409; 576-636; 747-806	105 (116)	58/61 (95%)	5,00E-20		
	AC 124	kDNA	gb M19188.1	265-453	167.19 (184)	109/119 (91%)	6.59e-41	TAACAAAATCAGAACTGAATAGACCAAT AACAGGCTCTGA	Y
		Hospedeiro	gb AC239834.3	1-304	493 (546)	279/283 (99%)	3,00E-136		
	AC 127	kDNA	gb M19188.1	74-192; 306-423; 476-593	196 (216)	114/118 (97%)	2,00E-46	CCCTCCCAAACCAA	Não foi possível definir
		Hospedeiro	dbj AK154459.1	7-67;178-238;409-469;579-613	102 (112)	59/61 (96%)	4,00E-19		
	AC 128	kDNA	gb M19188.1	74-192; 245-363; 416-534	176 (194)	111/119 (93%)	2,00E-40	CCCTCCCAAACCAA / AATCGAACC	7
		Hospedeiro	gb AC140370.3	656-738	138 (152)	81/83 (97%)	7,00E-30		
	AC 130	kDNA	gb M19188.1	36-61; 114-230; 283-356	174 (192)	110/118 (93%)	3,00E-40	TTTTAGG / CCCTCCCAAACCAA / AACCCCAATCGAACCCCC	Não foi possível definir
Hospedeiro		gb AC157582.3	93-153; 262-322	102 (112)	32/34 (94%)	3,00E-19			
AC 131	kDNA	gb M19188.1	66-184; 237-258	167 (184)	108/119 (90%)	6,00E-41	ACCAACCCCAATCGAACC	14	
	Hospedeiro	gb AC141884.4	200-409	345 (382)	205/212 (96%)	2,00E-91			
AC 132	Hospedeiro	emb AL772233	247-442	327 (362)	184/186 (98%)	4.05e-87	CCCTCCCAAACCAA /	4	

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
			emb AL732597	22-66	77.28 (84)	44/45 (97%)	1.16e-11	CCAATCGAACCC	
	AC 133	kDNA	gb M19188.1	43-161	185 (204)	113/119 (94%)	1.04e-46		
		Hospedeiro	gb AL591854	12-48	62 (68)	36/37 (97%)	1.09e-07	TACACC	2
	AC 134	kDNA	gb AF241158	229-263	59 (64)	34/35 (97%)	2.29e-08		
			gb EU088393	1-38; 207-260; 313-333	54 (58)	39/44 (88%)	9.75e-07		
		Hospedeiro	gb AC110525	205-304; 400-424	91.5 (100)	50/50 (100%)	5.05e-16	CCCCAATCGAACCC / CC	17
			gb AC073761	344-412	120 (132)	68/69 (98%)	1.04e-24		
	AC 135	kDNA	gb AJ748048	194-249	61 (66)	49/57 (85%)	5.45e-09		
		Hospedeiro	gb AC115877.13	237-290; 305-356	89.7 (98)	52/54 (96%)	1.46e-15	CCCCAATCGAACCC / CCCCCAATCGAACCC	Não foi possível definir
			gb AC113078.17	238-290; 309-356	87.8 (96)	51/53 (96%)	5.09e-15		
B ₂ (30) II	AC 136	kDNA	gb AY169974.1	1-36	57.19 (62)	34/36 (94%)	5.21e-08		
			gb DQ835657	211-244	54 (58)	32/34 (94%)	6.34e-07		
		Hospedeiro	gb AC154661	236-285	86 (94)	49/50 (98%)	1.39e-14	CCCCAATCGAACCC	Não foi possível definir
			gb AC117588	232-285	84 (92)	51/54 (94%)	4.84e-14		
	AC 139	kDNA	gb M19188.1	444-561	199 (220)	115/118 (97%)	1.87e-50		
		Hospedeiro	gb AC113979	13-305	515 (570)	290/293 (98%)	2.45e-143	-	12
	AC 140	kDNA	gb AJ747978	1-23; 121-180 ; 236-256; 350-369	109.5 (120)	60/60 (100%)	1.25e-23		
		Hospedeiro	gb AC107756.9	38-97; 239-332	156 (172)	91/94 (96%)	9,00E-35	ATAA / ACCAACCCCAATCGAACCC	Não foi possível definir
C ₂ (30) II	AC 142	kDNA	gb M19188.1	628-746;416-436;346-369	201 (222)	116/119 (97%)	7,00E-51		
		Hospedeiro	gb AC161243.2	557-905; 495-522;303-326;450-473;365-387;281-303	601 (666)	342/349 (97%)	2,00E-168	TAGT	12
B ₁ (60) II	AC 144	kDNA	emb AJ747941.1	266-331; 367-429; 482-502	96.9 (106)	59/63 (93%)	6,00E-20		
			gb M19188.1	311-429; 482-507	170 (188)	110/119 (92%)	3,00E-42	AACAAAATCAGAACTGAATAG	Não foi possível definir
		Hospedeiro	gb AC166816.2	1-286; 521-542	482 (534)	279/287 (97%)	3,00E-134		

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
B1 (120) II	AC 148	kDNA	gb AC132267.3	1-286; 521-542	482 (534)	279/287 (97%)	3,00E-134	CCCCTCCCAAAACCAAA / CCCCTCCCAAGACTAA / TTGGTTTTGGGAGGG	Não foi possível definir
			gb AC155294.2	1-286; 521-543	483 (534)	279/287 (97%)	3,00E-134		
	Hospedeiro	gb M19188.1	74-192	179 (198)	112/119 (94%)	3,00E-42			
		dbj AK154459.1	7-67; 178-236; 234-258	107 (118)	59/59 (100%)	3,00E-21			
	AC 150	kDNA	dbj AK144009.1	7-70; 178-236	89.7 (98)	55/59 (93%)	7,00E-16		
			gb M19188.1	36-91; 114-187	116 (128)	70/74 (94%)	3,00E-23		
Hospedeiro		dbj AK154459.1	68-128	96.9 (106)	58/61 (95%)	5,00E-18			
		dbj AK144009.1	65-128	80.6 (88)	56/64 (87%)	3,00E-13			
			gb BX649611	11-55	64.40 (70)	41/45 (91%)	3.39e-08	GGGGGGGTTTCGATTGGGGTT / TTGGTTTTGGGAGGG / CCTAAAA	4
H5 (60) II	AC 154	kDNA	gb M18814	43-161	179 (198)	112/119 (94%)	4.40e-45	TACACC	Não foi possível definir
			gb AL591854 chrom 02	12-48	53 (58)	34/37 (91%)	5.64e-05		
			Hospedeiro	gb AC128702 chrom 09	166-195	46 (50)	28/30 (93%)		
		gb AC108419 chrom 01	182-205	44 (48)	24/24 (100%)	2.92e-02			
	AC 155	kDNA	gb M19188.1	34-17; 160-276; 329-354	174 (192)	110/118 (93%)	1,00E-40		
			emb BX649611.8	335-379	68.0 (74)	42/45 (93%)	2,00E-09		
		Hospedeiro	gb AC157582.3	350-383	53.6 (58)	32/34 (94%)	5,00E-05		
			dbj AK144009.1	93-156; 262-325	84.2 (92)	57/64 (89%)	3,00E-14		
	AC158	kDNA	gb M19188.1	160-276	174 (192)	110/118 (93%)	3,00E-43		
			gb AF114153.1	42-108; 48-277; 401-465; 517-537	140 (154)	183/246 (74%)	4,00E-33		
Hospedeiro		dbj AK154459.1	93-153; 262-322; 450-510	102 (112)	59/61 (96%)	1,00E-19			
		gb AC157582.3	7-40; 366-399	53.6 (58)	68/73 (93%)	0,00005			
B2 (120) V	AC168	kDNA	gb M18814	74-190	169 (186)	109/118 (92%)	1.52e-41	AACCCCAATCGAACC	4
			Hospedeiro	emb BX649611.8	249-293	68.0 (74)	42/45 (93%)		
	AC171	kDNA	gb M18814	74-147	125 (138)	72/74 (97%)	7.32e-29		

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
AC172	Hospedeiro		gb AC157582	141-174	48 (52)	31/34 (91%)	2.05e-03		
			kDNA	gb M18814	74-192	167 (184)	109/119 (91%)		
	Hospedeiro	gb AC121594 chrom 10	268-289	41 (44)	22/22 (100%)	5.25e-01			
		gb CT033774 chrom 13	268-289	41 (44)	22/22 (100%)	5.25e-01			
AC173	kDNA		gb AF242562	216-285	57.2 (62)	59/72 (81%)	5.68e-08		
	Hospedeiro	emb AL671912.8 chrom X	191-220	46.8 (24)	28/30 (93%)	0.01			
		gb AC205082.3 chrom Y	288-309	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14			
AC174	kDNA		gb EU088389	1-24; 75-95	39.1 (42)	23/24 (95%)	5.07e-03		
			gb AC205082.3 chrom Y	97-118	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14		
	Hospedeiro	emb AJ851868.3	97-118	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14			
		emb CT486005.19 chrom 17	97-118	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14			
AC175	kDNA		gb AJ748036	1-64	48.2 (52)	52/67 (77%)	2.41e-05		
			gb AC125225.4 chrom 06	146-256	202 (105)	109/111 (98%)	1,00E-49		
	Hospedeiro	emb CT009527.5 chrom 17	146-255	200 (104)	108/110 (98%)	1,00E-49			
		emb AL645967.20 chrom 11	149-256	202 (105)	107/108 (99%)	1,00E-49			
AC179	kDNA		gb AY169990	6-138	55.4 (60)	97/136 (71%)	2.33e-07		
			gb AJ747989	204-285	60.8 (66)	63/82 (76%)	5.47e-09		
	Hospedeiro	gb AC112984 chrom 18	271-358	142 (156)	85/88 (96%)	2.65e-31			
		gb AC154739 chrom 09	273-358	144 (158)	84/86 (97%)	7.59e-32			
AC 180	kDNA		emb AJ747977	38-117	131 (144)	77/80 (96%)	1.71e-30		
	Hospedeiro	gb AC091278.6 chrom 01	1-22	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14			
		gb AC108824.17 chrom 07	1-22	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14			

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
	AC181	kDNA	gb M18815	26-124	136.5 (150)	91/100 (91%)	3.40e-3		
		Hospedeiro	gb AC091278.6 chrom 01	1-22	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14	-	Não foi possível definir
			gb AC108824.17 chrom 07	1-22	43.0 (22)	22/22 (100%)	0.14		
C ₁ (60) I	AC 184	kDNA	gb AF241157	45-121	55.4 (60)	60/79 (75%)	2.15e-07		
		Hospedeiro	gb AC123856.4 chrom 01	1-49	89.7 (98)	49/49 (100%)	1,00E-15	-	Não foi possível definir
			dbj AP004390.1	1-49	89.7 (98)	49/49 (100%)	1,00E-15		
	AC 185	kDNA	gb M18814.1	1-265	59.0 (64)	77/104 (74%)	1.63e-08		
		Hospedeiro	gb AC159139	245 - 308	75.22 (82)	52/59 (88%)	2.73e-11	TTGACCCCCCTCCCAAACC	Não foi possível definir
	C ₃ (60) I	AC 188	kDNA	gb AJ747919.1	625 - 672	57.19 (62)	42/47 (89%)	1.37e-07	
gb AY169974.1				625 - 694	49.98 (54)	54/71 (76%)	2.04e-05		
Hospedeiro			gb AC153536	1 - 631	1088.72 (1206)	620/632 (98%)	0	CTCTACCAAACCTATTTTATGAAGCC	Não foi possível definir
		gb BX936355	1 - 631	1092.32 (1210)	621/632 (98%)	0			
AC 190		kDNA	gb EU605980	699 - 719	39.157 (42)	21/21 (100%)	3.73e-02		
			gb AJ747964.1	678 - 719	40.9 (44)	35/42 (83%)	1.07e-02		
		Hospedeiro (1 - 631)	gb AC162391 chrom 06	1 - 631	1130.2 (1252)	629/631 (99%)	0	GAAGCC	Não foi possível definir
			gb AL808118 chrom 04	1 - 631	1106.75 (1226)	624/631 (98%)	0		
			gb AC125147 chrom 07	1 - 631	1103.14 (1222)	623/631 (98%)	0		
AC 191		kDNA	gb AJ747964.1	616 - 705	40.9604 (44)	35/42 (83%)	1.05e-02		
	gb AC162945		1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0			
	Hospedeiro	gb AC185964	1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0	GAAGCC	Não foi possível definir	
		gb AC175493	1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0			
		gb CU392847	1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0			

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
AC 193	kDNA		gb NG_005960	1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0	CTACCCAACACATTCTAT	Não foi possível definir
			gb NG_006934	1 - 621	1115.77 (1236)	620/621 (99%)	0		
		emb AJ747939	609 - 697	64.4 (70)	47/54 (87%)	9.06e-10			
	Hospedeiro		gb BX470192	1 - 625	1067.08 (1182)	612/625 (97%)	0		
			gb NG_028625	1 - 625	1020.19 (1130)	604/626 (96%)	0		
			gb AC101830	1 - 625	1020.19 (1130)	604/625 (96%)	0		
		gb AC152888	1 - 625	1011.17 (1120)	602/625 (96%)	0			
AC 194	kDNA		emb AJ747919	113 - 168	48.17 (52)	48/63 (76%)	1.95e-05	TTTTAGG	Não foi possível definir
			gb M18814.1	148 - 179	40.96 (44)	28/32 (87%)	2.89e-03		
	Hospedeiro		dbj AK154459.1	14 - 69; 72 - 127	87.848 (96)	53/56 (94%)	2.84e-15		
			gb AC124114 15 chrom	173 - 206	48.17 (52)	31/34 (91%)	2.49e-03		
			gb BX855596 04 chrom	116 - 161	48.17 (52)	39/46 (84%)	2.49e-03		
AC 195	kDNA		emb AJ747982.1	1299 - 1335	54.5 (28)	34/37 (92%)	4,00E-06	CCCAGAAATGAACCC	Não foi possível definir
			emb AJ747945	1252 - 1335	53.58 (58)	67/88 (76%)	3.19e-06		
			emb AY169997	1045 - 1095	58.99 (64)	45/52 (86%)	7.51e-08		
			emb AF242561	1037 - 1080	49.97 (54)	39/46 (84%)	3.89e-05		
	Hospedeiro		emb CT030230.13 chrom 17	1 - 1051	1948 (1013)	1042/1054 (99%)	0		
			gb AC123687.20 chrom 05	1 - 1051	1942 (1010)	1041/1054 (99%)	0		
			ref NG_012015.1 chrom 03	1 - 1051	1936 (1007)	1040/1054 (99%)	0		
AC 196	kDNA		emb AJ747945	381 - 457	60.7975 (66)	61/77 (79%)	7.14e-09	TTCAAGGCCCTCCCAAACCAATA	6
			gb M18814.1	360 - 457	58.9941 (64)	77/104 (74%)	2.49e-08		
			gb EU088393	193 - 238	53.584 (58)	40/46 (86%)	1.06e-06		

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
			gb AC125121	1 - 217	1.13e-100	372.78 (412)	214/218 (98%)		
		Hospedeiro	gb AC141564	1 - 212	1.37e-99	369.174 (408)	209/212 (98%)		
			gb AC101817	1 - 212	1.37e-99	369174 (408)	209/212 (98%)		
AC 197		kDNA	gb U43566	193 - 451	82.4379 (90)	182/268 (67%)	2.20e-15		
			gb EU088386	426 - 460	58.9941 (64)	34/35 (97%)	2.51e-08		
		Hospedeiro	gb AC132444	1 - 212	347.533 (384)	204/212 (96%)	4.52e-93	TTGAACGCCCTCCCAAAC	8
			gb AC168977	1 - 212	342.123 (378)	203/212 (95%)	1.92e-91		
AC 198		kDNA	gb DQ835662	186 - 489	60.7975 (66)	67/87 (77%)	7.65e-09		
		Hospedeiro	gb AC157592	1 - 204	342.123 (378)	198/204 (97%)	2.05e-91	TTGAACGCCCTCCCAAAC	7
			gb AC157592	1 - 204	342.123 (378)	198/204 (97%)	2.05e-91		
AC 199		kDNA	gb DQ835652	14246	58.9941 (64)	37/39 (94%)	7.26e-09		
			gb AC154193	83 - 149	104.078 (114)	63/67 (94%)	2.45e-20		
		Hospedeiro	gb AL663098	84 - 149	120.309 (132)	66/66 (100%)	3.19e-25	TGTTGTCTA	X
			gb AL603924	83 - 149	109.488 (120)	63/65 (96%)	5.76e-22		
C ₃ (120) III	AC 204	KDNA	emb AJ748077	652 - 685	40.9604 (44)	30/34 (88%)	1.02e-02		
		Hospedeiro	gb AC121612	1 - 627	1032.81 (1044)	608/630 (96%)	0	TTCCACAAAATAGAAACGGAAGGTACTC TACAAAACCTATTCTATGAAGCC	Não foi possível definir
			gb AC163651	1 - 629	996746 (1104)	602/633 (95%)	0		
AC 205		KDNA	gb AJ748058	21 - 306	55.3874 (60)	36/40 (90%)	1.97e-07		
		Hospedeiro	gb CT030658	2-46	60.7975 (66)	42/47 (89%)	6.00e-07	GGTTCATTGGGGTTGGTGTAAATAT	Não foi possível definir
			gb BX294008	2-46	57.1907 (62)	41/46 (89%)	7.31e-06		
AC 206		KDNA	gb AJ747982	7 - 284	354.747 (392)	247/279 (88%)	1.50e-97	CCTTATATTACACCAACCCCAATGGAAC C	Não foi possível definir

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
AC 207	Hospedeiro		gb AC117635	256 - 304	68.01 (74)	46/51 (90%)	4.01e-09		
			gb BX294008	256 - 304	60.79 (66)	44/50 (88%)	5.96e-07		
	KDNA		gb AB434513	52 - 328	367.37 (406)	249/278 (89%)	2.80e-101		
			gb EU088385	250 - 354	62.60 (68)	83/110 (75%)	1.55e-09		
	Hospedeiro		gb AC123046	1-65	91.45 (100)	59/65 (90%)	4.16e-16	GACGCCCCCTCCCAAACC	Não foi possível definir
			gb AC159139	1-65	91.45 (100)	59/65 (90%)	4.16e-16		
		gb AC109233	1-50	91.45 (100)	50/50 (100%)	4.16e-16			
AC 208	KDNA		emb AJ747996.1	106 - 146; 373 - 399	73.7 (38)	40/41 (98%)	6,00E-12		
	Hospedeiro		gb AC158607.7 chrom 10	3 - 111	210 (109)	109/109 (100%)	2,00E-51	CCCAAAAGTTGAA	10
			gb AC138394.7 chrom 03	6 - 108	141 (73)	93/103 (90%)	1,00E-30		
AC 209	KDNA		gb M19191.1 TRBKPM CR	50 - 190; 392-420	208 (108)	130/141 (92%)	2,00E-52		
	Hospedeiro		emb AL808139.12 chrom X	8-40	58.4 (30)	32/33 (97%)	8,00E-06	-	Não foi possível definir
			gb AC110527.13 chrom 01	9-40	56.4 (29)	31/32 (97%)	3,00E-05		
AC 211	KDNA		emb AJ747982.1	153 - 340	257.36 (284)	171/189 (90%)	3.48e-68		
	Hospedeiro		gb AC167171.2 chrom 13	1 - 159	306 (159)	159/159 (100%)	2,00E-80		
			gb AC133206.3 chrom 01	1 - 159	306 (159)	159/159 (100%)	2,00E-80	CAACACC	Não foi possível definir
			gb AC121920.3 chrom 07	1 - 159	306 (159)	159/159 (100%)	2,00E-80		
			gb AL928700 chrom 02	1 - 164	286.2 (316)	163/165 (98%)	9.31e-75		
G1 (60) I	AC 213	KDNA	gb EU088399.1	16438	46.8 (24)	38/45 (84%)	7,00E-04		
		Hospedeiro	gb AC122002.2	277 - 500	379 (197)	219/225 (97%)	2,00E-102	AACC	7
AC 214	KDNA		gb EU605980.1	264 - 385	217 (113)	119/122 (98%)	2,00E-55		
	Hospedeiro		gb AC117635.6 chrom 12	1-52	64.4 (70)	46/52 (88%)	1,09E-07	GGTTCATTGGGGTTGGTGTGATATAAG GAGG	12

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
AC 216	kDNA		gb AC161244.2 chrom 13	1-29	56.4 (29)	29/29 (100%)	3,00E-05	TATATTACACCAACCCCAATCGAACC	Não foi possível definir
			gb FJ598046.1	85 - 246	283 (147)	157/162 (97%)	5,00E-75		
		gb U07845.1 TCU07845	241 - 360	185 (96)	112/120 (93%)	2,00E-45			
	Hospedeiro	gb CT030658 chrom 12	623 - 668	57.2 (62)	42/48 (87%)	1.69e-05			
AC 217	kDNA		gb AC125006 chrom 03	623 - 668	57.2 (62)	42/48 (87%)	1.69e-05	TTTTAGG	15
			gb AJ747973	45 - 356	188 (208)	248/323 (76%)	1.56e-47		
AC 218	kDNA		gb AC157582.3 chrom 15	13 - 40	54.5 (28)	28/28 (100%)	1,00E-04	ATAAAAAAAC	3
			emb AJ748077.1	871 - 900	52.6 (27)	29/30 (97%)	1,00E-05		
AC 219	kDNA		emb AJ747926	851 - 900	48.17 (52)	44/54 (81%)	9.08e-05	TTGAACGCCCTCCCAAAAC	8
			gb AC138642.10 chrom 03	1 - 863	1579 (821)	847/860 (98%)	0		
	Hospedeiro		gb AC161264.2 chrom 09	1 - 860	1475 (767)	829/860 (96%)	0		
			gb EU088392.1	1176 - 1207	62.2 (32)	32/32 (100%)	2,00E-08		
AC 220	kDNA		dbj AB434523.1	960 -994	56.4 (29)	33/35 (94%)	1,00E-06	-	15
			gb AC109607.47 chrom 08	1 - 979	1842 (958)	972/979 (99%)	0		
	Hospedeiro	emb AL929120.7 chrom 02	1 - 979	1773 (922)	960/979 (98%)	0			
AC 221	kDNA		dbj M18816	34 - 174	125 (65)	69/71 (97%)	1,00E-27	GAAGGC	Não foi possível definir
			gb EU088381	45 - 218	122 (134)	136/177 (76%)	2,00E-27		
AC 221	Hospedeiro		gb AC157582.3 chrom 15	13 - 40	54.5 (28)	69/71 (97%)	1,00E-27	GAAGGC	Não foi possível definir
			emb AJ747970.1	240 - 289; 476 - 517	69.9 (36)	40/42 (95%)	8,00E-11		
		ref NG_006035.4 chrom X	1 - 245	431 (224)	238/245 (97%)	4,00E-118			
		emb AL845501.9 chrom 04	1 - 245	419 (218)	236/245 (96%)	1,00E-114			
		gb AC164302.2 chrom 16	1 - 245	419 (218)	236/245 (96%)	1,00E-114			

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
	AC 222	kDNA	gb EU088397.1	241 - 262; 488-456	64.1 (33)	37/39 (95%)	5,00E-09	CTAAACTCACTAGAA	Não foi possível definir
		Hospedeiro	gb AC145578.5 chrom Y	10 - 243	439 (228)	232/234 (99%)	2,00E-120		
			gb AC160393.2 chrom 12	10 - 240	427 (222)	228/231 (99%)	6,00E-117		
	AC 223	kDNA	gb EU605980.1	324 - 649	142 (74)	78/80 (98%)	9,00E-33	GAAGGCCCC	Não foi possível definir
		Hospedeiro	gb AC115288.4 chrom 09	2 - 332	614 (319)	327/331 (99%)	4,00E-173		
			gb AC136923.6 chrom 18	1 - 332	610 (317)	327/332 (98%)	6,00E-172		
G2 (60) I	AC 227	kDNA	emb AJ747915.1	1 - 36; 255 - 286	58.4 (30)	34/36 (94%)	3,00E-07	AATGGAACC	Não foi possível definir
		Hospedeiro	gb AC161244.2 chrom 13	278 - 306	56.4 (29)	29/29 (100%)	3,00E-05		
			gb AC122276.4 chrom 06	278 - 306	56.4 (29)	29/29 (100%)	3,00E-05		
	AC 228	kDNA	emb AJ747915.1	1-36; 255 - 286	58.4 (30)	34/36 (94%)	3,00E-07	AACACAAACAAACAGGTGAAGG	16
		Hospedeiro	gb AC135110.3 chrom 16	7-70	112 (58)	62/64 (97%)	5,00E-22		
	AC 229	kDNA	gb M19188.1	1 - 81; 323 - 342	139 (72)	78/81 (96%)	1,00E-31	TTC	X
		Hospedeiro	ref NG_006035.4 chrom X	340 - 581	460 (239)	241/242 (99%)	9,00E-127		
			gb AC140928.5 Unknown	341 - 581	440 (229)	237/241 (98%)	6,00E-121		
	AC 230	kDNA	gb EU088397.1	572 -610; 325-346	64.1 (33)	37/39 (95%)	5,00E-09	GAAGGCCCC	13
		Hospedeiro	gb AC116797.11 chrom 13	2 - 329	614 (319)	325/328 (99%)	4,00E-173		
			ref NG_012905.1 chrom 03	1 - 333	498 (259)	310/333 (93%)	2,00E-138		
H1 (60) I	AC 233	kDNA	gb M18814.1	958 - 1234	514 (267)	276/278 (99%)	2,00E-144	TTGAACGCCCTCCCAAAC	Não foi possível definir
		Hospedeiro	gb AC164882.2 chrom 09	1 - 977	1563 (813)	927/979 (95%)	0		
			gb AC159909.8 chrom 10	1 - 977	1563 (813)	927/979 (95%)	0		

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
AC 234	kDNA		emb AJ748075.1	270 - 304	68.0 (35)	35/35 (100%)	3,00E-10	AAATCC	Não foi possível definir
			emb X04680.1	266 - 304	58.4 (30)	36/39 (92%)	3,00E-07		
			gb M18815	255 - 304	57 (62)	44/51 (86%)	5.59e-08		
	Hospedeiro		emb AL833798.8	1 - 260	471 (245)	255/260 (98%)	3,00E-130		
			gb AC124469.4 chrom 01	1 - 260	460 (239)	253/260 (97%)	9,00E-127		
AC236	kDNA		gb M19188.1 TRBKPM CO	620 - 742; 969 - 1006	191 (99)	115/123 (93%)	3,00E-47	T	Não foi possível definir
			gb AF114153.1	619 - 730; 980 - 1006	139 (72)	102/112 (91%)	1,00E-31		
	Hospedeiro		gb AC117218.3 chrom 15	1 - 619	1136 (591)	612/620 (99%)	0		
			gb AC149223.2 chrom 18	1 - 619	1133 (589)	609/619 (98%)	0		
AC 237	kDNA		dbj AB434509.1	646 - 925	521 (271)	277/280 (99%)	8,00E-147	TATTATGTGGTCAATTTTGGAGAAGGCC CC	13
			emb X04680.1	560 - 689	167 (87)	118/131 (90%)	3,00E-40		
	Hospedeiro		gb AC125223.3 chrom 13	1 - 333	629 (327)	331/333 (99%)	1,00E-177		
			gb AC122455.4 chrom 08	1 - 329	615 (320)	326/329 (99%)	1,00E-173		
AC 238	kDNA		emb AJ747982.1	627 - 659	58.4 (30)	32/33 (97%)	3,00E-07	GAA	1
			emb AJ747977.1	633 - 659; 369 - 407	52.6 (27)	27/27 (100%)	1,00E-05		
	Hospedeiro		gb AC145087.14 chrom 01	1 - 374	685 (356)	366/371 (99%)	0		
			gb AC140197.4 chrom 18	24 - 372	654 (340)	346/349 (99%)	0		
H3 (60) I	AC 241	kDNA	gb EU088396.1	631 - 661; 361 - 380	60.3 (31)	31/31 (100%)	7,00E-08	GAACGCCCTCCCAAAA	Não foi possível definir
				gb AC132302.3 chrom 03	1 - 294	548 (285)	291/294 (99%)		
		gb AC123935.4 chrom 13	1 - 294	548 (285)	291/294 (99%)	2,00E-153			
AC 242	kDNA		gb EU088396.1	510 - 540; 240 - 259	60.3 (31)	31/31 (100%)	7,00E-08	GAA	Não foi possível definir
			gb AC166823.3 chrom 14	1 - 242	460 (239)	241/242 (99%)	9,00E-127		

Animal	Clone	Região	Número de acesso	Posição	Bit Score (Max Score)	Identidade	e-value	Microhomologia*	Cromossomo
B2 (30) II	AC 250	kDNA	gb AC166831.3 chrom 16	1 - 239	460 (239)	239/239 (100%)	9,00E-127		
			gb M19188.1	498 - 582; 813 - 833; 1 - 20	129 (67)	79/85 (93%)	1,00E-28		
			23 ES 23_ES	565 - 833	369	246/271 (90%)	5.02e-104	-	Y
J1 (30) II	AC 264	kDNA	gb AC131733.3 chrom 08	238 - 510	250 (130)	241/284 (85%)	1,00E-63		
			M19188	321-436	83 (154)	106/117 (90%)	5.92e-38	-	07
			AC140370	519-600	143.75 (158)	81/82 (98%)	1.97e-31		
	AC 265	kDNA	M18814	127-244	169 (186)	108/118 (91%)	1.55e-41	-	Não foi possível definir
			AK154459	7-67; 230-290	102.27 (112)	59/61 (96%)	2.82e-19		
J2 (30) II	AC 275	kDNA	AJ747995	20-79	89.65 (98)	56/60 (93%)	2.41e-18		
			M19190	10-89	91.45 (98)	68/80 (85%)	8.41e-18	-	Não foi possível definir
			AC137691	94-256	286.22 (316)	161/163 (98%)	8.39e-75		
	AC 276	kDNA	M19190	10-89	116.7 (128)	74/80 (92%)	8.35e-26	TAC	13
			AC132905	87-256	293.43 (324)	167/170 (98%)	7.85e-77		
	AC 283	kDNA	M19188	1-75	113.1 (124)	70/75 (93%)	5.91e-25	-	7
AC105406			134-208	77.03 (84)	64/76 (84%)	6.24e-12			
J1 (60) II	AC 288	kDNA	AY170001	1-44	57.19 (62)	39/44 (88%)	1.35e-07		
			AJ747969	127-223	49.98 (54)	79/107 (73%)	2.01e-05	ACCAACCCCAATCGAACCAACCAACCAA	07
			AC122002	206-446	372.78 (412)	232/244 (95%)	2.03e-100		

* A definição de microhomologia baseia-se no compartilhamento de trechos de DNA provenientes de fontes distintas, reconhecidas em bases de dados de nucleotídeo por comparação. O banco de kDNA de *Trypanosoma cruzi* não compreende toda a variabilidade de sequências existente, logo, é possível que a microhomologia seja maior que a identificada.