

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



**CARACTERIZAÇÃO DE REGIÕES DE INTEGRAÇÃO DE  
MINICÍRCULOS DE *k*DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO  
GENOMA HUMANO**

Aluna: ANA MARIA COSTA

Orientadores:

Prof. JAIME MARTINS SANTANA

Prof. ANTÔNIO LIMA CRUZ TEIXEIRA

Brasília, Junho de 2008.

O trabalho realizado no Laboratório:  
Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas  
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho,

Ao Senhor da minha vida e destino, que me proporcionou imensas oportunidades de crescimento.

Aos meus queridos filhos, André, Elisa e Vera, pelo amor e compreensão.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e dedicação.

**Agradecimento muito especial**

A todos os amigos que acompanharam de perto ou à distância a finalização deste trabalho. Seus nomes estarão sempre registrados em meu coração.

A todos os companheiros da Embrapa e Universidade Católica de Brasília.

Aos amigos Carlos Castro, Célio Zanfranceschi, Daiva D. Tupinambá, Fábio G. Faleiro, Genaro Paiva, Herbert Lima, José G. Dórea, Juarez B. Tomé, Kelly O. Cohen, Luiz R. Moura, Maria Lucia Scroferneker, Mozart M. de Nittis, Robson Sereno, Rosemary F. Paiva e Walter Quadros.

Aos colegas da Universidade de Brasília que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1. A DOENÇA DE CHAGAS .....	3
1.1 - A Fase Aguda .....	4
1.2 -A Fase Crônica.....	5
1.3 - Aspectos da biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
2. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES E ESTRUTURAÇÃO DOS GENOMAS .....	8
2.1 - Transferências horizontais de genes .....	8
2.2 - Transferências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o genoma da célula hospedeira.....	10
2.3 – Elementos repetitivos .....	12
2.4 - Instabilidades de Sequências.....	25
<b>II. OBJETIVO .....</b>	<b>33</b>
1. OBJETIVO GERAL .....	33
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
1. CULTURAS DE CÉLULAS .....	34
1.1 - Cultura de macrófagos humano linhagem U937, e obtenção de linhagens clonais kDNA integrada.....	34
1.2 - Cultivo de bactérias e de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
1.3 - Clones bacterianos contendo segmentos vindos de regiões de kDNA integrados no genoma mamífero .....	35
2. GENÓTIPOS E ORIGEM DAS BACTÉRIAS .....	36
a) Fago.....	36
b) <i>Escherichia coli</i> .....	36
3. CONFIRMAÇÃO DA NÃO REVERSÃO DA MARCA GENÉTICA RECA, NA LINHAGEM BACTERIANA XL1-BLUE MRF <sup>+</sup> .....	37
4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
4.1 - Genômico.....	37
4.2 - Extração de kDNA .....	38
4.3 - Extração de Plasmídios.....	38
5. DIGESTÃO DO DNA E TRATAMENTO COM FOSFATASE ALCALINA.....	39
6. ANÁLISE ELETROFORÉTICA: PURIFICAÇÃO DO DNA A PARTIR DE GÉIS.....	40
6.1 - Agarose.....	40
6.2 - Acrilamida.....	40
7. INICIADORES, ADAPTADORES E SONDAS.....	41
8. SOUTHERN BLOT.....	43
9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLIMERASE CHAIN REACTION).....	44
10. CLONAGENS .....	45
10.1 - Plasmídios .....	45
10.2 - Transformação .....	46
11. CONFIRMAÇÃO DA ORIGEM HÍBRIDA DOS CLONES DO GRUPO A (A, C E D) .....	46
11.1 - Isolamento da região satélite (MAS) .....	47
11.2 - Isolamento da Região L1A .....	47
11.3 - Isolamento da Região HVA .....	47
12. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTEGRAÇÃO COM INICIADORES DE LINE-1 E DE MINICÍRCULO DE KDNA .....	49
13. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO ENRIQUECIDO .....	52
13.1 - Abordagem I: Construção do banco enriquecido em Fago $\lambda$ gt10. ....	52

14. ABORDAGEM II - CONSTRUÇÃO DO BANCO ENRIQUECIDO EM PLASMÍDIO E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS POR SOUTHERN BLOT COM SONDA DE KDNA .....	54
15. ABORDAGEM III – PCR INVERSA .....	55
16. ABORDAGEM IV - PRC COM INICIADORES DE KDNA EM ASSOCIAÇÃO COM INICIADORES DOS VETORES .....	56
17. ABORDAGEM V - MÉTODO DE CAPTURA DO KDNA INTEGRADO NO DNA GENÔMICO. ....	56
17.1 - Padronização da ligação dos adaptadores ao DNA.....	58
17.2 - Tratamento dos adaptadores com fosfatase alcalina e anelamento. ....	59
17.3 - Ligação do adaptador ao DNA digerido .....	59
17.4 - Imobilização da sonda em membrana de “nylon” por “dot blot” .....	59
17.5 - Experimento piloto .....	59
17.6 - Nível de detecção.....	61
17.7 - Captura a partir do DNA do clone celular A11 .....	61
17.8 - Captura da banda de 7 kb contendo kDNA, a partir da digestão do clone A11 com Cla I.....	63
18. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS CLONADAS.....	64
19. ANÁLISE DO SEGMENTO B7 .....	64
19.1 - Anotação genômica complementar.....	64
19.2 - Confirmação da integração.....	65
20. IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DAS REGIÕES DE 50 A 80 PB OBSERVADAS INTERCALANDO AS REGIÕES CONSERVADAS DE MINICÍRCULO .....	65
21. VERIFICAÇÃO DO TAMANHO DA REGIÃO VARIÁVEL 50 PB ANTES DA INTEGRAÇÃO. ....	67
21.1 Construção do Banco de kDNA e seleção do clone portador da região.....	67
21.2 - Captura e clonagem dos minicírculos de kDNA com a seqüência 50 pb .....	67
21.3 - Amplificação da região variável 50 pb do kDNA.....	67
22. PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO CLONE B7 EM GEL DE AGAROSE E ACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE .....	68
23. COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DE MINICÍRCULOS DE KDNA DEPOSITADAS EM BANCO DE DADOS.....	68
24. NORTHERN BLOT E RT PCR PARA A ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO PRODUTO DE KDNA INTEGRADO.....	68
25. SUBCLONAGEM DA FASE DE LEITURA 2 (ORF2) EM VETOR DE EXPRESSÃO PGEX4T3 .....	68
26. SUBCLONAGEM DA FASE DE LEITURA 2 (ORF2) EM VETOR DE EXPRESSÃO PPIC9 DE LEVEDURA.....	69
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
1. CLONES COM SEQUÊNCIAS DE MINICÍRCULO DE KDNA E ELEMENTO LINE-1 OBTIDAS POR AMPLIFICAÇÃO COM INICIADORES SK36 .....	71
1.1 Confirmação da origem híbrida humana/Trypanosoma cruzi dos clones pertencentes ao grupo A.....	72
2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DE INTEGRAÇÃO COM OS INICIADORES DE LINE-1 E DE MINICÍRCULO DE KDNA .....	72
3. CONSTRUÇÃO DO BANCO ENRIQUECIDO DA REGIÃO DE INTEGRAÇÃO.....	76
3.1 - Posição do kDNA nas linhagens celulares subclonais A11, C4 digeridas com a enzima EcoR I. ....	76
3.2 - Clonagem da região de kDNA integrada no genoma hospedeiro .....	76
4. CARACTERIZAÇÃO DOS MINICÍRCULOS DE KDNA COM REGIÕES VARIÁVEIS ENCURTADAS PRESENTES NOS CLONES DE REGIÕES DA INTEGRAÇÃO.....	98
4.1. Origem das regiões repetidas 50 e 80 pb presentes entre as regiões conservadas de minicírculo. ....	98
4.2. Instabilidade região variável de kDNA de Trypanosoma cruzi que originou o segmento 50 pb.....	98
4.3. Instabilidade genética do minicírculo de kDNA que deu origem às integrações quando clonados .....	99
4.4. Caracterização do segmento híbrido humano e minicírculo de kDNA do clone B7.....	100
4.5. Confirmação da presença da região B7 no genoma da linhagem subclonal de macrófago A11 intacto .....	102
4.6. Análise das Fases Abertas de Leituras (ORFs) do clone B7 .....	104
4.7. RT PCR e Northern Blot .....	107

5. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS PONTOS DE INTEGRAÇÃO E REGIÃO kDNA DO CLONE B7 E G10.....	107
5.1. Padrão de migração do clone B7 em gel de agarose e acrilamida não desnaturante sugestivas de conformação não B.....	107
5.1. Análise estrutural “in silico” dos pontos de integração e região kDNA do clone B7 e G10. ....	108
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO I - ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E MARCAS GENÉTICAS .....</b>	<b>151</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>155</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sondas geradas a partir da subdivisão do clone A para confirmação da origem híbrida dos clones da família LINE-1. Linhas: preta, vetor; vermelha, região conservada de minicírculo de kDNA; azul, região variável do minicírculo; amarela, satélite; verde, fragmento do elemento LINE-1. Estratégia experimental para obtenção da sonda MAS, L1A e HVA. ....	48
Figura 2. Estratégia experimental para amplificação da região de integração, partindo do pressuposto de que a integração teria ocorrido dentro de um segmento de LINE-1. Os oligonucleotídeos derivados de LINE-1 foram desenhados a partir da seqüência do clone HUMC11 (DOMBROSKI et al.,1993) genbank acesso gbIL19088I: fita negativa, bases 4000 a 4002 (L1Rta1), bases 4323 a 4348 (L1Rta2), e na fita positiva bases 3542 a 3523 (L1RTs1). O oligonucleotídeo M6a1, obtido das informações dos clones do grupo A, corresponde no mesmo LINE-1 as bases 3801 a 3821. A) Localização dos iniciadores na suposta região de integração dos minicírculos no LINE-1 e direção da amplificação. B) Estratégia de amplificação, tendo como um dos iniciadores o L1RTs1; B) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o L1Rta1; C) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o L1Rta1 e L1Rta2. D) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o M6a1; .....	51
Figura 3. Estratégia experimental empregada na obtenção e subclonagem dos segmentos híbridos kDNA/DNA hospedeiro. Amplificação do banco genômico construído no vetor $\lambda$ gt10, por PCR, com iniciadores do vetor e da região conservada dos minicírculos. ....	57
Figura 4. Etapas experimentais realizadas para a captura e isolamento da região de integração do kDNA no genoma hospedeiro murino para clonagem e seqüenciamento. ....	62
Figura 5. Estratégia experimental para a confirmação da presença da região de integração no clone celular A11, através da amplificação por PCR do DNA hospedeiro normal, clone celular A11, e <i>T. cruzi</i> . A) tamanho esperado da seqüência amplificada com os iniciadores IS / S2; B) tamanho esperado da amplificação com o iniciador hospedeiro IS e de kDNA sk36. ....	66
Figura 6. Estratégia experimental empregada no isolamento das regiões 50 pb do clone 1C6, 80 pb e do clone 2C6. Setas azuis indicam a direção das amplificações realizadas com os iniciadores TcVa/TcVs, Clone 1C6, e C6.80a/C6.80s no Clone 2C6. ....	70
Figura 7. Seqüências pertencentes ao grupo A: clones A, C, D e E, obtidos por amplificação de macrófagos transfectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> , comparadas a seqüências depositadas em banco de dados. Caracteres em vermelho sublinhado, seqüência de bases do iniciador sk36 utilizado na amplificação da extremidade da região conservada de minicírculos de kDNA, região em vermelho não sublinhada bases com correspondência a extremidade da região conservada (Sturm et al.,1989). Caracteres azuis, fragmento putativo de região variável de minicírculos. Em preto, região com identidade indefinida. Amarelo escuro, repetições com identidade entre 84 a 97% com satélite III humano (hssat13 acesos gbIX82942I). Verde, identidade de 70 a 90% com o elemento LINE-1 (HUM1C acesso gbIL19088I): clones A, C e D, similaridade entre as bases 3611 a 3954 do LINE-1; clone E: similaridade na região entre as bases 4895 - 5590. Itálico: desproporção entre purinas e pirimidinas na fita. ....	73

- Figura 8. DNAs isolados de macrófagos de humanos normais (N) e *Trypanosoma cruzi* (Tc), digeridos com a enzima *EcoR* I e hibridados por *Southern blot* com as sondas isoladas dos clones do grupo A conforme estratégia experimental mostrada na Figura 1. A estríngência máxima das lavagens foi de 65 °C/ 20 min com solução 0,1X de SSC e 0,1% SDS. a) Observa-se o sinal positivo de hibridação do fragmento de 280 pb pertencentes à região L1 do clone A (L1A) apenas na linha correspondente ao DNA de macrófago normal; b) Nota-se o sinal de hibridação do segmento de 100 pb pertencente à região satélite do clone A (MAS) no DNA macrófago normal e no DNA de *T. cruzi*; c) segmento de 89 pb proveniente da região variável de minicírculos de kDNA isolada do Clone A (HVA) mostrando sinal de hibridação positiva somente no DNA de *T. cruzi*. .....74
- Figura 9. Segmentos de DNAs obtidos pela amplificação por PCR do DNA de macrófago normal (2), infectado e tratado (3), linhagem subclonal A (4) linhagem subclonal G (5), e de *Trypanosoma cruzi* (1) com os iniciadores: a) SK 35 e L1RTa1; b) SK 35 e L1RTa2; c) SK 35 e L1RTs1, hibridados por *Southern blot* com a sonda SK36 de minicírculo de kDNA. (-) controle negativo de amplificação; (+) controles positivos de amplificação e hibridação. Observa-se a presença do sinal positivo de hibridação na linha correspondente a amplificação do DNA de macrófago infectado e tratado com os iniciadores SK35 e LTRa1 e amplificação unidirecional gerada pelo iniciador SK35 nos DNAs de *T. cruzi*. .....75
- Figura 10. Segmentos de DNAs contendo kDNA e DNA humano proveniente de amostras de sangue de pacientes chagásicos. A) Visualização em gel de agarose dos segmentos de DNA amplificados por PCR com os iniciadores SK36 e m6a1: DNAs de pacientes chagásicos (2 a 9) e DNA de *T. cruzi* (10); controle negativo de amplificação (1), controle positivo de amplificação (12). B) *Southern blot* do mesmo gel hibridado com a sonda 122 (região conservada que compreende a minicírculo de kDNA), controle negativo de hibridação (12), controle positivo de hibridação (13), marcador de tamanho molecular (1 kb ladder Gibco BRL), estríngência de lavagem de acordo com protocolo padrão. ....75
- Figura 11. Padrão de hibridação por *Southern blot* do DNA de macrófago subclone A11 (2) digerido com a enzima *EcoRI* e do macrófago normal (1) com a sonda 122 proveniente da região conservada de minicírculos de kDNA. Observa-se o sinal positivo de hibridação na posição de 3,2 kb e 0,8 kb no clone C4 após a lavagem das membranas com SSC 0,1X e SDS 0,1% durante 20 min a 65 °C. ....77
- Figura 12. Localização dos segmentos de kDNA no genomas das linhagens subclonais A11 (coluna 1) e C4 (coluna 2) digeridos com a enzima de restrição *Cla* I. A) Esquema ilustrativo da estratégia experimental utilizada na coleta dos diferentes segmentos de DNA separados por tamanho através de eletroforese em gel de agarose 0,8% sem brometo de etídio. Após leve coloração o gel foi subdividido de acordo com o esquema. O DNA isolado de cada faixa foi amplificado por PCR com os iniciadores sk35/ sk36, específicos para minicírculo de kDNA. O resultado positivo (+) ou negativo (-) das amplificações e hibridação foi anotado ao lado da faixa correspondente. B) Visualização por *Southern blot* com a sonda 122 da presença de minicírculos de kDNA presentes nas diferentes faixas moleculares dos DNAs de A11 e C4 digeridos com *Cla* I após amplificação conforme estratégia mostrada no item 12A. ....77
- Figura 13. Perda do minicírculo de kDNA da região de integração clonada no fago  $\lambda$ gt10 durante processo de enriquecimento e purificação do vetor. Observa-se a redução no sinal de hibridação em *Southern blot* do produto de amplificação da região conservada de minicírculo (iniciadores SK67/SK34) com a sonda 122 de minicírculos de kDNA. Linha 1, amplificação do banco A11  $\lambda$ gt10;. Linha 2, amplificação dos fagos eluídos na primeira etapa de purificação do selecionado 1; Linha 3, segunda etapa de purificação do selecionado; Linha 4, terceira etapa de purificação do selecionado 3; Linha 5, controle negativo da amplificação e hibridação. ....78
- Figura 14. Seqüências dos DNAs obtidos da clonagem em fago  $\lambda$  gt10 das bandas de DNA genômico proveniente das linhagens clonais C4, C6, e de macrófago de coelho chagásico que apresentaram sinal de hibridação positivo com a sonda de minicírculo 122. a) Seqüenciamento parcial do segmento 1C4, obtido da clonagem da região 2.1 kb do C4 digerido com *EcoR* I, a partir de banco genômico enriquecido; b e c) Clones 1C6 e 2C6, obtidos da clonagem da região 2.4 kb do C6 *EcoR* I pela técnica de PCR inversa. d) Clone M1 obtido da amplificação de macrófagos de coelho chagásicos com o iniciador SK36. Em preto: sítio de clonagem *EcoR* I do vetor. Em vermelho e azul, regiões conservadas e variáveis de minicírculo de kDNA respectivamente. Observa-se a presença de encurtamento nas regiões variáveis em todos os clones analisados quando comparados ao consenso esperado de 220 pb. As regiões variáveis encurtadas dos clones 1C4, 1C6 e M1 apresentam identidade na ordem de 95% entre si. ....80
- Figura 15. Resultado do seqüenciamento dos clones pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4 obtidos da estratégia de fragmentação da estrutura repetitiva do kDNA. Em azul, iniciador do fago  $\lambda$ gt10; em rosa e vermelho, iniciadores SK34 e SK35 de kDNA respectivamente. A) GRUPO 1: Clones 35R21

- e 34R39 com identidade aproximada de 95% ao  $\lambda$ gt10 entre as bases 356 a 604. Traço, identidade ao  $\lambda$ gt10; ponto, ausência de base. B) GRUPO 2: Agrupamento dos clones com a mesma seqüência. Excluído valor de pares de bases o iniciador do fago. Peculiaridade entre os subgrupos 2: presença de regiões ricas em A/G, C/T (retângulo laranja). C) GRUPO 3: Clones pequenos. Observa-se a presença de segmentos de DNA (preto), com origem indefinida, unindo os iniciadores completos usados nas ampliações. Observa-se nos clones 35F1 e 35 F7, regiões ricas nas bases A/T. D) GRUPO 4: Inseto mostrando multimeros do iniciador SK35, com pequenas alterações na seqüência de bases. Seta vermelha indica a orientação da repetição do SK35; seguem-se as repetições do iniciador, uma região, em preto, sem similaridade de seqüência a outros clones seqüenciados. Observa-se o iniciador  $\lambda$ gt10R truncado.....83
- Figura 16. Captura do segmento de minicírculo de kDNA com a sonda de região conservada 122 a partir do clone 1C6 digerido com a enzima *EcoR* I. A) Confirmação da ligação do adaptador Eco no segmento de kDNA isolado do clone 1C6 (Linha 2) e nos fragmentos do clone 1C6 digerido com a enzima *EcoR* I (Linha 3), através do sinal positivo de amplificação com iniciadores do adaptador visualizado no gel de agarose. Linha 1: Controle negativo da amplificação; Linha 4: marcador de peso molecular (kb ladder gibco). B) Confirmação da captura dos segmentos de minicírculo a partir da mistura com o vetor visualizado na Linha 2. Eluição a 0,1X SSC e SDS 0,1% pelo sinal positivo em *Southern blot* com a sonda 122, Linha 1. Eluição a 1X SSC e 0,1% SDS; Linha 2. Eluição a 0,1X SSC e SDS 0,1%; Linha 3. Controle negativo.....84
- Figura 17. Sensibilidade do método de captura. *Southern blot* da captura de segmentos do gene *fosforilase*<sup>+</sup> de *T. cruzi* presente em cópia única no genoma (Jaime M. Santana, comunicação oral) a partir do DNA genômico total nas concentrações de 5000 ng, 500 ng, 50 ng, e 5 ng, recuperados nas eluições realizadas com: Linhas 1, 4, 7 e 10 – água; linhas 2, 5, 8, e 11 - 0,1X SSC e 0,1 SDS, Linhas 3, 6, 9 e 12 - 2X SSC e 0,1% SDS. ....85
- Figura 18. Amplificação a partir dos iniciadores do adaptador dos fragmentos de minicírculos de kDNA capturados da região 3,2 kb do subclone A11 digerido com a enzima *EcoR* I. A) gel de agarose mostrando a amplificação dos produtos provenientes das eluições: 1. SSC 2 X, SDS 1%, 15 min à temperatura ambiente; 2. SSC 0,1 X, SDS 1% por 15 min a 65 °C; 3. H<sub>2</sub>O por 1 h a 65 °C; 4. Controle negativo de amplificação da PCR; 5. 100  $\mu$ g de *T. cruzi* amplificados com o iniciador do adaptador; 6. DNA do subclone A11 digerido com *EcoR* I e ligado ao adaptador, não capturado; 7. kDNA de *T. cruzi* digerido com *EcoR* I. B) Análise por *Southern blot* do mesmo gel após hibridação com a sonda de kDNA com de lavagem de acordo protocolo padrão descrito no material e métodos . Observa-se o sinal de hibridação na faixa de peso molecular entre de 0,2 a 1,4 kb nas Linhas 2 e 3 e no controle positivo de hibridação Linha 7.....87
- Figura 19. Captura da região de integração de minicírculo de kDNA do subclone A11 digerido com a enzima *EcoR* I, após amplificação por PCR com os iniciadores do adaptador, e hibridação por *Southern blot* com sonda de kDNA, as lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo padrão descrito no item 9 do material e métodos, sendo a última lavagem realizada a 65 °C por 20 min com a solução SSC 0.1X e SDS 0,1% . A) Comparação do perfil de bandas entre as capturas realizadas da banda 3.2 kb (Linhas 3 , 4 e 5) com as obtidas do DNA total (6, 7 e 8), observa-se o sinal positivo de hibridação com sonda de kDNA ns Linhas 4 e 7, eluição com SSC 0,1 X, SDS 0,1%, por 1h à 65 °C; e nas Linhas 5 e 6 eluição em H<sub>2</sub>O durante a noite a 65 °C, e ausência de sinal nas Linhas 3 e 8, correspondente às eluição com SSC 2 X, SDS 0,1% , por 15 min à temperatura ambiente; nas Linhas 1 e 2, tem-se respectivamente os controles positivo e negativo da amplificação e hibridação; B) Eluição da região de integração capturado do DNA total realizada em solução de formamida a 65 °C por 1 h (Linha 1); e H<sub>2</sub>O durante a noite à 65°C (Linha 2).....88
- Figura 20. Rearranjo da região de integração capturada do macrófago A11 após clonagem no vetor PCR2.1 e multiplicação na bactéria hospedeira DH5 $\alpha$ . a) Comparação entre o tamanho dos segmentos amplificado e o recuperado da clonagem visualizada através de eletroforese em gel de agarose: Linha 1. fragmentos liberados da digestão do clone com *EcoR* I; Linha 2. marcador de peso molecular 1 KB ladder (GIBCO); Linha 3. banda 600 pb obtida da amplificação da região de integração capturada do A11 na presença de DMSO. b) Mesmo gel mostrando a perda da região conservada de minicírculo de kDNA no segmento proveniente do clone constatada pela falta do sinal positivo de hibridação por *Southern blot* com a sonda 122 (Linha 1), e o sinal positivo de hibridação com a sonda 122 pb no segmento antes da clonagem (Linha 3). ....88
- Figura 21. Regiões de integração de minicírculos de kDNA capturado do macrófago A11-*EcoR* I amplificado com os iniciadores do adaptador, pelo método XL- PCR (Promega) (Linhas 1); padrão de tamanho molecular (Linhas 2). a) visualização da amplificação em gel de agarose; b) sinal positivo de hibridação por *Southern blot*, do mesmo gel, com sonda 122 da região conservada

- (hibridação e lavagens realizadas de acordo com protocolo padrão descrito no item *Southern blot* do material e métodos - Estringência da última lavagem SSC 0,1 X SDS 0,1% a 65 °C por 20 min). ...89
- Figura 22. Padrão de bandas dos DNAs provenientes da capturados a do macrófago A11-3,2 kb, coletados em ddH<sub>2</sub>O, após reamplificação com a enzima *Tth*-polimerase e iniciadores do adaptador. Resultado da reamplificação das faixas de tamanho molecular “até 1 kb”, “entre 1 e 2 kb” e “acima de 3 kb” (Linhas 1, 2 e 3, respectivamente). Linha 4, padrão de peso molecular KB ladder (Gibco); Linha 5, A11-3,2 kb ligado ao adaptador (controle positivo da amplificação). .....89
- Figura 23. kDNA da banda A11-3,2 kb capturado e eluído em ddH<sub>2</sub>O amplificado com os iniciadores do adaptador. Linha 2. Padrão das bandas obtidas, em gel de acrilamida 3,5 %, da reamplificação da região 1-2 kb. As 12 primeiras bandas foram isoladas do gel de acrilamida; Linha 1. padrão molecular 1 kb ladder BRL Gibco. ....92
- Figura 24. kDNA do macrófago A11-3,2 kb capturado e eluído em ddH<sub>2</sub>O após purificação das bandas do gel acrilamida 3,5%. As 12 bandas isoladas individualmente foram reamplificadas com os iniciadores do adaptador. A) Visualização em gel de agarose das 12 maiores bandas isoladas do gel de acrilamida. B) Hibridação do mesmo gel, por *Southern blot*, com a sonda de região conservada de 122 pb; observa-se o sinal positivo, em diferentes intensidades, em todas as bandas analisadas, após lavagem das membranas em estringência máxima de SSC 0,1X e SDS 0,1 %. A 65°C/ 20 min. ....93
- Figura 25. Padrão de migração dos segmentos de kDNA capturados do A11-*EcoR* I após clonagem no vetor PCR 2.1 multiplicação na hospedeira a bactéria *E. coli* DH5  $\alpha$ . Os plasmídios isolados foram digeridos com enzima de restrição *EcoR* I para a liberação dos insertos do vetor, e submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1,0%. Linhas 1 a 6, insertos originados da clonagem da banda B6 (800 pb); Linhas 7 a 12, insertos originados da clonagem de B7 (770 pb); Linhas 13 a 18, insertos originados da clonagem de B8 (650) pb. ....94
- Figura 26. Seqüenciamentos dos segmentos capturados da região kDNA do A11-*EcoR* I, clonados no vetor PCR2.1 na hospedeira DH5 $\alpha$ . Em rosa: seqüência plasmidial; marrom: adaptador; vermelho: região conservada de minicírculo de kDNA; azul: região variável do minicírculo; preto: região sem correspondência significativa às seqüências depositadas em banco de dados; verde: região identificada em *Southern blot* como pertencentes ao DNA humano; sublinhado: sítio *EcoR* I; Clones negativos na hibridação por *Southern blot* com sonda de kDNA: 6-1; 7E; 9G, 9F. Clones com sinal de hibridação positivo com sonda de kDNA: 12A; 1B, 2C, 10C, 11B, 11E, E 7-3 (B7).....97
- Figura 27. Padrão de hibridação em *Southern blot* dos DNAs de *Trypanosoma cruzi* (Tc) e Macrófago humano normal (N) digeridos com *EcoR* I com as sondas 50 pb (A) do clone 1C6 e 80 pb (B) do clone 2C6 isoladas de acordo com estratégia experimental mostrada na Figura 5. As lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo padrão para *Southern blot* descrito no item 9 do material e métodos. ....98
- Figura 28. Região variável obtida da amplificação, por PCR, do DNA de *T. cruzi*, com os iniciadores da região variável TcVa e TcVs, desenhados a partir das informações obtidas dos minicírculos provenientes das regiões de integração, encurtadas do clone B7. Sinal de hibridação, por *Southern blot*, com as sondas TcVa (A). Mesma membrana hibridizada com a sonda de região conservada de 122 pb (B). Verificou-se que o tamanho da região variável amplificada foi de 200 pb, correspondente ao tamanho do consenso descrito na literatura. O sinal de hibridação observado foi obtido após sucessivas lavagens, sendo a de maior estringência realizada com de 0,1 X SSC e 0,1 % SDS por 20 min a 65 °C. ....99
- Figura 29. Captura, a partir do DNA de *Trypanosoma cruzi*, das regiões variável de minicírculo de kDNA observada nos subclones de macrófago. A) Visualização do produto em gel de agarose 1%, após amplificação por PCR com iniciadores do adaptador: Linha 1. Eluído 2X SSC e SDS 0,1%; Linha 2. Eluído 0,1X SSC e SDS 0,1%. Linha 3. Eluído em H<sub>2</sub>O; Linha 4. Marcador de peso molecular. B) *Southern blot* do mesmo gel com a sonda TCVA, da região variável de interesse. O sinal de hibridação é observado após lavagem à estringência máxima de 0,1 X SSC e 0,1 % SDS por 20 min a 65 °C. ....100
- Figura 30. Seqüência completa do clone B7 (excluído os adaptadores), analisada quanto à identidade com seqüências depositadas em banco de dados, e consensos regulatórios. Caracteres verde, região humana com 98% de identidade à região do cromossomo 1 murino genbank gb|AC131797.3|: em negrito, seqüência com identidade de 85% ao elemento *Alu*, acessos THC131610 e THC210708; sublinhado, repetição do tipo CA; negrito itálico, intercessão. Caracteres vermelhos, região conservada de minicírculo de kDNA (identidade de 95% em relação aos acessos gbIM188141; gbIM191881; gbIM191871). Caracteres azuis, região variável de minicírculo. Retângulo Azul - sítio CAAT, Amarelo - Elemento AP1, Cinza - Sítio AP3, Rosa - Sítio AP1 invertido, Vermelho – seqüência TATA Verde: elemento APOB; Elementos AP1 protegem CpG de metilação GGGCGG E CCCGCC.....101

- Figura 31. Confirmação da origem híbrida humano/*T. cruzi* do clone B7 através de ampliações por PCR do DNA de *T. cruzi*, macrófago humano normal, Linhagem subclonal A11 seguido da confirmação da especificidade da amplificação por hibridação por *Southern blot* com sonda interna à amplificação, de acordo com estratégia experimental mostrada na Figura 5. A) Amplificação da região humana com os iniciadores IS e sat2 observam-se o sinal positivo de hibridação com a sonda humana 396 no produto proveniente do macrófago normal (2) e do A11 (3), e ausência do sinal no DNA de *T. cruzi* (1), o controle positivo da amplificação e hibridação foi o clone B7 (4), controle negativo da amplificação (5). B) Amplificação da região híbrida com os iniciadores IS e SK36; nota-se a positividade de hibridação com a sonda humana 396 somente no A11 intacto (4); e ausência de hibridação no *T. cruzi* (2) e no macrófago normal (3); controle positivo de hibridação (1) e de amplificação (5), controle negativo da amplificação (6).....102
- Figura 32. Segmentos de kDNA capturados dos genomas de macrófago A11 e do tecido cardíaco de coelho chagásico (Nadjar Nitz – dados não publicados), após amplificação por PCR a partir dos adaptadores e hibridação por *Southern blot* com a sonda da região humana (sonda 296) do clone B7 (A, B, C) e com a sonda 122 da região conservada de minicírculo (D) A) Padrão de hibridação com a sonda 296 dos segmentos capturados e purificados em acrilamida do A11-*EcoR* I, (Figura 25) bandas 1 a 5 (B1 a B5) e 7 (B7), observa-se a presença do sinal positivo somente na banda 7 (B7) e B) padrão de hibridação das bandas 8 a 12 (B8 a B12) com as sonda 296 da mesma captura purificada da acrilamida (Figura 25), nota-se o sinal positivo de hibridação nas bandas 9 (B9) e 10 (B10) e no controle positivo de hibridação B7 (+). C) Padrão de hibridação com a sonda 296 dos segmentos de kDNA capturados a partir do genoma de coelho chagásico digerido com *EcoR* I (1 a 5) e do kDNA capturado da região de integração presente na banda 7 kb do DNA do A11 digerido com a enzima *Cla* I (7 e 8), onde (1) corresponde à captura eluída na solução 2X SSC, SDS0,1% 20 min a 65 °C; (2) material capturado na eluição em H<sub>2</sub>O (1 hora a 65°C), (3) obtido da eluição em H<sub>2</sub>O (durante a noite a 65°C); (4) e em formamida (1 h/ 65 °C), (7) DNA de A11 recuperado da eluição com H<sub>2</sub>O; e (8) com 0,1X SSC e 0,1% SDS. Observa-se complementaridade com a sonda humana somente nas bandas recuperadas do tecido de coelho, após lavagem das membranas na estringência máxima de 0,1 SSC e 0,1 % SDS à 65 °C por 20 min. Linha 6: controle (-) de amplificação. D) Mesma membrana hibridizada com sonda a 122 observa-se sinal positivo de hibridação tanto nos segmentos capturados do coelho como capturados do A11- *Cla* I.....103
- Figura 33. Posicionamento e tamanho das diferentes fases abertas de leitura encontradas no clone B7 (ORFs). A) Esquema do clone B7 identificando as regiões conservada e variável do minicírculo de kDNA e a humana, respectivamente, pelos retângulos vermelhos, azul e amarelo; a numeração mostra, em pares de bases, a posição do início das ORFs encontradas nas fitas positiva (B) e negativa (C) do clone. B) Fases de leitura das ORFs presentes na fita (+) do clone B7, identificando a posição da base nitrogenada que dá início e fim da ORF, bem como o número de resíduos de aminoácido (Aa) da cadeia polipeptídica. C) Fases de leitura das ORFs presentes na fita (+) do clone B7, identificando a posição da base nitrogenada que dá início e fim da ORF, bem como o número de resíduos de aminoácido (Aa) da cadeia polipeptídica.....104
- Figura 34. Pesquisa de similaridade entre os supostos peptídeos codificados pelo segmento B7 com seqüências depositadas em banco de dados do Sistema Blastp (www.ncbi.nlm.gov). a) acesso recuperado do banco de dados; C – região do peptídeo codificado pelo B7 que apresentou similaridade com a proteína do banco de dados; S – resíduos de aminoácido comuns (letra) ou com concordância de carga/hidrofobicidade; P – região da proteína recuperada do banco de dados que apresentou similaridade com o segmento protéico codificado pelo B7. Letras azuis: dissimilaridades entre as seqüências mostradas. A numeração apresentada na parte superior dos desenhos esquemáticos indica a posição, em pares de bases, da ORF no clone B7, o número mostrado na região colorida do retângulo inferior do esquema indica o número e a posição da ORF (Figura 33) no B7, as cores no retângulo superior dos esquemas mostram a localização das regiões humana (amarelo), variável de minicírculo de kDNA (azul) e a região conservada de minicírculo de kDNA (vermelho). aa – resíduos de aminoácidos. ....106
- Figura 35. Retardamento na mobilidade eletroforética observada no segmento B7, após ser isolado e purificado do plasmídeo, indicando a presença de conformação não B. a- Padrão de migração eletroforética do clone B7 (Linha 1) visualização em gel de agarose após isolamento do plasmídeo. b - Hibridação por *Southern blot* com sonda de 122 pb do mesmo gel mostrado na figura 36a. Observa-se sinal de hibridação na posição de 1,1 kb (tamanho real do segmento), e nas posições de 3,0 kb e 2,1 kb; c) padrão obtido da eletroforese em gel de acrilamida não desnaturante a 4 °C. Nota-se o retardamento na migração do segmento de 1,1 kb para a faixa de 2 a 3 kb.....107
- Figura 36. Distribuição da tensão e identificação das regiões que contribuem para as curvaturas e dobramentos presentes no clone B. As letras “a” a “k” indicam as bases centrais dos segmentos que

- proporcionam maior tensão na molécula, CA: microssatélite; PI: Ponto de integração; A) Seqüência de bases do clone B7 a posição nas seqüências das regiões de tensão, ponto de integração e microssatélite. B) Representação gráfica das tensões que geram curvaturas (linha vermelha) e teores de C/G na molécula (linha azul). C) Imagem gerada pela distribuição das curvaturas.....109
- Figura 37. Imagem da região hospedeira antes e após a integração do material genético exógeno. A) Região B7; B) Região G10. ....110
- Figura 38. Conformação das regiões genômicas hospedeiras antes da integração do material genético exógeno. Em vermelho flanco da integração e azul região de corte. Observa-se a conformação característica próxima ao ponto de corte. A) Região LINE-1 posição 192 (ponto de recombinação no cofator do fator da RNAPol II) e 733 (ponto de entrada do kDNA) B)Região de integração do conjunto LINE1/kDNA.....111
- Figura 39. Distribuição da bendabilidade das regiões de integração. Observa-se a redução de tensão em todos os pontos onde houve a entrada de material genético exógeno. A) Região B7 antes e pós integração do kDNA; B) Região cofator do fator de transcrição para RNAPolII antes e após a entrada do segmento L1-kDNA; C) Região de integração do kDNA no LINE 1, antes e após a integração. ....112
- Figura 40. Estrutura hipotética do DNA capturado: amplificação por PCR resultando em fragmentos menores do que o esperado, e com iniciador nas extremidades.....127

**RESUMO**

A integração de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma hospedeiro foi correlacionada com alterações na expressão gênica. Com a finalidade de caracterizar as regiões híbridas e ampliar o conhecimento biológico realizou-se os isolamentos e clonagens dos minicírculos integrados no genoma de macrófagos humanos em cultura e de tecidos de coelhos chagásicos. Observou-se instabilidade genética dos segmentos que continham as integrações. As clonagens realizadas em diferentes combinações de vetores e hospedeiras não evitaram os rearranjos. A análise de restrição e o seqüenciamento dos segmentos recuperados mostraram alterações no tamanho e na estrutura do vetor. A técnica de captura desenvolvida no presente estudo permitiu confirmar a instabilidade genética dos minicírculos preferencialmente integrados. A análise de restrição e o seqüenciamento desses fragmentos mostraram que os minicírculos recuperados apresentaram encurtamentos nas regiões variáveis em relação ao padrão descrito na literatura. Verificou-se que o encurtamento ocorreu durante ou após a integração no genoma. As regiões variáveis encurtadas de 50 pb foram recuperadas das linhagens subclonais de macrófago A11, C4, C6 e coração de coelhos chagásicos. Quando comparadas entre si essas regiões apresentaram similaridade na ordem de 90%. Em relação à região variável 80 pb, recuperada do macrófago C6, a similaridade foi em torno de 75%. O resultado sugeriu a existência de classes de minicírculos que se integram preferencialmente no genoma hospedeiro. Foram obtidos clones híbridos estáveis contendo o final da região conservada nas extremidades seguidas pela região variável truncada, fragmento de elemento LINE-1, com ou sem a presença de microssatélite. A origem híbrida foi confirmada por fragmentação do clone que foi utilizado como sonda na hibridação de macrófagos humanos normais e DNA de *T. cruzi*. O segmento B7, obtido por captura, apresentou o minicírculo de kDNA com 4 regiões variáveis truncadas, intercaladas por regiões conservadas normais seguidas do microssatélite CA e da região humana com similaridade ao clone murino AC131797.3. A análise “in silico” do segmento B7 mostrou a presença de seqüências regulatórias da expressão gênica. Foram identificadas 9 possíveis ORFs, sendo duas compreendo a região híbrida (ORF1 e 2). Verificou-se nas integrações recuperadas de coração de coelhos chagásicos segmentos similares à região humana encontrada no clone B7, indicando a recorrência dos sítios recombinativos. A análise “in silico” do clone B7, G10 e das regiões hospedeiras obtidas dos bancos de dados mostrou a presença de estruturas do tipo não B nos locais próximos ao ponto de recombinação. A presença da estrutura não B no segmento B7 foi confirmada pela alteração na mobilidade eletroforética. Em todos os pontos de entrada do minicírculo no genoma hospedeiro verificou-se a redução da tensão local e aumento da tensão global na região, sugerindo a possibilidade de ocorrência de novos eventos recombinativos envolvendo o segmento. O conjunto das informações indica que a integração é mediada por recombinação homóloga mediada por similaridades estruturais presentes no DNA hospedeiro e minicírculo de kDNA.

ABSTRACT

---

**ABSTRACT**

The integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences into the host cell' genomemay result in alterations of genic expression. To achieve the characterization of the hybrid regions and enhancement of the biological knowledge the isolation and cloning of the integrated minicircles was made in vitro in the human macrophages and in the chagasic rabbit tissues. Genetic instability of the segments with the integrations was observed. The cloning made it in different combinations of vectors and hosts did not avoid deletion and rearrange. The capture technique developed in the present study showed kDNA integration events with the genetic instability. The sequencing of the kDNA integrated events and restriction analysis revealed that the minicircle sequences were frequently rearranged; short minicircle variable regions fragments were constantly found in relationship to the standard size describe in literature. Possibily, deletions of integrated sequences took place during or after the kDNA integration into the macrophage genome. Short variable regions (50 pb) was recovered from macrophages cell lines A11, C4, C6 and from chagasic rabbits. Those integrated kDNA minicircles shared 90% sequences similarities. The variable region stretches also revealed 75% similarities among them. These results suggest that classes of minicircles integrate preferentially in the macrophage genome. Somewhat stable hybrid clones were found with the final conserved region followed by a fragment of the variable region linked to the LINE-1 sequence, with or without the presence of microsatellites. The hybrid origin of these sequences was demonstrated by hybridization experiments with segment specific chimera sequence fragments. A capture procedure revealed a B7 fragment showing the kDNA minicircle with 4 truncated variable regions interspersed by CA microsatellite with similarity to the AC131797.3 murine clone. The "in silico" analysis of the B7 fragment showed the presence of genic expression regulatory sequences in the minicircle region. The identification of nine putative ORFs within hybrid regions (ORFs 1 and 2) was recorded. The kDNA integration events detected into the heart DNA from chagasic rabbits showed similar host regions to that of clone B7 clone, indicating that homologous recombination was the mechanism whereby the kDNA integrated into the vertebrate genome. The presence of B structures in the DNA sequences at the integration sites has suggested that bends formed in those sites explains the alterations in the eletrophoretic mobility presented in those clones. At the integration sites in the host genome bends formed by reduced tension forces forming torsion angles, thus indicating the possibility of new integration events, deletions and recombinations at the spot. These findings showing sequences similarities present in the host DNA and kDNA minicircle sequences have suggested that the kDNA integration might be mediated by homologous recombination.

## I. INTRODUÇÃO

### 1. A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas surge no homem, e em outras espécies de mamíferos susceptíveis, em consequência da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é transmitida pelos insetos vetores hematófaga da família *Triatominae* ou pela transfusão sangüínea. A doença tem prevalência na América Central e do Sul, onde aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoa estão infectadas. No Brasil, em 1992, havia cerca de 5 milhões de indivíduos chagásicos (DIAS et al., 2002). Apesar de se constatar uma redução significativa na transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* e melhoria dos controles nos bancos de sangue, 25% da população da América Latina ainda correm o risco de adquirir a doença (MOCAIO, 1997; STORINO, 1997; DIAS et al., 2002; DE PAULA et al., 2008).

Existem mais de 1200 espécies de mamíferos silvestres que servem de reservatório para o *Trypanosoma cruzi* convivendo em estado de aparente equilíbrio com o protozoário (BARRETO, 1979). Já no homem e em vários hospedeiros domésticos, a Doença de Chagas manifesta-se em diferentes graus de severidade. Os mecanismos de invasão da célula hospedeira, multiplicação intracelular, e disseminação, são fundamentais no ciclo de vida do parasita. E como o organismo reage a cada uma destas etapas é fator determinante para no curso da infecção (TEIXEIRA et al., 2006).

A infecção chagásica pode gerar quadros clínicos com características variadas, tanto na espécie humana, como em algumas espécies domesticas tais como coelhos e camundongos, apresentando uma fase aguda geralmente sem sintomas e uma fase crônica que pode permanecer muitos anos na forma indeterminada. Curiosamente, quando a parasitemia está mais baixa ou mesmo indetectável pelas técnicas de hemocultura, ou pelo xenodiagnóstico, é que surgem as manifestações clínicas denominadas “mega síndromes”. Os danos são irreversíveis e a gravidade do quadro depende da localização e intensidade das lesões (MOCAIO, 1997; GOMES et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2006).

No Brasil, estudos em áreas endêmicas têm evidenciado que a distribuição das formas clínicas apresenta diferenças regionais. Na Bahia parece predominar as formas cardíacas; em Goiás, megas esôfago e intestino; Minas Gerais, formas mistas (cardíaco e digestivo); no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro a maioria dos chagásicos é assintomática (COURA et al., 1983; TEIXEIRA et al., 2006). Estas variações também foram observadas em outros países como o Panamá e Venezuela, onde só existe a forma cardíaca; na Argentina e Chile, presença de diversas formas clínicas distribuídas regionalmente

## INTRODUÇÃO

---

(GUEVARA et al., 1977; MIJAREZ, 1965; MINOPRIO, 1966; ATIAS, 1969). Isto sugere que fatores genéticos do parasita e do hospedeiro poderiam estar associados às manifestações clínicas observadas.

Grande parte das informações sobre a resposta do hospedeiro ao parasita provém de estudos da fase aguda em modelos murinos, onde a parasitemia é alta. Todavia, em humanos, esta fase é pouco observada, devido ao pequeno número de pacientes que procuram assistência médica neste período (TEIXEIRA et al., 1978a, TEIXEIRA et al., 2006).

À medida que ocorre a progressão da doença, a parasitemia diminui. Ao atingir a fase crônica são freqüentes os relatos de xenodiagnósticos negativos, e ausência de *T. cruzi* nos sítios das lesões. Entretanto, as provas sorológicas persistentes positivas, e recentemente, a amplificação do DNA do parasita pela técnica de reação de polimerase em cadeia (“*Polimerase Chain Reaction*” – PCR) (TEIXEIRA et al., 1983; MONTEÓN et al., 1996; WINCKER et al., 1997; GOMES et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2006) mostram que o protozoário pode persistir no hospedeiro cronicamente infectado por toda a vida.

### 1.1 - A Fase Aguda

Esta fase se caracteriza pela presença de parasitas no sangue e intensa infecção tecidual, que em humanos persiste por períodos de até seis meses. A destruição dos tecidos é causada tanto pela própria ação mecânica e/ou tóxica do parasita, como pela resposta imunológica do hospedeiro, que neste período encontra-se em intensa atividade (RASSI, 1979; ROSSI, 1997; TEIXEIRA et al., 2006).

No início da fase aguda murina, os macrófagos apresentam elevados níveis de secreção da interleucina INF $\gamma$ . Neste estágio são capazes de fagocitar e destruir com sucesso as formas infectantes opsonizadas do *T. cruzi* (PLATA et al., 1987). A ativação de macrófagos leva ao aumento no metabolismo oxidativo e conseqüente formação de radicais intermediários altamente reativos e óxido nítrico. Não obstante o forte efeito tripanocida do óxido nítrico (NO) (VESPA et al., 1994), não se observa a participação deste radical nas lesões cardíacas (PETRAY et al., 1995, FLAHERTY, 1991). Segundo Cardoni e colaboradores (1997), os compostos oxigenados intermediários é que seriam responsáveis pela destruição do *T. cruzi*, o que indiretamente poderia provocar as lesões.

Além dos macrófagos, observa-se uma forte expansão policlonal específica e inespecífica de células CD5 B, CD4 $\alpha\beta$ , CD8 $\alpha\beta$ , CD8 $\gamma\beta$ , CD8 $\gamma\delta$ , DNT $\gamma\delta$ , NK, (TEIXEIRA et al., 1978b; PETRY; VAN

## INTRODUÇÃO

---

VOORHIS, 1991; MONTEÓN et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1996; MINOPRIO et al., 1989 e 1998; PYRRHO et al., 1998, TEIXEIRA et al., 2006), predominando as classes de imunoglobulinas IgG2a e IgG2b (MINOPRIO, 1998; PYRRHO et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2006). Esta ativação aparece precocemente na fase aguda, e pode persistir por um longo período da fase crônica.

A expansão policlonal de linfócitos tem sido associada ao escape de patógenos às respostas imunológicas (LOCKSLEY, 1997). Além deste mecanismo de escape, outros mais são observados na infecção chagásica. Por exemplo, em paralelo a ativação policlonal, observa-se uma forte imunossupressão (TEIXEIRA et al., 1978a e b), decorrente do desbalanceamento na concentração de várias interleucinas. Soong e Tarleton (1992) mostraram que parte deste fenômeno decorreria dos baixos níveis de IL-2, conseqüente da liberação de fatores solúveis pelo *T. cruzi*. Estes fatores impediriam tanto a expressão do receptor IL-2 (BELTZ e cols. 1988), como também da própria interleucina, além de promover a redução dos níveis de mRNA de importantes sinalizadores intracelulares (*c-myc* e *c-fos*).

Outro mecanismo de evasão está relacionado com a capacidade que *T. cruzi* possui de endocitar anticorpos ligados à sua superfície pela porção Fab (CICARELLI; LOPES, 1989). Após a internalização, estes anticorpos são completamente degradados no interior dos vacúolos fagocíticos, servindo como fonte de nutrição para o parasita (TEIXEIRA; SANTANA, 1989 e 1990).

Com o transcorrer da infecção, a resposta imunológica se normaliza, observa-se uma significativa redução na parasitemia e o indivíduo entra na fase crônica da doença.

### 1.2 -A Fase Crônica

Em decorrência dos mecanismos de escape do parasita a infecção não é erradicada, e o organismo entra na chamada fase crônica indeterminada, que pode durar muitos anos. Estudos clínicos mostram que 27% dos pacientes evoluem para as manifestações cardíacas, 6% para as digestivas e 3% para as neurológicas, sendo o comprometimento desses órgãos ou estruturas variável de acordo com o número e localização das lesões. O tratamento com benzonidazol nas fases iniciais da doença, apesar de negatizar a sorologia em 20% dos casos, não impede a progressão das lesões cardíacas (TEIXEIRA et al., 1990; PARADA et al., 1997).

O parasita, na manifestação clínica da doença de Chagas crônica, é mais difícil de ser detectado pelos métodos convencionais. Na maioria dos casos, há grande dificuldade de correlacionar a presença do *T. cruzi* com a intensidade das lesões cardíacas e digestivas da doença de Chagas (SANTOS-BUCH e

## INTRODUÇÃO

---

TEIXEIRA, 1974; FRANÇA et al., 1997). Recentemente, a presença de infecção em níveis subpatentes tem sido demonstrada através da técnica que amplifica seqüências genômicas específicas do parasita (PCR). Estes dados têm demonstrado que, apesar do tratamento com drogas tripanocidas, o parasita é capaz de persistir no organismo por toda a vida do indivíduo chagásico crônico (JONES et al., 1993; BRANDARIZ et al., 1995; MONTEÓN et al., 1996; VAGO et al., 1997). Contudo, os resultados de PCR que amplificam segmentos de DNA do cinetoplasto de *T. cruzi* precisam ser examinados com cautela diante dos achados de Teixeira e colaboradores (1994). Estes autores encontraram material genético do cinetoplasto, mais especificamente dos minicírculos, presentes persistentemente na célula hospedeira, mesmo após a eliminação do *T. cruzi*. Argañaraz (1996), em sua tese de doutorado, descreve a possível integração de fragmentos de minicírculos no genoma de macrófagos murinos em cultura (P388D1-IL1), anteriormente infectados com *T. cruzi*.

### ***a) Fatores imunitários associada à fase crônica***

As freqüentes observações de ausência de *T. cruzi* nos sítios das lesões motivaram muitos grupos de pesquisa a suspeitar da participação de componentes auto-imunitários na doença de Chagas (RIZZO; et al., 1989; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1992; CUNHA-NETO et al., 1995; KALIL; CUNHA-NETO, 1996; NAVA, et al., 1996; ABEL et al., 1997a e b, TEIXEIRA et al., 2006), já que nestes sítios é comum a presença de infiltrados mononucleares, principalmente linfócitos, associados à destruição tecidual (SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974; FRANÇA et al., 1997; HIGUCHI et al., 1997, TEIXEIRA et al., 2006).

A existência de linfócitos auto-reativos e anticorpos que reconhecem não somente estruturas do parasita, mas também do hospedeiro (ou epítomos do parasita compartilhados nas células mamíferas), reforça a idéia da auto-imunidade, e sugere a existência de um mecanismo de auto-agressão imunológica desencadeada por um mimetismo molecular (SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974, TEIXEIRA et al., 1978a e b; CUNHA-NETO et al., 1995; ABEL et al., 1997a e b, TEIXEIRA et al., 2006).

Ribeiro dos Santos e colaboradores 1992, através de transplantes singenéticos, demonstraram a rejeição de corações de neonatos sadios implantados em orelhas de camundongo chagásicos crônicos. Esta observação indicaria que fatores auto-imunitários poderiam por si só ser responsáveis pelas lesões cardíacas. Entretanto, Tarleton e colaboradores (1997), utilizando outra linhagem isogênica de camundongo, obtiveram resultados contrários aos do Ribeiro dos Santos, sugerindo que, pelo menos neste

## INTRODUÇÃO

---

caso, as lesões chagásicas decorreriam da agressão imunológica direcionada ao *T. cruzi* presente no tecido parasitado. Possivelmente, a patogenia da doença de Chagas estaria associada à ocorrência dos dois eventos conjuntamente (LOCKSLEY, 1997).

### 1.3 - Aspectos da biologia do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da família *Kinetoplastidea* (Chagas, 1909), e caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única denominada cinetoplasto, localizada na base flagelar.

Na natureza o *T. cruzi* circula em insetos-vetores hematófagos da família *Triatominae*, e em hospedeiros mamíferos silvestres, domésticos, e no homem (BARRETO, 1979; GARCIA; AZAMBUJA, 1991).

O ciclo de vida do parasita é complexo e apresenta três formas morfológicamente distintas: tripomastigotas sanguíneo e metacíclico, epimastigota e amastigota.

O triatomíneo se contamina durante o repasto no animal infectado. As formas tripomastigotas sanguíneas, se diferenciam a epimastigotas no estômago e intestino do inseto. Após um período de proliferação no intestino inferior, passam para os tubos de Malpighi e intestino posterior. Nesta etapa, nova transformação ocorre, gerando as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, que são eliminadas nas fezes, após o repasto do inseto, permitindo a contaminação de um novo hospedeiro vertebrado. No mamífero, as formas metacíclicas infectam tanto células fagocíticas como não fagocíticas, onde se transformam em amastigotas. Depois de sucessivas divisões binárias intracelulares, ocorre diferenciação de amastigota em tripomastigota. Estas formas rompem a célula hospedeira e reiniciam o ciclo de infecção.

Em condições laboratoriais, *T. cruzi* é mantido em meios semi-sólidos e líquidos, em fragmentos de tecidos, em cultura de células de linhagens primárias ou em linhagens estabelecidas, tais como coração, rim, pele, pulmão, músculo, macrófagos, entre outras.

O *T. cruzi* apresenta grande diversidade genética, e freqüentemente são observadas variações na morfologia, virulência e tropismo tissular, o que tem motivado a busca de marcadores para prognosticar as manifestações da doença (LAURIA-PIRES, et al., 1996; VAGO, et al., 1996a e b; TEIXEIRA et al., 2006). Não foi demonstrada a reprodução sexuada em *T. cruzi*. Acredita-se que mutações acumuladas ao longo do tempo sejam as responsáveis pela diversidade genética dos isolados. Comparações entre os

DNAs do cinetoplastos de diferentes cepas corroboram para uma natureza clonal do parasita (TIBAYRENC et al., 1990; SIMPSON, 1997).

## **2. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES E ESTRUTURAÇÃO DOS GENOMAS**

### **2.1 - Transferências horizontais de genes**

A idéia clássica de evolução propõe que todos os organismos tenham um ancestral comum e que a diversidade genética encontrada nas espécies seja decorrente das mutações, recombinações e seleção natural ocorrida ao longo dos milênios. Segundo a teoria Darwiniana de evolução, uma espécie transfere, verticalmente, a herança genética contida em seu genoma para a sua progênie e a diversidade e a variabilidade decorreriam unicamente do acúmulo de mutações e rearranjos nos genomas. Até recentemente, acreditava-se que uma espécie assim diferenciada teria perdido a capacidade de transmitir horizontalmente seqüências de DNA para outras espécies. Entretanto, com o advento da era genômica, verificou-se que a diversidade genética é em grande parte promovida pela aquisição de DNAs exógenos, fusão de genomas seguida ou não de rearranjos no material genético híbrido (HACKER; KAPER, 2000; GOGARTEN et al., 2002; KATZ, 2002; KURLAND et al., 2003; CHOI; KIM, 2007; GRINDLEY et al., 2006; MARRI et al., 2007; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007; ROGERS et al., 2007).

Nos genomas mamíferos, grande parte do material genético compõe-se por segmentos de DNA repetitivos adquiridos pela integração de vírus, retrovírus e elementos transponíveis. Essas seqüências quando ativas, podem mobilizar segmentos do genoma tanto para outras células como para outros organismos, não necessariamente da mesma espécie, o que vem contribuindo significativamente para a evolução dos genomas e variabilidade genética (LEWIN, 2004; KIM et al., 2004; FAWCETT et al., 2006; CASSE et al., 2006; HAN et al., 2007).

Todos os segmentos de DNA são potencialmente capazes de serem transferidos de um genoma para outro independente da participação de vírus, retrovírus ou outra partícula carreadora de material genético (LEWIN, 2004; LAWRENCE; HENDRICKSON, 2003). Desde que haja abundância de DNA no ambiente extracelular ou no citoplasma é possível a absorção de segmentos e sua incorporação ao genoma. Este fenômeno é comum às células procarióticas e eucarióticas e vem sendo explorado em muitos estudos da biologia molecular e engenharia genética (LEWIN, 2004).

## INTRODUÇÃO

---

Sabe-se que muitos genes presentes em parasitas tiveram origem nos genomas dos seus hospedeiros e vice-versa (DAVIS; WUDACK, 2004; MOWER et al., 2004; CHOI et al., 2007), e que muitos segmentos de DNAs nucleares tiveram origem nas organelas e em seus endossimbiontes (RUJAN; MARTIN, 2001; KATZ, 2002). A análise do genoma de *Arabidopsis thaliana* indicou que 400-2200 genes dessa planta foram herdados de cianobactérias (RUJAN; MARTIN, 2001). Da mesma forma, a análise genealógica de dois grupos de actinas presentes em *Pyrenomonas helgolandii*, uma alga criptófito, indicou que um dos grupos originou-se da transferência horizontal de uma alga vermelha simbiote (STIBITZ et al., 2000; KATZ, 2002).

A transferência horizontal não se restringe apenas à transferência de fragmentos de material genético de uma célula para outra. Eventualmente genomas inteiros são fundidos gerando-se um organismo híbrido que pode ou não ser viável e gerar descendentes férteis. Este fenômeno ocorre tanto em procariontes, através de conjugação interespecífica, como em eucariontes (RAVEL et al., 2000). Em plantas, são transferidos genomas inteiros por fecundação cruzada. A atemóia é um exemplo deste fenômeno e resulta do cruzamento entre *Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L (NEVES et al., 2003; MELO et al., 2002). Em mamíferos, apesar de mais raro, existem relatos de cruzamentos interespecíficos, alguns aproveitados comercialmente, como no exemplo do cruzamento entre porco e javali (*Sus domesticus* X *Sus scrofa scrofa*) resultando no javaporco, animal servido como iguaria em muitos centros urbanos (LUI, 2000).

A incorporação do DNA exógeno pela célula receptora pode ser definitiva ou transitória. A estabilidade da transferência dependerá do tipo e da estrutura genética do material transferido, da capacidade de expressão de produtos tóxicos, dos locais da inserção no genoma, dos mecanismos de salvaguarda do DNA e da atuação de barreiras reprodutivas (KURLAND et al., 2003; LEWIN, 2004; LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; Song et al., 2001; KOUPRINA et al., 2003; BACOLLA et al., 2004; LAN E MUGUIRA, 2005; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; GRINDLEY et al., 2006, WANG et al., 2006; WOJCIECHOWSKA et al., 2006; DU et al., 2007; WANG; VASQUEZ, 2004, 2006 e 2007; MARRI et al., 2007).

A transferência horizontal pode ocasionar instabilidade genética na célula receptora, gerando rearranjos variados. Após a integração, são frequentes os relatos de duplicações, translocações ou deleções, envolvendo pequenos ou grandes segmentos cromossômicos, gerando novas combinações genômicas (Wilkie e Palmiter, 1987; Covarrubias et al., 1986; KOUPRINA et al., 2003; KIM e col.,

## INTRODUÇÃO

---

2004; GRINDLEY et al., 2006; DU et al., 2007; HAN e col., 2007). O fenômeno contribuiu, e provavelmente ainda vem contribuindo, para o surgimento de novas combinações genômicas nos três grandes ramos filogenéticos Archea, Bactéria e Eukarya (HACKER; KAPER, 2000; KATZ, 2002; GOGARTEN et al., 2002; MOWER et al., 2004; CHOI; KIM, 2007; MARRI et al., 2007; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007; ROGERS et al., 2007).

Em termos evolutivos, a grande maioria das novas combinações resultantes de fluxo gênico seria neutra (GOGARTEN et al., 2005; THOMPSON et al., 2005). Contudo, é inegável a importância do fenômeno na adaptação das espécies a nichos ecológicos específicos, conforme indicam os estudos filogenéticos de determinados grupamentos protéicos (HACKER; KAPER, 2000; KATZ, 2002; GOGARTEN et al., 2002; MARRI et al., 2007).

Apesar de ser um fenômeno natural aparentemente comum, o verdadeiro impacto da transferência horizontal na evolução dos genomas eucarióticos ainda é pouco conhecido em virtude da deficiência dos métodos de detecção (RUJAN; MARTIN, 2001; STIBITZ et al., 2000; KATZ, 2002; KURLAND et al., 2003; AZAD; LAWRENCE, 2005; ROGERS et al., 2007; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007). Os métodos utilizados para identificar a transferência horizontal podem ser divididos em dois grupos: os paramétricos e os filogenéticos (AZAD; LAWRENCE, 2005; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007). O método paramétrico baseia-se na detecção de composições atípicas de seqüências quando a região é comparada com o restante do genoma, enquanto que o método filogenético procura por conflitos entre a filogenia do segmento gênico em relação ao restante do genoma. Estas duas técnicas identificam regiões de transferência que muitas vezes não se sobrepõe, sugerindo a necessidade de desenvolvimento de ferramentas mais adequadas para estudar o fenômeno (AZAD; LAWRENCE, 2005; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007). Estudos recentes empregando modelagem “in silico” indicam que a taxa de transferência deva ser maior do que a estimada pelos métodos atuais (CHOI; KIM, 2007; POPTSOVA; GOGARTEN, 2007).

### **2.2 - Transferências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma da célula hospedeira**

A progressão das lesões cardíacas em indivíduos chagásicos crônicos, a despeito da baixa parasitemia, motivou a hipótese elaborada por Teixeira e colaboradores (1991 e 1994) de que as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* induziriam alterações no genoma hospedeiro que poderiam

## INTRODUÇÃO

---

correlacionar-se a sintomatologia característica dessa fase. As primeiras evidências da transferência de genes do parasita para o hospedeiro foram obtidas a partir dos estudos citogenéticos e hibridação *in situ* realizadas por esses autores. Após análise dos macrófagos peritoneais isolados de camundongos chagásicos verificou-se a presença de estruturas anormais nas cromatinas, que não eram observadas nas células dos animais saudáveis. O resultado das hibridações dos cromossomos com sondas de DNA do parasita sugeriram integração do material genético do *T. cruzi* no genoma hospedeiro. Os autores também mostraram que haveria maior frequência de integração nos cromossomos 3, 6 e 11 e que o material genético encontrado provinha, exclusivamente, dos minicírculos do cinetoplasto. Com a finalidade de testar a hipótese de integração, os autores passaram a trabalhar com linhagens de macrófagos (humano U937) infectados com o *T. cruzi* e posteriormente tratadas com benzonidazol. Erradicada a infecção, as amostras de DNA foram colhidas para as análises do perfil de restrição e presença de sinal de hibridação com sonda de minicírculos. O resultado reforçou a hipótese de transferência do DNA parasita para a célula hospedeira.

Argañaraz (1996) obteve linhagens de macrófago com segmentos de minicírculos de kDNA integrados ao genoma após infectar células humanas em cultura com o parasita. Através da amplificação por PCR utilizando seqüências de minicírculos como “iniciador”, esse autor obteve regiões com seqüências híbridas minicírculo/DNA mamífero, cuja análise em banco de dados mostrou dois eventos contíguos de integração de minicírculos intercalados por um fragmento de elemento transponível da família LINE-1.

No estudo conduzido por Simões-Barbosa e colaboradores (1999) com soro de pacientes chagásicos e células murinas com e sem integração de kDNA, evidenciou-se que a transferência do kDNA poderia afetar a expressão gênica da célula receptora. Essa mudança no padrão de expressão foi observada nos primeiros três meses de repiques o que pode ser um indicio de instabilidade genética na célula.

Nitz e colaboradores (2004) mostraram que tanto em coelhos como em galinhas o kDNA de *T. cruzi* integra-se preferencialmente em regiões do elemento transponível LINE-1. Essas seqüências apresentavam estruturas de kDNA repetidas e rearranjadas, sugerindo sucessivas integrações ou instabilidade genética da região clonada (TEIXEIRA et al., 2006).

### 2.3 – Elementos repetitivos

Em consequência do “Projeto Genoma”, sabe-se hoje que apenas 3% do material genético haplóide de uma célula mamífera são compostos por seqüências que codificam para cadeias polipeptídicas (éxons), o restante compreende os chamados “refugos”, onde estão distribuídas as diversas repetições de origem não viral ou viral agrupadas genericamente em satélites, minissatélites, microsatélites, telômeros, seqüências repetitivas curtas, dentre elas SINES, *ALU* e *MIR*, e longas, tais como *LINES*, *L1* e *L2 LTR* (LEWIN, 2004; revisto em BERNARDI, 1995; KAZAZIAN; MORAN, 1998, INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001; KIM et al., 2004; HAN et al., 2007). Nos grupos de seqüências repetitivas curtas e longas encontram-se os elementos transponíveis (elementos móveis), as seqüências interruptoras de genes (íntrons) e os provírus, tanto de origem viral como retroviral (revisto em BERNARDI, 1995; BIEMONT; VIEIRA, 2003; FAWCETT et al., 2006; HAN et al., 2007).

Os elementos móveis curtos e longos foram identificados em todos os genomas onde foram procurados. Em humanos aproximadamente 60% desses elementos estão localizados na região de heterocromatina (BIEMONT; VIEIRA, 2003), sendo agrupados em duas categorias de acordo com existência ou não de um intermediário de RNA durante o processo de mobilidade no genoma. Na primeira categoria estão as seqüências com capacidade de transposição direta, tais como elementos transponíveis de origem viral, seqüências *IS*, *Tn*, e muitos íntrons, que se mobilizam por mecanismos de recombinação não homóloga replicativa ou não replicativa. A segunda categoria compreende os elementos de origem retroviral e transposons que se locomovem via mecanismo de retrotransposição (FINNEGAN, 1983; WEISS et al., 1985; VARMUS, 1988; LEWIN, 2004; BUZDIN et al., 2007). Mais de 40% do genoma mamífero é constituído por segmentos originários de retrotransposição (BUZDIN et al., 2007). De acordo com a similaridade de seqüências, os diferentes elementos móveis podem ainda ser agrupados em superfamílias, famílias e subfamílias dentro de cada categoria (HAN et al., 2007).

A grande maioria das partículas móveis apresenta em sua estrutura as informações necessárias para promover a sua expansão, ou transferência de um ponto do genoma para outro. Contudo, algumas famílias necessitam da expressão de enzimas de outros elementos móveis ativos para se transporem, como no caso dos SINES, que se movimentam por retrotransposição com o auxílio da maquinaria de outros retrotransposons (HAN et al., 2007; FAWCETT et al., 2006; GU et al., 2007).

## INTRODUÇÃO

---

Existe uma forte correlação entre as seqüências de bases das repetições que interrompem seqüências gênicas, os íntrons e as seqüências que compõe o grupo dos elementos móveis no genoma. Essa semelhança levou à especulação de que os íntrons e os elementos móveis poderiam estar evolutivamente correlacionados (LAMBOWITZ, 1989; CAVALIER-SMITH, 1991; HICKEY, 1992; LEWIN, 2004).

As inserções de elementos móveis no genoma, dependendo da natureza do elemento repetitivo, podem alterar a expressão gênica (DEININGER et al., 2003), se rico em regiões CG, como no caso dos elementos *Alu*, podem introduzir novas ilhas CpG (Lander et al., 2001), podem gerar deleções (HAN et al., 2005) ou criar novos genes ou famílias gênicas (XING et al., 2006, BUZDIN et al., 2007).

As seqüências repetitivas semelhantes, móveis ou não móveis, podem estar arranjadas próximas umas das outras formando estruturas simples ou complexas, genericamente classificadas quanto as suas orientações na fita de DNA. Deste modo, duas repetições próximas, estando na mesma orientação, formam uma estrutura simples denominada de repetição direta. Igualmente, duas repetições com seqüências invertidas entre si, ou invertidas e complementares, são classificadas no grupo das repetições invertidas, ou no grupo das palindrômicas, respectivamente. Estas seqüências podem estar ligadas umas às outras, formando estruturas complexas, também conhecidas por “tandens”. Estruturas simples ou complexas são encontradas tanto dentro como fora de regiões transcritas (LEWIN, 2004). Conforme a organização das repetições e da natureza da seqüência em termos de composição e distribuição das bases, o DNA pode assumir localmente estruturas diferentes das previstas por Watson e Crick (1953), ou seja, pode formar estruturas diferentes das do tipo B (dupla hélice invertida e complementar de passo direito) e formar alça, grampos, estruturas cruciformes, estruturas do tipo Z, curvas e dobramentos, estruturas triplas ou tipo H, quádruplas ou tetraplex (WANG et al., 2006; KMIEC et al., 1985; STEINMETZ, 1986; LINIAL; SHLOMAI, 1987; KIYAMA; KIYAMA, 1996; GABRIELIAN et al., 1996; GABRIELIAN; PONGOR, 1996; VLAHOVICEK; PONGOR, 1996; KIYAMA et al., 1999; ZHANG; ZHANG, 2003; WANG; VASQUEZ, 2004; WANG; VASQUEZ, 2004; KAUSHIK et al., 2007), que podem ser reconhecidas pelos mecanismos de recombinação celular e propiciar rearranjos diversos no material genético demonstrados em diferentes tipos de estudos (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; SONG et al., 2001; KOUPRINA et al., 2003; LAN; MUGUIRA, 2005; GRINDLEY et al., 2006; DU et al., 2007; WELLS, 2007).

## INTRODUÇÃO

---

Estruturas repetidas invertidas e diretas não móveis são encontradas flanqueando muitos elementos transponíveis ativos e inativos. Os tamanhos das estruturas invertidas variam significativamente de elemento para elemento, podendo apresentar de nove a mais de duzentos pb (LEWIN, 2004; DOAK et al., 1997; BENITO; WALBOT, 1997). As repetições diretas são resultantes da duplicação do sítio de entrada da integração. São seqüências normalmente pequenas, entre 3 a 12 bases. Acredita-se que as enzimas envolvidas reconheçam as seqüências do sítio de entrada e direcionem o evento de transposição, a exemplo do que acontece na integração do fago  $\lambda$  (BELFORT; PERLMANS, 1995; BENITO; WALBOT, 1997; LEWIN, 2004).

No genoma estão presentes milhares de estruturas que possuem capacidade de transposição, porém a maioria encontra-se inativa. Muitas inserções novas, a partir de estruturas transgênicas são silenciadas pouco tempo depois de sua integração. Acredita-se que o silenciamento seja o resultado das discrepâncias entre a composição de CG do elemento inserido e o ambiente do “isochore” receptor. Observa-se também que elementos integrados em regiões pobres em CG são mais freqüentemente inativados que os inseridos em regiões mais ricas em CG (BERNARDI, 1995).

Como há uma coincidência entre os sítios inativos e grau de metilação, vários pesquisadores sugeriram que a metilação poderia ser responsável pelo controle da transposição ao nível de transcrição (BESTOR; TYCKO, 1996; YOLDER et al., 1997). O’NEILL et al. (1998) mostraram a associação entre a diminuição da metilação e ativação de retroelementos, correlacionando o silenciamento à estabilidade do genoma.

### ***a) Elementos repetitivos móveis longos***

Dentre os elementos repetitivos longos de origem viral os mais freqüentes em mamíferos são os LTR (*long terminal repeats*) e os não LTRs (non LTRs), onde se encontram os LINES (*long interspersed elements*) (BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007).

Os LTR caracterizam-se por apresentarem longas regiões repetidas nas extremidades de suas seqüências integradas, com tamanho entre de 250 a 1.400 pb flanqueadas pela duplicação de 4 a 6 bases correspondentes ao sítio de entrada no genoma. Esses elementos são transcritos pela RNA polimerase II durante o processo de mobilização. A fita de mRNA gerada não apresenta cauda poliadenilada, e freqüentemente possui íntrons, que são removidos antes da fita ser traduzida. De um modo geral, os retroelementos possuem as informações necessárias para promover a sua retrotransposição (transcriptase

## INTRODUÇÃO

---

reversa e/ ou integrase), mas ao contrário dos retrovírus, os genes do envelope viral estão ausentes, ou defectivos (LEWIN, 2004; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Dentro desse grupo estão os elementos *Ty* (em levedura), *copia* (em drosófila), *IAP* (em roedores) e *THE1* (em humanos) (LEWIN, 2004).

O segundo grupo de elementos móveis longos compreende a família LINE. Inicialmente, esses elementos foram classificados no grupo dos retroelementos de origem não viral, devido à presença de seqüências poliadeniladas terminais e ausência de LTRs, entretanto as análises das fases abertas de leitura mostraram alta identidade com enzimas retrovirais responsáveis pela retrotransposição (LEWIN, 2004). A estrutura dos LINEs apresenta duas fases abertas de leitura. A primeira codifica uma proteína semelhante à gag com sítio de ligação com RNA e propriedade chaperônica para ácidos nucleicos (HOHJOH; SINGER, 1996; KOLOSHA; MARTIN, 1997; MARTIN; BUSHMAN, 2001; MARTIN et al., 2005), e a segunda fase aberta uma proteína do tipo polimerase com atividade endo-desoxiribonuclease e transcriptase reversa (MATHIAS et al., 1991; FENG et al., 1996). As análises “in silico” dos sítios de integração de LINEs sugerem a participação do mecanismo de reparo de dupla fita do DNA na transposição destes elementos (ICHIYANAGI; OKADA, 2006).

Os LINEs compreendem pelo menos onze classes que são subdivididas em diferentes categorias. As categorias distribuem-se nos genomas de um grande número de espécies eucarióticas (MALIK; EICKBUSH, 1999; ARKHIPOVA; MESELSON, 2000). Dentre essas categorias, o “LINE-1” é a mais freqüente em mamíferos. Acredita-se que existam em torno de 50.000 – 100.000 cópias desse elemento por genoma da maioria das espécies (HWU et al., 1986; SMITH, 1996; HAN et al., 2007; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Devido ao grande número de cópias, são tidos como sítios preferenciais para mediar recombinação homóloga desigual (FANNING; SINGER, 1987; BURWINKEL; KILIMANN, 1998).

Apenas 5% das seqüências LINEs-1 presentes estão completas, o que corresponde a aproximadamente 3500 cópias por genoma. Os restantes 95% encontram-se truncados na sua porção 5' fosfato ou rearranjados (FANNING; SINGER, 1987; DOMBROSKI et al., 1993; BUZDIN et al., 2003; BUZDIN et al., 2007). Os elementos completos variam entre 6 a 7 kb, com o consenso na ordem de 6 kb. A grande maioria acumula códiços de terminação da tradução em suas seqüências de DNA, o que impede a síntese das proteínas responsáveis pela sua locomoção, sendo raros os elementos capazes de se transpor a outros sítios no genoma. Mesmo os elementos potencialmente capazes, grande parte encontra-se inativa ao nível de transcrição, provavelmente por metilação (DOMBROSKI et al., 1993; BABUSHOK;

## INTRODUÇÃO

---

KAZAZIAN, 2007). Acredita-se que existam no genoma humano apenas 20 a 40 cópias do LINE-1 aptas para realizar a retrotransposição (SASSAMAN, 1997; SELEME et al., 2006).

Fragments de LINE-1 degenerados estão presentes nas regiões estruturais silenciosas, regulatórias e em regiões transcritas de muitos genes, compondo principalmente íntrons. Esse elemento é encontrado fazendo parte da estrutura genômica do complexo de histocompatibilidade principal (CPH) (emb I X87344 I), cadeia  $\beta$  dos receptores de linfócitos (gb I L36092), fator de coagulação (gb I M22333 I e gb I M64554 I), receptor para interleucinas (emb I X67285 I), fatores do complemento e genes para  $\beta$ globina (gb I UO1317 I), entre outros (KAZAZIAN et al., 1988; MIKI, 1998; KAZAZIAN; MORAN, 1998).

Ostertag e Kazazian (2005) mostraram maior ocorrência de integrações de LINE-1 nas proximidades dos genes expressos. O fenômeno foi evidenciado pelas mudanças nos padrões de expressão gênica nas culturas de células neuronais. Babushok et al. (2006), através de estudos com murinos transgênicos, também demonstraram a tendência de direcionamento das novas inserções de LINE-1 para as regiões intergênicas. Bernardi (1995) e Graham e Boissinot (2006), por sua vez, observaram que os LINES antigos estariam localizados preferencialmente nas regiões ricas em AT e com baixa concentração gênica. Graham e Boissinot (2006) postularam que essa maior ocorrência decorreria da seleção negativa dos eventos e não propriamente da preferência por estas regiões.

Os LINE-1 são mais abundantes nos cromossomos sexuais do que nos autossômicos (GRAHAM; BOISSINOT, 2006). Em humanos verificou-se que 89% dos 100 Kb do cromossomo X são constituídos por LINE-1. Esses elementos estão ausentes no cluster que compreende os genes homeobox do cromossomo (GRAHAM; BOISSINOT, 2006).

Existem diferenças evolucionárias dos LINES-1 entre as espécies mamíferas. A divergência entre o elemento LINE-1 murino e o LINE-1 humano, por exemplo, é em torno de 60% (MIKI, 1998). O elemento LINE-1 murino, também denominado de IAP, caracteriza-se pela presença de repetições com aproximadamente 200 pb na região 5' fosfato que antecede a ORF 1. Essas repetições, ausentes em LINE-1 de primatas, apresentam atividade promotora e ativadora da transcrição (GOODIER et al., 2001). Embora a maioria dos LINE-1 tenha se inserido no genoma depois da divisão entre primatas e roedores, o padrão de distribuição desse elemento transponível nos dois genomas são muito semelhantes, sugerindo

## INTRODUÇÃO

---

um mecanismo de reconhecimento de sítios de integração preferencial comum (GRAHAM; BOISSINOT, 2006).

Entre primatas a similaridade dos LINEs-1 é elevada em relação aos demais mamíferos. Verifica-se, por exemplo, grande semelhança nos elementos isolados de humanos e de chimpanzés. Contudo, os LINE-1 no genoma humano são mais ativos (LEE et al., 2007).

A atividade do LINE no genoma não é uniforme entre os indivíduos da mesma espécie, o que ocasiona variações quantitativas do elemento e conseqüentes variações na estrutura do genoma (HWU et al., 1986; SMITH, 1996; SELEME et al., 2006; HAN e col., 2007; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Acredita-se que esse fator venha contribuindo para aumentar a variabilidade genética na espécie humana (SELEME et al., 2006; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007).

A clonagem e expressão de LINE-1 ativos vem permitindo ampliar as informações sobre o mecanismo de retrotransposição do elemento (MORAN et al., 1996; SASSAMAN et al., 1997; KOLOSHA; MARTIN, 1997; HOHJOH; SINGER, 1997; MIKI, 1998; BUZDIN e col., 2003; MARTIN, 2005; BABUSHOK et al., 2006; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007).

Nos elementos LINE-1 completos, a extremidade 5' fosfato apresenta uma região de aproximadamente 1kb contendo vários códigos sinalizadores para final de tradução ("*stop codons*") em todas as fases de leituras ("*frames*"). Woodcock et al. (1996) mostraram que esta região codifica dois RNAs pequenos, um de 305 e outro de 275 b, cuja função ainda é desconhecida. No LINE-1 humano a região 5' não traduzida do gene apresenta um promotor interno localizado nas primeiras 100-150 bases e uma seqüência adicional de 670 bases responsável pela ativação do elemento, com afinidade pela RNA polimerase III (KUROSE et al., 1995; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Segue-se a essa região duas fases abertas de leitura (ORF- *open reading frame*), a primeira com 1kb (ORF 1) e a outra de 4kb (ORF 2) intercaladas por uma pequena seqüência que não codifica proteína. Após as ORFs observa-se que a extremidade 3' OH que não é traduzida apresenta sinalização característica para adição de cauda poli A pela RNA polimerase II, seguida pela seqüência terminal rica em "A". Nos flancos dos elementos LINE-1 típicos aparecem repetições diretas contendo de 2 a 20 pb decorrentes da duplicação do sítio de entrada (FANNING; SINGER, 1987; LANKINEN et al., 1996.; MCGLYNN e col., 2002; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). A ORF-1 carrega informações para a síntese de uma proteína tipo gag de aproximadamente 40 KDa (p40 ORF1), é rica em resíduos básicos e contém domínio leucina zíper. A

## INTRODUÇÃO

---

proteína possui a capacidade de se ligar em seqüências não específicas de RNAs. Em humanos e camundongos apresenta propriedade chaperônica para ácidos nucleicos e forma partículas de ribonucleoproteínas em linhagens de células teratocarcinomas de camundongo. A proteína é essencial para a retrotransposição, acelerando o anelamento e formação do duplex no ponto de inserção (MARTIN, 2006; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). A ORF-2, localizada a aproximadamente 63 bases do final da ORF-1, codifica uma proteína de aproximadamente 150 KDa que apresenta capacidade endonucleásica, atividade transcriptase reversa e domínio terminal rico em Cisteína. Mutações nesse domínio reduzem sensivelmente a capacidade de retrotransposição sem, contudo, afetar a capacidade de retrotranscrição. O produto da ORF 2 tem localização predominantemente citoplasmática e a perda da região carboxiterminal direciona a proteína para o nucléolo (GOODIER et al., 2004; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007).

O mecanismo de transposição dos LINE-1 está em parte esclarecido. Para a mobilidade do elemento é necessário que as proteínas codificadas pelas duas ORFs estejam presentes e ativas (KOLOSHA; MARTIN, 1997; HOHJOH; SINGER, 1997; revisto por BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Ainda não está claro se o elemento é transcrito pela RNA polimerase II ou III, existindo evidências de que a transcrição poderia se dar por ambos os processos (KUROSE et al., 1995; revisto por BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). A geração da nova cópia de LINE-1 no genoma requer a ruptura e o reparo da fita de DNA alvo. A semelhança das retrotransposições de elementos LTR R2Bm, acredita-se que a ruptura no sítio alvo geraria uma extremidade 3' OH livre que atuaria como iniciador para a síntese da fita de DNA complementar ao RNA pela transcriptase reversa codificada pela ORF 2 do LINE-1 (LUAN et al., 1993; COST et al., 2001). A seqüência alvo preferencial de entrada dos LINE-1 no genoma compreende os nucleotídeos 5'- TTTT/AA - 3' e suas variações (GILBERT et al., 2002; SYMER et al., 2002; COST et al., 2002; GILBERT et al., 2005; GRAHAM; BOISSINOT, 2006; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). A perda da capacidade endonucleásica da ORF2 gera produtos de integração atípicos em células deficientes no mecanismo de reparo do DNA, sugerindo que os LINE-1 poderiam também utilizar os cortes preexistentes nas fitas para promover a sua retrotransposição (BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Farkash e colaboradores. (2006a e b), com base nas observações "in sílico" dos elementos LINE-1 truncados de Zingler et al. (2005), postularam um segundo mecanismo de integração com a participação de endonucleases do mecanismo reparo do DNA.

## INTRODUÇÃO

---

Recentemente verificou-se a existência de retrogenes quiméricos compostos por cópias de transcritos celulares fusionados com a porção 3' de elementos de transposição. As quimeras retrovirais foram encontradas em genomas mamíferos e de fungos (BUZDIN et al., 2007).

O mecanismo de formação das quimeras associa genes expressos que aparentemente não apresentam similaridade de seqüência com os retroelementos (BUZDIN et al., 2007). Todos os eventos analisados apresentaram a seqüência gênica do hospedeiro e do elemento transponível na mesma orientação e poliadenilação na extremidade 3'OH. Aparentemente, não existiria um ponto preferencial de junção entre os dois segmentos. Nos flancos da integração observam-se as repetições diretas características da duplicação do sítio de entrada do elemento no genoma (BUZDIN et al., 2007).

Em mamíferos, o elemento transponível predominante nas quimeras é o LINE-1. A análise dos flancos dos elementos integrados mostrou as repetições características do hexanucleotídeo T<sub>2</sub>A<sub>4</sub> e suas variantes, correspondentes ao sítio de entrada do elemento (BUZDIN et al., 2003; BUZDIN et al., 2007). As combinações de seqüências decorrentes das fusões vêm contribuindo para a formação de novos genes nas espécies estudadas (BUZDIN et al., 2003; BUZDIN et al., 2007).

Inserções recentes de LINE-1 foram associadas a doenças, tanto em murinos como em humanos. A integração da família IAP (LINE-1 murino) foi identificada nas regiões codificadoras dos genes c-Fos, em plasmocitomas de camundongos, no flanco 5' fosfato do gene c-myc, no gene Fu murino e no gene "reeler" (TAKAHARA et al., 1996; MIKI, 1998). Em humanos, foi descrita pela primeira vez por Kazazian et al. (1988) interrompendo o exon 14 do fator de coagulação VIII. Posteriormente, várias outras mutações foram associadas à integração "de novo" deste elemento (MIKI, 1998). CHEN et al. (2005), em trabalho de revisão, elencaram mais de 40 inserções de elementos LINE-1 no genoma associadas a doenças. Após os eventos de integração é freqüente a ocorrência de rearranjos complexos com duplicações e deleções variadas (CHEN et al., 2005). MUSOVA et al. (2006) mostraram a ocorrência de inserção de um elemento LINE-1 no exon 44 seguida de rearranjo genético que ocasionou a síndrome de distrofia muscular de Duchenne no paciente estudado.

Belgnaoui et al. (2006) sugerem a ativação do LINE-1 nas células tumorais para controle da proliferação tumoral. Os autores observaram que a ativação de LINE-1 nesse tipo de célula gera múltiplas quebras na dupla fita do DNA desencadeando o processo apoptótico.

**b) Elementos repetitivos móveis curtos**

Os elementos repetitivos móveis curtos não virais pertencem ao grupo dos non-LTRs. Caracterizam-se pela ausência de LTRs, duplicações de 7 a 21 pb nas extremidades do elemento integrado; presença de poliadenilação na extremidade 3' OH; ausência ou poucos íntrons e transcrição via RNA polimerase II ou III (BLINOV 1998; LEWIN, 2004). Considerados inicialmente como elementos estruturais sem função, sabe-se hoje que muitos participam de sítios regulatórios, a exemplo das ilhas de CpG e sítios recombinativos (CHRISTMANN et al., 1991; CRAI; BICKMORE, 1994; RUBIN et al., 1994; BERNARDI, 1995; MIGHELL et al., 1997; GRAFF et al., 1997; BLINOV et al., 1998).

As seqüências repetitivas do tipo SINE (short interspersed elements) pertencem a esta categoria de elementos móveis curtos de origem não viral. Movimentam-se por retrotransposição com o auxílio de outros elementos móveis ativos, já que não codificam as enzimas necessárias para a sua mobilização e são transcritos através de um promotor interno para RNA polimerase III. (MATHIAS et al., 1991; WALLACE et al., 1991; BELFORT; PERLMANS, 1995; FAWCETT et al., 2006; GU et al., 2007). Em geral possuem tamanho entre 100 a 500 pb (YASUI et al., 2001; FAWCETT et al., 2006; GU et al., 2007). Em termos evolutivos, os SINES contribuíram significativamente para a história evolucionária da maioria das espécies eucarióticas (FAWCETT et al., 2006). Em vertebrados compõe duas superfamílias CORE-SINE e V SINE (KAZAZIAN, 2004; GILBERT; LABUDA, 1999; OGIWARA, 2002; FAWCETT et al., 2006). Em plantas sua distribuição é mais limitada, sendo encontradas famílias de SINES do tipo AU (YASUI et al., 2001; FAWCETT et al., 2006).

Dentre os SINES, as seqüências *Alu* são os mais presentes no genoma primata. Com tamanho de aproximadamente 300 pb, esses elementos representam 5% - 10% do genoma, o que corresponde a pelo menos 1 cópia a cada 6kb - 3kb. Sua distribuição não é randômica e normalmente são encontrados no genoma próximos uns aos outros, como observado no gene *Bat2* do locus HLA classe II que possui 42 repetições do elemento *Alu* (HWU et al., 1986; MOYZIZ et al., 1989; PITTMAN; SCHIMENTI, 1998; BLINOV et al., 1998; MIGHELL et al., 1997, DEININGER; BATZER, 1999). A estrutura dimérica é exclusiva de primatas e estima-se que tenha surgido a 65 milhões de anos (BLINOV et al., 1998), mas a forma monomérica também está presente nestes organismos (ZUCMAN-ROSSI et al., 1997).

## INTRODUÇÃO

---

O elemento *Alu*, em murinos, é um monômero com aproximadamente 150 pb e é conhecido como elemento B (B1 e B2). Acredita-se que os monômeros tenham um ancestral comum homólogo a partícula 7SL de RNA nuclear.

A família *Alu* é composta por várias subfamílias que apresentam identidade da ordem de 70 a 75% (DEININGER et al., 1992; DEININGER; BATZER, 1999). Descrevem-se inserções antigas e recentes desse elemento, existindo subfamílias espécie específicas, a exemplo de alguns tipos de *Alu* característicos de alguns grupos de primatas (DEININGER et al., 1992; FAWCETT et al., 2006).

O *Alu* dimérico possui aproximadamente 280 pb, é composto por dois monômeros ligados por uma região rica em A, sendo o da extremidade 3' (braço direito) aproximadamente trinta bases maiores do que o da região 5' (braço esquerdo). Apesar das diferenças estruturais entre a família B e *Alu*, ambos possuem dois sítios promotores (A e B) para RNA polimerase III (BLINOV, 1998). No *Alu* primata, a ligação da polimerase ocorre no braço esquerdo (MIGHELL et al., 1997). Em elementos de origem recente é possível observar pequenas regiões repetidas diretas nos flancos (WALLACE et al., 1991). A recombinação homóloga desigual entre elementos *Alu* é freqüente e não randômica, ocorrendo preferencialmente entre as regiões A e B nos *Alus* diméricos (KASS et al., 1995).

Como esses elementos não possuem as enzimas necessárias para promoverem sua própria retrotransposição, contam com o auxílio de outros elementos ativos tais como LINE-1 (MATHIAS et al., 1991; LANDER et al., 2001; DEWANNIEUX et al., 2003; HULME et al., 2007; BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007). Desse mecanismo sabe-se que a proteína codificada pela ORF 2 dos elementos LINE-1 é requerida no processo e a transposição pode ser bloqueada pela proteína APOBEC3G, uma citidina deaminase que inibe a infecção pelo vírus HIV, de forma independente da expressão da proteína da ORF 1 do elemento LINE -1 (HULME et al., 2007).

Cópias simples de *Alu* ou regiões ricas em *Alu* são normalmente encontradas em locais com altos teores de C/G, em regiões próximas a ilhas CpG e flanqueando genes, íntrons e espaços intergênicos, mas não dentro de regiões transcritas (GRAFF et al., 1997; BLINOV et al., 1998). Existem controvérsias quanto aos motivos dessa distribuição (GROVER et al., 2003; GROVER et al., 2004; JURKA, 2004; HACKENBERG et al., 2005; CORDAUX et al., 2006). Contudo, estudos com populações antigas e recentes de *Alu* sugerem que a entrada do elemento no genoma seria randômica havendo uma seleção positiva para aqueles inseridos em regiões não transcritas ricas em C/G (BELLE; EYRE-WALKER,

## INTRODUÇÃO

---

2002; CORDAUX et al., 2006; GU et al., 2007). Verificou-se que inserções novas do elemento *Alu* podem eventualmente gerar interrupção de genes ou rearranjos complexos no local da inserção ocasionando doenças genéticas (DEININGER; BATZER, 1999; CHEN et al., 2005; OKUBO et al., 2007).

Vários trabalhos indicam que os elementos *Alu* possam atuar na regulação da expressão gênica. Rubin et al. (1994) sugerem a funcionalidade das seqüências *Alu* em virtude da variação no seu padrão de metilação em diferentes tecidos. Graff e colaboradores (1997), propõem a participação das seqüências *Alu* no processo de metilação “de novo” das regiões CpG próximas. LANDER e colaboradores (2001) mostram que os elementos *Alu* podem introduzir a formação de novas ilhas CpG. Blinov e colaboradores (1998), com base na potencialidade dos *Alus* formarem estruturas triplex, sugerem que as seqüências *Alu* comporiam um código espacial formado pelas combinações das diferentes repetições completas e truncadas, diretas e invertidas.

### ***c) Estrutura repetitiva e cinetoplastos***

O cinetoplasto é a organela que contém o DNA mitocondrial dos protozoários da família *kinetoplastidae*. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa 10 a 15% do DNA total dos *kinetoplastidea* (Rion e Dealin, 1969) e está peculiarmente arranjado, formando uma estrutura complexa composta de pequenos segmentos de DNA circular catenados (minicírculos) e de segmentos circulares maiores (maxicírculos) (revisto em SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Os maxicírculos estão presentes na organela em número de 25 a 100, conforme o tripanossomatídeo. Em termos de seqüência de bases do DNA, observa-se que as moléculas de maxicírculo apresentam um alto grau de homogeneidade entre si e carregam informações para a biogênese mitocondrial. Os genes presentes nessas moléculas, diferentemente de outros eucariotos, codificam RNAs mensageiros que apresentam discrepâncias nas fases de leitura, quando comparados às seqüências das suas correspondentes proteínas, sugerindo participação de mecanismos de processamento pós-transcricionais característicos para se tornarem ativos (BENNE et al., 1986; FEAGIN et al., 1988).

Os minicírculos variam em quantidade e tamanho entre os cinetoplastídeos. Por exemplo, em *Trypanosoma brucei*, essas moléculas variam entre 0,5 a 2,9 kilo bases (Kb) e estão presentes em mais de 10.000 cópias por organela. No *T. cruzi*, a grande maioria dos minicírculos está na faixa de tamanho entre 1,4 - 1,5 Kb, e é composta por quatro regiões variáveis semelhantes entre si, intercaladas, a cada 90° na

## INTRODUÇÃO

---

molécula circular, por regiões conservadas com aproximadamente 120 pares de bases (pb) (revisão em SIMPSON, 1997). A heterogeneidade dos minicírculos de tripanosomatídeos é observada tanto entre espécies quanto dentro da espécie. Em *T. brucei*, por exemplo, estima-se que existam 300 classes de minicírculos diferentes, um número bastante elevado quando comparado ao da espécie *Trypanosoma equiperdum* cujos minicírculos apresentam alta homogeneidade na sequência de bases do DNA. Os minicírculos de *T. cruzi* apresentam grau intermediário de variabilidade em relação às categorias estudadas (RIOU; YOT, 1977).

As linhagens de *T. cruzi* podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com as características bioquímicas, isoenzimas e marcadores moleculares do DNA ribossomal, regiões espaçadoras dos mini-exons e genes de maxicírculo. Apesar da distinção filogenética entre os grupos, a organização geral dos minicírculos de kDNAs permanece conservada (JUNQUEIRA et al., 2005).

Os minicírculos de kDNA são utilizados como marcadores moleculares para identificar a presença do parasita em testes diagnósticos e na caracterização das populações (MOREL et. al., 1980; STURM, 1989; revisto em SIMPSON, 1997; BARRIO et al., 2007).

Blum et al. (1990) descreveram em *T. brucei* a categoria de RNAs de cinetoplasto denominada de “guias” (gRNAs). Esses gRNAs participam do processamento pós-transcricional dos RNAs mitocondriais imaturos, através de um mecanismo peculiar de edição.

A princípio, acreditava-se que os gRNAs eram codificados pelos maxicírculos, porém Sturm e Simpson (1990) mostraram que provinham da transcrição dos minicírculos. Os gRNAs são normalmente pequenos, em torno de 50 a 70 bases, e possuem uma cauda de uridina (poli-U) no extremo 3'-OH da molécula.

O processo de edição promove modificações nas seqüências de bases dos RNAs mensageiros imaturos (pré-mRNAs) através da inserção ou, em alguns casos, pela remoção de resíduos uridinilados da molécula. O mecanismo proposto para o processo prevê a existência de uma molécula de gRNA com seqüência complementar em sua extremidade 5'-fosfato ao pré-mRNA. Inicialmente, haveria o pareamento de 4 a 15 bases da região complementar, que teria a finalidade de manter as fitas unidas. As bases não pareadas da extremidade 3'-OH do gRNA teriam a função de direcionar a edição (BLUM et al., 1990; HAJDUK et al., 1993; revisto em SEIWERT, 1996; LUKES et al., 2005). Vários estudos sugerem que a estrutura secundária do pré-mRNA a ser editado já seria suficiente para expor o sítio onde ocorreria

## INTRODUÇÃO

---

a clivagem para a inserção dos resíduos uridinilados (PILLER et al., 1995a; 1995b; 1996; LUKES et al., 2005). Porém, existem transcritos cuja exposição do sítio é mediada pelo gRNA (KABLE et al., 1996; SEIWERT et al., 1996; HAJDUK, 1997; LUKES et al., 2005). Após a clivagem do pré-mRNA, as enzimas uridilil transferase e/ou terminal uridilil exonuclease fariam, respectivamente, a adição ou remoção das uridinas de acordo as informações contidas no gRNA. Findo o processo, as fitas do RNA mensageiro maduro seriam religadas pela RNA ligase mitocondrial (CRUZ-REYES; SOLLNER-WEBB, 1996; KABLE et al., 1996; SEIWERT et al., 1996; ADLER; HAJDUK, 1997; LUKES et al., 2005).

Através da edição, o mRNA pode receber códigos de iniciação, de terminação, ocorrer mudanças das fases de leitura ou aumento do mRNA, o que supostamente permitiria uma maior variabilidade de transcritos (ALDER; HAJDUK, 1994 e 1997; SEIWERT, 1996; LUKES et al., 2005). Esse processo está presente em vários tripanosomatídeos: *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Leishmania* e cinetoplastídeos correlacionados, tais como o *Tripanoplasma* (revisto por SCOTT, 1995) e no *T. cruzi* (ÁVILA; SIMPSON, 1997; LUKES et al., 2005).

Thertulien et al. (1991 e 1994) identificaram transcritos obtidos a partir de um banco de DNA complementar (cDNA) de *T. cruzi* que correspondiam a seqüências de minicírculos, mas sem as características típicas de um gRNA, sugerindo que os minicírculos seriam potencialmente capazes de codificar pequenos peptídeos.

A quantidade de DNA presente no cinetoplasto varia em função do estágio de desenvolvimento do parasita. Essa peculiaridade é conhecida por descinetoplastidização e se caracteriza pela perda parcial ou total do kDNA. O fenômeno foi detectado, em condições naturais, nas formas sanguíneas das espécies *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. brucei* e nas formas sanguíneas de *T. cruzi*, mas pode ocorrer em consequência de tratamento com drogas, tais como brometo de etídio, acriflavina, diamidinas e compostos relacionados. Neste caso, as drogas atuariam ao nível da enzima topoisomerase II, essencial para o processo de replicação do kDNA (VICKERMAN; PRESTON, 1976; LUKES et al., 2005).

Em adição, LEE et al. (1992a, 1992b, 1993) relataram o fenômeno conhecido como transcinetoplastidização, onde classes de minicírculos e seqüências de maxicírculo antes pouco representadas passam a ser majoritárias, enquanto que as inicialmente bem representadas passam a ser minoritárias. O fenômeno relatado para variantes de *Leishmania mexicana*, resistentes a arseniato e tunicamicina se completa em 15 gerações do parasita onde se observa populações intermediárias no

decorrer do processo (LEE et al., 1994). Embora não se conheçam os mecanismos de regulação que promovam a expansão ou perda de determinados kDNAs, acredita-se que este material genético seja de extrema importância na adaptação do parasita às diferentes condições do meio ambiente (LUKES et al., 2005).

## **2.4 - Instabilidades de Seqüências**

### ***a) Instabilidade de repetições do tipo satélites***

Todos os organismos eucariotos possuem pequenas seqüências repetidas múltiplas vezes (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994). São chamadas de microsatélites as regiões que possuem de 10 a 60 unidades de repetições seguidas de minisatélites e satélites, quando apresentam um número de repetições entre 60 a 180 e acima deste valor, respectivamente. Estudos mostram que essas seqüências não móveis são mais instáveis quando comparadas ao restante do genoma (LEVINSON; GUTMAN, 1987; HENDERSON; PETES, 1992; WEBER; WONG, 1993; WOJCIECHOWSKA et al., 2005), sendo a alteração mais comum a amplificação ou redução no número das repetições. O fenômeno foi observado em produtos clonados em *E. coli* (LEVINSON; GUTMAN, 1987; STRAUSS et al., 1997), em leveduras (STRAND et al., 1993 e 1995) e em mamíferos (MODRICH; LAHUE, 1996; MARCADIER; PEARSON, 2003; PEARSON; EDAMURA, 2005).

Foram identificadas pelo menos 40 doenças causadas pela variação no tamanho de satélites (PEARSON et al., 2005; MESERVY, et al., 2003). Um exemplo é o aumento das repetições “CGG” no sítio X-Frágil. Nessa doença observa-se uma herança estritamente materna, onde o alelo materno se expande nas células somáticas do zigoto. Quando a pré-mutação é de origem paterna, a expansão não ocorre (MCMURRAY, 1995). Acreditava-se que defeitos na meiose fossem as principais causas da expansão, contudo verificou-se que o fenômeno ocorre na fase pós-zigótica da divisão celular, mais precisamente durante a replicação ou reparo do material genético (MARCADIER; PEARSON, 2003; PEARSON; EDAMURA, 2005).

Conforme o tipo de seqüências repetitivas existe a formação de estruturas secundárias do tipo grampo ou alça. Baseado nessas informações, McMurray (1995) propôs mecanismos que poderiam explicar a expansão e/ou redução desses segmentos. A dissociação transitória das fitas moldes e cópia no momento da replicação poderiam ocasionar a formação dessas estruturas secundárias pela reassociação incorreta das repetições. Essas estruturas são normalmente reconhecidas e removidas pelos mecanismos

## INTRODUÇÃO

---

de reparo do DNA. Caso a alça se dê na fita mãe, o reparo ocasionaria a perda de parte do segmento repetitivo, enquanto que na fita filha, a continuidade da replicação geraria a expansão das repetições na fita nascente (KOKOSKA et al., 1998; MARCADIER; PEARSON, 2003). Apesar de outras teorias serem plausíveis, em comum a maioria teria uma etapa onde se formam quebras na dupla fita do DNA por endonucleases do reparo (MARCADIER; PEARSON, 2003; PEARSON; EDAMURA, 2005).

Várias mutações que afetam o reparo de estruturas secundárias têm como consequência a elevação da frequência de mutações em satélites. Em leveduras, a proteína Msh2 juntamente com a Msh3 ou Msh6 e MutL, homóloga a Mlh1 e Pms1, corrige a formação de alças com até 14 nucleotídeos. Alças maiores são corrigidas por um mecanismo de reparo não usual, que envolve os genes *Msh2* e *Rad1* (KIRKPATRICK; PETES, 1997). Aparentemente outras proteínas além das que participam do reparo estão envolvidas na estabilidade dessas regiões. Mutações no gene *rad27* (*FEN1* de mamíferos), responsável pela atividade 5'-3' exonucleásica, atuam na remoção da região ribonucleotídica dos fragmentos de Okasaki e na DNA polimerase  $\delta$  (*pol3-t*) promovem aumento na instabilidade de satélites (KOKOSKA et al., 1998). Em humanos haveria a participação do complexo Mre11-Rad50-NBS1 no reparo dessas alças (PAULL; GELLERT, 1999). Haveria também a participação de outras enzimas específicas (CONSTANTINO et al., 2001) e de helicases (KAMATH-LOEB et al., 2001). Sequências repetitivas simples quando clonadas tendem a sofrer deleções ou inversão das repetições (MARCADIER; PEARSON, 2003). Próximo aos sítios de quebra e junção da região que sofreu a deleção ou inversão observa-se, normalmente, estruturas do DNA do tipo não B (WOJCIECHOWSKA et al., 2005).

### ***b) Instabilidade de insertos clonados***

Observa-se que alguns segmentos de DNAs quando clonados propiciam o rearranjo do vetor. As análises desses fragmentos mostraram que a instabilidade estaria correlacionada à presença de sequências repetidas diretas, invertidas e invertidas complementares, repetições do tipo micro e mini satélites, todas potencialmente capazes de promover estruturas não B no DNA (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; TRINH; SINDEN, 1993; STRADER; HOWELL, 1997; Song et al., 2001; KOUPRINA et al., 2003; BACOLLA et al., 2004; LAN; MUGUIRA, 2005; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; GRINDLEY et al., 2006; WANG et al., 2006; WOJCIECHOWSKA et al., 2006; DU et al., 2007; WELLS, 2007).

Os rearranjos podem ser complexos e resultar em perdas, duplicações, inversões, translocações de DNAs, com ou sem a presença de regiões de identidade nos sítios recombinativos (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; LEEM et al., 2004). Em alguns casos observa-se o comprometimento de seqüências do vetor inviabilizando a sua multiplicação (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997, LEEM et al., 2004).

Leem e colaboradores (2004), num trabalho que envolveu sobreposições de seqüências clonadas em vetores bacterianos e de leveduras, verificaram que as regiões de instabilidade de quatro genes eram constituídas principalmente por grandes blocos de micro e mini-satélites e alta densidade de repetições do tipo *Alu*. Outras seqüências também identificadas como altamente instáveis em vetores bacterianos foram as repetições invertidas longas, seqüências ricas em AT e seqüências com estruturas do tipo Z-DNA (HAGAN; WARREN, 1982; SCHROTH; HO, 1995; KANG; COX, 1996; RAZIN et al., 2001). Em leveduras, tanto o tamanho das regiões repetitivas como a distância entre as mesmas estimulam a recombinação (LOBACHEV et al., 1998). Já a presença de origens de replicação forte entre as repetições diminuem a recombinação, sugerindo que essa seqüência sinal poderia romper a estrutura secundária que seria importante para o favorecimento dos rearranjos (LOBACHEV et al., 1998).

Insertos ricos em CG clonados em plasmídios do tipo YACs podem ser instáveis em leveduras, indicando a participação de estruturas peculiares no mecanismo recombinativo (revisto em BERNARDI, 1995).

Plasmídios que se mantém em grande número de cópias na célula hospedeira, independente de presença de insertos, podem sofrer recombinação, mesmo em hospedeiras deficientes para esse tipo de mecanismo. Os produtos intermediários da recombinação formam estruturas do tipo cauda-cabeça, onde dois ou mais plasmídios ficam ligados entre si, podendo posteriormente ser resolvidos à forma monomérica. Observa-se que 95% dos plasmídios mantidos em *E. coli* estão na forma monomérica, e 5% na forma de dímeros, trímeros ou tetrâmeros (BOE; TOLKER-NIELSEN, 1997).

Esses segmentos, eventualmente, são estabilizados quando a linhagem hospedeira é deficiente para enzimas do mecanismo de reparo e salvaguardas do DNA (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; KOUPRINA et al., 2003; LEEM et

al., 2004; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004; LAN E MUGUIRA, 2005).

Trinh e Sinden (1993) assinalaram a influência das estruturas primárias e secundárias de insertos com diferentes tipos repetições diretas na estabilidade de plasmídios. Esses autores concluíram que as repetições são capazes de formar estruturas que podem ser removidas ou amplificadas, mesmo em bactérias hospedeiras deficientes em RecA (principal enzima responsável pela recombinação). Outra observação é a de que o número, o tamanho, a distância entre as repetições e a presença de palíndromos influenciam na frequência dos rearranjos que resultam em perdas. Duplicações e inversões ocorreriam a uma taxa elevada, quando não houvesse uma repetição direta ou invertida no seguimento contido entre duas repetições diretas.

Vetores contendo palíndromos superiores a 30 pb instáveis em plasmídios foram mantidos com sucesso em fago  $\lambda$ , utilizando hospedeiras deficientes para o gene *recBC* (exonuclease V) e *sbcB* (exonuclease I) (LEACH; STAHL, 1983).

Repetições superiores a 300 pb mantiveram-se estáveis quando clonadas em fago  $\lambda$  na hospedeira *E. coli recA<sup>+</sup>* deficientes para *recB*, *recC*, e *sbcB* ou *recD* (WYMAN et al., 1985 e 1986). Verificou-se também que a utilização de vetores com sítios *chi*, e/ou gene *gam* funcional podem, eventualmente, estabilizar seqüências com problemas de clonagem (WYMAN et al., 1986).

Apesar do grande número de vetores e linhagens hospedeiras geradas para acomodar segmentos instáveis, a não clonabilidade ainda representa obstáculo para o conhecimento pleno dos genomas tidos como completos (KOUPRINA et al., 2003; LEEM et al., 2004; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004; LAN E MUGUIRA, 2005). Estima-se que 1% das seqüências eucarióticas é de difícil clonagem e as regiões reconhecidas como instáveis permanecem nos rascunhos dos bancos genômicos até sua plena elucidação (LEEM et al., 2004).

### ***c) Instabilidade e estruturas não B***

O material genético, segundo o modelo predito por Watson e Crick (1953), é constituído por duas fitas de DNA pareadas de formas invertidas e complementares unidas por ligações de hidrogênio, que formam uma estrutura dupla hélice com giro passo direito, denominada B. Essa é a conformação predominante do material genético, contudo, de acordo com distribuição de bases púricas e pirimídicas ao

## INTRODUÇÃO

---

longo das fitas, a dupla hélice pode assumir estruturas diferentes das previstas por Watson e Crick e apresentar dobramentos (bend) e curvaturas (LINIAL; SHLOMAI, 1987; KIYAMA; KIYAMA, 1996; GABRIELIAN et al., 1996; GABRIELIAN; PONGOR, 1996; VLAHOVICEK; PONGOR, 1996; KIYAMA et al., 1999, VLAHOVICEK et al., 2003), modificar o giro da hélice para passo esquerdo formando a estrutura tipo Z (WANG et al., 2006; WANG, e VASQUEZ, 2006), parear em hélices triplas, denominadas estruturas triplex ou DNA tipo H (WANG, e VASQUEZ, 2004, 2006 e 2007) ou quádruplas (tetraplex) (KAUSHIK et al., 2007), ou não parear com a fita complementar e sim com segmentos na própria fita formando alças, grampos ou estruturas cruciformes (LEWIN, 2004). Essas estruturas alternativas foram demonstradas “in vitro” e em muitos casos se correlacionam a fenômenos biológicos “in vivo”, associados ou não a quadros clínicos (KIYAMA; KIYAMA, 1996; SAMADASHWILY et al., 1997; WANG, e VASQUEZ, 2004; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; WANG et al., 2006; WELLS, 2007; KAUSHIK et al., 2007).

Nas últimas duas décadas muitos esforços procuraram elucidar os mecanismos que promovem a recombinação através da identificação de enzimas envolvidas e assinaturas genéticas dos pontos de rearranjo (PITTMAN; SCHIMENTI, 1998; GRINDLEY et al., 2006; DU et al., 2007). E apesar da complexidade dos mecanismos de recombinação, foi possível identificar a existência de um padrão: em todos os casos relatados de segmentos instáveis verificou-se que a região era propensa a formar estruturas do tipo não B (MARCADIER; PEARSON et al., 2003; DERE et al., 2004; BACOLLA et al., 2004; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; WOJCIECHOWSKA et al., 2006; WANG et al., 2006;), sugerindo que a conformação do DNA seria um aspecto preponderante no processo (BACOLLA et al., 2004).

O efeito recombinogênico foi descrito para repetições tipo satélite (SAMADASHWILY et al., 1997; MARCADIER; PEARSON et al., 2003; DERE et al., 2004; WOJCIECHOWSKA et al., 2005, WANG, e VASQUEZ, 2004, 2006 e 2007) regiões com expectativa de estrutura Z e regiões R.Y do gene PKD1 (WANG et al., 2006; WANG; VASQUEZ, 2004; WANG; VASQUEZ, 2007), regiões do tipo curvatura e dobramento (LINIAL; SHLOMAI, 1987; KIYAMA; KIYAMA, 1996; KIYAMA et al., 1999; BACOLLA et al., 2004), estrutura H, hélices triplas ou quádruplas (tetraplex) (KAUSHIK et al., 2007; WANG; VASQUEZ, 2004), repetições diretas, invertidas e invertidas complementares (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; TRINH; SINDEN, 1993; STRADER; HOWELL, 1997; Song et al., 2001; KOUPRINA et al., 2003; LAN E MUGUIRA, 2005; GRINDLEY et al., 2006; WOJCIECHOWSKA et al., 2006; DU et al., 2007; WELLS, 2007).

## INTRODUÇÃO

---

Existe uma correlação entre os pontos de recombinação e bandamento cromossômico. Bandas R e regiões de interseção R/G são sítios preferenciais nos processos de trocas (incluindo translocações espontâneas, trocas de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, quiasmas mitóticos) e sítios frágeis. A análise da composição de bases dos quiasmas mostra alta concentração de CG (EYRE-WALKER, 1993). Dentre elas seqüência do tipo *Alu*, CpG, minissatélites e teloméricas (CHRISTMANN et al., 1991; CRAIG; BICKMORE, 1994; FERRARO et al., 1993; KORENBERG; RIKOWISKI, 1988; ROYLE et al., 1988; KATINKA; BOURGAIN, 1992).

Acreditava-se inicialmente que a integração de DNAs exógenos não virais ocorresse aleatoriamente pelo genoma, porém são muitas as evidências de sítios e cromossomos preferenciais (RIJKERS et al., 1994). Milot et al. (1994) observaram que 9 dentre 10 seqüências provenientes de sítios de integração de retroelementos virais estavam correlacionados à presença de estruturas do tipo bend, conforme mostrado pela mobilidade anormal destes DNAs em gel de agarose e acrilamida.

O DNA exógeno pode entrar em cópia simples ou formar regiões com múltiplas cópias, sendo normal a orientação cauda-cabeça. MacFarlane et al. (1996) correlacionaram os consensos encontrados nos sítios de recombinação com os da seqüência *Chi* de bactéria e propuseram a participação da enzima topoisomerase I no mecanismo de integração. Da mesma forma, Macleod et al. (1991) sugeriram que a topoisomerase I poderia favorecer a integração de uma marca de resistência clonada. Além do mais, a semelhança de uma pequena região nas extremidades da construção direcionaria a entrada para regiões internas ou adjacentes a ilhas CpG presentes em promotores ativos. Bullock et al. (1985) também mostraram a associação entre sítios para topoisomerase I e a recombinação não homóloga de fagos.

Seqüências repetitivas do tipo micro e minissatélite apresentam modificações na mobilidade eletroforética e são potencialmente capazes de formar estruturas do tipo não B. Regiões que compreendem segmentos repetitivos do tipo CTG/CAG, CCTG/CAGG e GAA/TTC podem adotar estruturas do tipo desligamento transientes, grampo, alças, assumir estrutura do tipo triplex, tetraplex, cruciforme, zDNA e “sticky DNA” (WELLS, 2007).

Wahls et al. (1990) sugerem que microssatélites poderiam servir como sítio específico de clivagem do DNA e promover a recombinação, após analisar a influência de uma região consenso de microssatélite clonado e o efeito na freqüência da recombinação.

## INTRODUÇÃO

---

Sarkar et al. (1988) mostraram que a estabilização do microssatélite (CTG)<sub>35-50</sub> em hospedeiras mutantes para SbcB, uma proteína que modula a clivagem da fita simples do DNA ou degradação de segmentos de DNA duplex a partir de quebras na dupla fita, sugerindo a formação de estruturas secundárias não B.

Dere e colaboradores (2004) mostraram que a estrutura repetitiva microssatélite (CAGG)<sub>26</sub> adota estruturas não B do tipo grampo, enquanto que a fita complementar com a repetição (CCTG)<sub>26</sub> não possui essa propensão.

Seqüências de bases potencialmente formadoras de estruturas do tipo Z-DNA *in vitro*, são reconhecidas pela proteína rec1 (KMIEC et al., 1985; STEINMETZ, 1986). As repetições CAGG presentes na região E $\beta$  no sítio recombinativo do complexo de histocompatibilidade principal assemelham-se às estruturas Z formadas pelas repetições CGGG (STEINMETZ, 1986).

Sítios preferenciais de recombinação (*hotspot*) foram caracterizados em alguns genes. No cromossomo 17 murino, a região que compreende o complexo de histocompatibilidade principal apresenta 4 regiões com alta frequência de recombinação (STEINMETZ et al., 1982 e 1986; SHIROISHI et al., 1995). Duas dessas regiões estão bem caracterizadas. A primeira localiza-se na porção 3' do segundo íntron do gene *Eb* e compreende uma região de 1kb. O sítio recombinativo apresenta algumas estruturas que podem atuar como ativadoras da recombinação. A primeira delas é uma seqüência repetitiva que contém 10 a 18 unidades de "AGGC" denominada MT, que aparece a uma frequência de 1 para cada 100 kb (KOBORI et al., 1986; BRYDA et al., 1992). Essa unidade de repetição lembra a seqüência *Chi*, que em bactérias estimula a recombinação e integração de bacteriófagos (LEWIN, 2004; BRYDA et al., 1992; PITTMAN; SCHIMENTI, 1998). Na mesma região existiriam outras duas seqüências frequentemente associadas a sítios recombinativos: um fragmento de um retroelemento de origem viral (LTR) e um minissatélite. Acredita-se que a ligação de fatores de transcrição pode influenciar a atividade de recombinação em sítios específicos próximos (revisto por PITTMAN; SCHIMENTI, 1998). Nessa região, estão presentes também dois sítios de ligação de fatores de transcrição: a seqüência B, que é reconhecida pelos fatores H2TF1/ KBF1, e NF $\kappa$ B, e um domínio octâmero de ligação. A sensibilidade à DNase também está associada a sítios recombinativos e é um indicativo da presença de estruturas não B do tipo bend (GABRIELIAN et al., 1996). Vizinhos ao "hotspot" existiram dois pontos de hipersensibilidade a DNase I, sendo um específico do paquíteno na meiose. O segundo "hotspot" é uma região de 2 kb localizada adjacente ao gene *Lmp2*. Como na situação

## INTRODUÇÃO

---

anterior, foram encontradas várias seqüências que favorecem a recombinação no local, tais como uma repetição (CAGA)<sub>4-6</sub>, uma região semelhante a um LTR e uma seqüência medianamente repetitiva, mas não foi encontrado sítio de hipersensibilidade a DNase (revisto por PITTMAN; SCHIMENTI, 1998).

Observa-se em regiões com repetições formadoras de estruturas não B a presença de quebras na dupla fita nos pontos de formação dessas estruturas entre repetições. Acredita-se que as quebras estariam relacionadas à instabilidade da região (SARKAR et al., 1998; BACOLLA et al., 2004; WELLS; ASHIZAWA, 2006, WOJCIECHOWSKA et al., 2006). Supõe-se que a baixa estabilidade dessas conformações poderia dificultar ou impedir a replicação (SAMADASHWILY et al., 1997) e ou transcrição (BOWATER; WELLS, 2001; MIRKIN; MIRKIN, 2005).

Visando dar continuidade aos estudos da integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma hospedeiro, no presente trabalho estudou-se a instabilidade genética das regiões genômicas contendo minicírculos de kDNA clonadas em diversos vetores e hospedeiros bacterianos e a presença de alterações estruturais nos possíveis pontos de integração e regiões rearranjadas obtidas de bancos de dados.

**II. OBJETIVO****1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as regiões de integração de minicírculos de kDNA no genoma hospedeiro.

**2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Identificar sítios de integração de kDNA de *T. cruzi* em macrófagos humanos pela infecção natural *in vitro*.
- b) Seqüenciar os sítios de integração e verificar as características estruturais dos eventos.
- c) Analisar a periodicidade dos fragmentos de kDNA, e do DNA da célula hospedeira, covalentemente ligados e suas características pela modelagem molecular.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. CULTURAS DE CÉLULAS

##### 1.1 - Cultura de macrófagos humano linhagem U937, e obtenção de linhagens clonais kDNA integrada

Macrófagos humanos da linhagem clonal U937 foram cultivados em meio RPMI1640, pH 7,2 (Sigma Chemical Co), suplementados com 10% de soro fetal bovino livre de vírus e micoplasmas (Laborclin Curitiba Brasil), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 250 mM L-glutamina (Sigma Chemical Co.), numa atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Esta linhagem foi adquirida da coleção de cultura de células, Fundação Bio-Rio, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Recentemente, foi feita autenticação da linhagem U937 tendo sido confirmada sua origem de humano (SIMÕES-BARBOSA et al. 2006).

Os clones celulares A11, C4 e C6 de macrófagos transfectados com minicírculos de kDNA, foram obtidos por Argañaraz (1996) a partir da erradicação da infecção de macrófagos U937 com formas tripomastigotas do estoque Berenice de *T. cruzi*. A infecção foi feita observando-se a relação de 1:5. Dez dias após a infecção, as culturas foram tratadas com três doses de 100 µg/mL da droga tripanocida benzonidazol (Roche Ind. Farmacêutica -Suíça), em intervalos de 5 dias alternados. Após o tratamento, a erradicação da infecção foi conferida pela ausência de *T. cruzi* no meio de cultura após repiques sucessivos. As células passaram por sucessivas etapas de diluição e cultivo para a obtenção dos clones celulares. As células tratadas foram também semeadas no meio de cultura LIT (ARGAÑARAZ, 1996). Aliquotas desse meio foram examinadas por microscopia óptica, após 30 dias de cultivo a 27 °C, e foram utilizados na inoculação de camundongos recém-nascidos. Xenodiagósticos e subculturas do sangue destes animais foram persistentemente negativos. A erradicação do *T. cruzi* foi confirmada por Argañaraz (1996), também, pela ausência de amplificação das amostras celulares por PCR com iniciadores (*primers*) para seqüências repetitivas específicas do DNA nuclear do parasita (Tcz1 e Tcz2; Pon1 e Pon2). As linhagens celulares negativas para seqüências nucleares de *T. cruzi*, mas que apresentaram amplificação por PCR com iniciadores de minicírculo de kDNA (SK35 e SK36; SK34 e SK67) foram expandidas e mantidas por repiques sucessivos em cultivo.

### 1.2 - Cultivo de bactérias e de *Trypanosoma cruzi*

No cultivo das bactérias *Escherichia coli* foram empregados os meios NZY e Luria Broth Base - LB (Gibco – BRL). O meio sólido foi preparado com a adição de 1,5% de agar-agar bacteriológico (Merck) purificado e isento de inibidores, e nas infecções virais, e o meio “top agar” com 0,72% Agar Noble Sigma Chemical Inc. De acordo com a recomendação de cultivo de cada vetor, os meios foram suplementados com 50 a 100 µg/mL de ampicilina (Biotrás). Nos experimentos de expressão, a indução foi feita pela adição de 100 µg/mL de IPTG (isopropiltiol-β-D-galactosídeo) – Gibco-BRL.

Salvo alguma recomendação específica do protocolo, as bactérias foram cultivadas a 37 °C, durante 14 a 18 h, em meio líquido sob agitação de 220 rpm. O cultivo em meio sólido foi realizado a 37 °C até a visualização de colônias com diâmetro aproximado de 1 mm, o que corresponde a período de incubação entre 14 a 18 h, conforme as características genotípicas da hospedeira.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 5% de soro fetal bovino, contendo 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sob agitação a 28 °C (Camargo, 1964).

### 1.3 - Clones bacterianos contendo segmentos vindos de regiões de kDNA integrados no genoma mamífero

Partindo da premissa de que DNAs exógenos se incorporariam ao genoma em múltiplos sítios, geralmente próximos uns aos outros (MCFARLANE; WILSON, 1996), Argañaraz (1996) amplificou por PCR o DNA mamífero transfectado com minicírculos de kDNA, utilizando individualmente os iniciadores SK36 e SK35, que anelam especificamente nas regiões conservadas destas moléculas. Os produtos obtidos foram clonados no vetor PCRII, mantidos na bactéria hospedeira *E. coli* – DH5α. A seleção dos insertos híbridos kDNA/DNA hospedeiro foi feita por meio da técnica de *Southern blot*, conforme descrito por Argañaraz (1996): os insertos foram liberados do plasmídeo por digestão enzimática com a enzima *EcoR* I, isolados do gel de agarose, e radiomarcados para servirem como sonda na hibridação dos DNAs de macrófago normal e de *T. cruzi*. Desta forma foram selecionados os insertos A, B, C, D, E, F e G, que apresentaram duplo sinal de hibridação. Estes clones foram cedidos para seqüenciamento e análise, sendo que os clones A e B foram apresentados por Argañaraz (1996), enquanto que os demais fazem parte do presente trabalho de tese. Por esta estratégia, também foi obtido o clone

## MÉTODOS

M1, resultado da amplificação do DNA de macrófago de coelho com iniciadores SK36, por Nadjar Nizt e cedidos para seqüenciamento e análise.

## 2. GENÓTIPOS E ORIGEM DAS BACTÉRIAS

## a) Fago

$\lambda$ gt10 – Huynh et al., 1985 (em Sambroock et al., 1989)

$\lambda$ srI $\lambda$ 1° b527 srI $\lambda$ 3° imm434 (srI434+) srI $\lambda$ 4° srI $\lambda$ 5°

b) *Escherichia coli***DH5 $\alpha$**  (Focus, 1986 - Gibco – BRL)

*recA1, endA1 gyrA96, relA1, thi-1, supE44, hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>, *deoR*,  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$  (*lacZYA-argF*), *phoA*.

**INV $\alpha$ F'** (Invitrogen)

*recA1, endA1, gyrA96, relA1, thi-1, supE44, hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>,  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169, F<sup>'</sup>.

**DH5 $\alpha$ MCR** (Jesse and Bloom, 1988 – Gibco – BRL)

*recA1, endA1 gyrA96, relA1, thi-1, supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>, deoR,  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169, F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr - hsdRMS- mcrBC*-).*

**XL1-blue MRF'** (Stratagene)

*recA1, endA1, gyrA96, relA1, thi-1, supE44*, [F'*proAB, lacqZ* $\Delta$ M15 *Tn10* (Tetr)],  $\Delta$ (*mcrA*)183,  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173

**XL1gold**

Tetr (*mcrA*) 183 D (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 A1, *supE44 thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte* [F'*proAB, lacIqZDM15, Tn10* (Tetr), *Amy, Camr*]

**SURE Cells** (Stratagene)

*endA1, gyrA96, relA1, thi-1, supE44*, [F'*proAB, lacqZ* $\Delta$ M15 *Tn10* (Tetr)], *e14-* (McrA-),  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *lac, recB, recJ, sbcC, uvrC umuC::Tn5* (Kanr)

***CES201 (CGSC strains #6821E. coli Genetic Stock Center – Yale University - USA)***

$\Delta$  (*gpt-proA*) 62, *lac* Y1, *tsx-33*, *gal* k2 (*Oc*),  $\lambda$ -, *rac* -, *sbc* B15, *his* G4 (*Oc*), *rfdD1*,  $\Delta$ (*recA – srl*) 306, *sr/R301::Tn10*, *recC22*, *recB21*, *rpsL31 (strR)*, *kdgK51*, *xylA5*, *mtl-1*, *argE3* (*Oc*), *thi-1*, *hsdR*

***C600hfI***

*e14* (*McrA*  $\lambda$ ) *supE44 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 hfla150::Tn10*

**3. CONFIRMAÇÃO DA NÃO REVERSÃO DA MARCA GENÉTICA RECA, NA LINHAGEM BACTERIANA XL1-BLUE MRF'**

A confirmação da presença da mutação foi realizada através do método descrito em SAMBROOK et al. (1989). O pré inóculo bacteriano teste XL1-Blue MRF' e o controle C600hfI foi cultivados em meio líquido NZY durante a noite e em seguida semeados em placa contendo o meio de cultura sólido. Segmentos das placas foram cobertos de forma a não permitir a incidência de radiação ultravioleta. As placas foram expostas a esta radiação pelos tempos de 10, 20 e 30 segundos, sendo posteriormente incubadas durante a noite a 37 °C, para visualização do resultado.

**4. EXTRAÇÃO DE DNA****4.1 - Genômico**

Os DNAs genômicos, tanto de macrófagos normais, de suas linhagens subclonais e *T. cruzi* foram extraídos pelo método descrito por Gross-Berllard et al. (1972) com modificações. As células em cultura foram quantificadas, e centrifugadas a 500 x g x 5min para sedimentação e remoção do meio de cultivo. Em seguida o material foi lavado por duas vezes a 500 x g x 5 min. com 10 mL de tampão PBS gelado. O sedimento foi então ressuspenso em 0,3 mL ou em 1 mL de tampão de digestão por cada 3 x 10<sup>7</sup> ou acima deste valor, respectivamente (tampão de digestão: 100 mM NaCl; 10 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5% p/v SDS; 0,1 mg/mL de proteinase K).

A mistura foi incubada a 50 °C por 12 h a 18 h com leve agitação. No dia seguinte, adicionou-se igual volume de clorofane (24 partes de fenol tamponado pH 8,0, 23 partes de clorofórmio, 1 parte de álcool isoamílico), fez-se a homogeneização, e a centrifugação a 1700 x g x 10min, sendo esta etapa repetida pelo menos mais uma vez. Adicionou-se ½ volume de acetato de amônia 7,5 M e 2 volumes de etanol 100%. Neste ponto obteve-se a precipitação do DNA na altura do meio frasco, que foi enrolado em

## MÉTODOS

---

bastão de vidro novo e estéril, lavado em etanol 70% e dissolvido em TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA, ajustado para pH 8,0). Adicionou-se 0,1% de SDS e 1 µg/mL de RNase (livre de DNase), e o material foi incubado por 1 a 2 h a 37°C. A mistura foi então dializada a 4 °C com 100 volumes de TE, por pelo menos 24 h. O DNA foi alíquotado para 5 mL e mantido a 4 a 8 °C para evitar quebras das fitas comuns durante os processos de congelamento e descongelamento. O material extraído por este método guardado nestas condições foi estável por mais de um ano.

### 4.2 - Extração de kDNA

A extração do kDNA foi feita pelo método descrito por Perez-Morga e Englund (Cell, 1993).

Os epimastigotas foram cultivados conforme descrito anteriormente e centrifugados para retirada do meio de cultivo. As células foram lavadas por duas vezes com PBS (1 X) gelado. Ressuspendeu-se então as células em tampão NET100 (0,1 mM de NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8,0) na proporção de 630 µL de tampão para cada  $3 \times 10^7$  células. Acrescentou-se à mistura 71 µL de SDS 10% e 7 µL de proteinase K (20 mg/mL), sendo incubada por 1 h a 37 °C, sob leve agitação. Em seguida a mistura foi vigorosamente homogeneizada com a pipeta e transferida para um colchão de sacarose 20 em tampão NET100, e centrifugado a 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C. O precipitado foi ressuspenso em 30 µL do sobrenadante, acrescido de 680 µL de NET100 e mais uma vez centrifugado. Repetiu-se este procedimento mais uma vez, sendo que no final ressuspendeu-se em 50 µL em invés de 30 µL. A mistura foi então dialisada a 4 °C com 100 volumes de TE, por 24 h com pelo menos duas trocas do tampão. O kDNA foi mantido em boas condições de uso a 4 a 8 °C por de até 6 meses, alíquotas que não seriam usadas a curto espaço de tempo foram guardadas a -20 °C, por até 2 anos.

### 4.3 - Extração de Plasmídios

As extrações de plasmídios foram feitas por diferentes métodos de acordo com a destinação posterior do material. Nas triagens, foram empregadas as mini-extrações alcalina descrita por Ish-Horowicz e Burke (1981) citados em SAMBROOK et al. (1989). Para clonagens e seqüenciamento os plasmídios foram extraídos pelo kit de purificação Wizard (Promega), conforme recomendação do fabricante, ou por maxiprep, quando os testes requeriam várias etapas de manipulação.

Lise Alcalina: O método de extração por lise alcalina foi empregado para 3 mL de cultura de bactéria no final da fase exponencial (14 a 16 h de crescimento da cultura de bactéria). O meio de cultura

## MÉTODOS

---

foi removido por centrifugação e o sedimento ressuspensão em 200 µL de tampão TE mantido no gelo por 5 min. Em seguida, sempre retornando o tubo ao gelo, adicionou-se 360 µL de solução de lise (0,4 M NaOH, SDS 2% em água), preparadas no momento do uso, sendo a mistura homogeneizada, delicadamente, por inversão do tubo. Em seguida, adicionou-se 310 µL de NaOAc 3 M pH 4,0 e realizou-se nova homogeneização. A partir desta etapa todos os procedimentos foram feitos à temperatura ambiente, a mistura foi então centrifugada por 5 min. a velocidade máxima em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido para outro tubo e acrescido de 750 µL de isopropanol, nesta etapa ocorreu a precipitação do DNA plasmidial, que foi coletado por centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Com a finalidade de remover as proteínas contaminantes, os plasmídios foram ressuspensos em 200 µL TE, sendo adicionado 110 µL de acetato de amônia 7,5 M. A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 min. e o sobrenadante transferido para outro tubo. Após acréscimo de 750 µL de etanol 90% (em água), procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 5 min., descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 200 µL de TE. Os plasmídios purificados foram precipitados pela adição de 10 µL de 3 M NaOAc pH 4,0 e 450 µL de etanol, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. O sedimento foi, então, lavado com etanol 70%, secado por 5 min. no vácuo, e ressuspensão em 40 µL de TE com 1 µL de RNase (10 mg/mL). As preparações plasmidiais foram mantidas à temperatura de 4 a 8 °C.

Maxiprep: A extração de plasmídio em grande escala foi feita pelo método de purificação em polietileno-glicol PEG, de acordo com protocolo de Treisman descrito em SAMBROOK (1989).

### 5. DIGESTÃO DO DNA E TRATAMENTO COM FOSFATASE ALCALINA

Os DNAs genômicos, plasmidiais e kDNAs foram digeridos de acordo com a especificação do fabricante de cada enzima, com os tampões compatíveis e nas temperaturas recomendadas. No caso de DNA genômico foram feitas digestões que continham de 16 a 60 µg DNAs por tubo, ajustadas para um volume final de reação de 200 a 1000 µL, com 1 a 3,5 U de enzima/µg de DNA de acordo com a especificação da enzima, sendo incubadas durante 16 horas. No caso de plasmídios e kDNA a mistura foi feita para 0,3 a 1 µg de DNA em volumes não superiores a 20 µL.

Os plasmídios e fagos destinados a clonagens foram tratados com a enzima fosfatase alcalina (CIAP - Pharmacia) para aumentar a eficiência da ligação inserto/vetor, de acordo com a recomendação do fabricante para aquela enzima.

## MÉTODOS

---

Após os tratamentos enzimáticos, as enzimas ou foram inativadas por aquecimento, ou extraídas com 1 volume de clorofane, seguida de uma segunda extração com 1 volume clorofil, sendo o DNA precipitado com 1/10 volumes de 3 M NaOAc pH 4,0 e 2 volumes de etanol 100%, lavado com etanol 70%, e ressuspenso em TE ou H<sub>2</sub>O, conforme a necessidade de cada experimento.

### 6. ANÁLISE ELETROFORÉTICA: PURIFICAÇÃO DO DNA A PARTIR DE GÉIS

#### 6.1 - Agarose

Os DNAs obtidos de diferentes origens foram visualizados em géis com porcentagens de agarose que variaram em função do tamanho esperado do inserto (SAMBROOK et al.,1989). De um modo geral, os genômicos foram analisados em géis contendo 0,6% de agarose, sendo corados posteriormente em solução do tampão com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os géis para DNAs menores, tais como plasmídios e insertos, foram visualizados em agarose a 1% previamente misturada ao brometo de etídio (0,5 µg/mL). O tampão empregado no preparo dos géis e na eletroforese foi o TBE 1X (90 mM Tris Base; 90 mM de ácido bórico; 2,5 mM EDTA).

As bandas visualizadas no gel foram isoladas com o kit QIAEx da QIAGEN (Alemanha), conforme recomendação do fabricante. Em seguida, o DNA foi estocado em TE ou água miliQ, de acordo com as necessidades dos protocolos experimentais.

#### 6.2 - Acrilamida

Os géis de acrilamida foram empregados nas análises das reações de seqüenciamento, no isolamento de bandas, verificação da qualidade dos iniciadores e marcações radioativas. As soluções foram preparadas a partir de estoques de acrilamida 20% (95 g de acrilamida; 5g de bisacrilamida; 8 M de uréia; 50 mL de TBE 10X - qsp 500 mL com água bidestilada) e TBE uréia (8 M uréia; 50 mL TBE 10X - qsp 500 mL com água bidestilada), nas proporções adequadas para preparar géis a 6% e a 8% de acrilamida, respectivamente, para as corridas longas (de 6 a 8 h, 80 W constantes, limitados a 2000 V – sistema GIBCO-BRL, modelo S2) e curtas (2 até 6 h, nas mesmas condições) e análise de iniciadores ou produtos marcados radioativamente por PCR.

Os géis para análise e isolamento de bandas em poli(acrilamida) foram produzidos de acordo com o protocolo do manual técnico do GenePrint STR Systems, Promega, com modificações nas concentrações dos géis (3 e 3,5%). As soluções foram preparadas no momento do uso, com uréia a 7 M

## MÉTODOS

---

(15, 75 g), e 3,75 mL de TBE 10X, 2, 28 ou 3,28 mL de acrilamida 40% (acrilamida 19 : bisacrilamida 1), e 19, 07 mL ou 18,6 mL de água bidestilada (géis 3 ou 3,5%). Após duas filtrações, acrescentou-se 250 µL de persulfato de amônia 10% e 25 µL de TEMED, sendo o gel vertido imediatamente nas placas pequenas do sistema GIBCO-BRL modelo SA previamente preparadas. A corrida foi feita a 35 W constantes limitados a 1500V, por 1 h e 40 min., em média.

As bandas foram isoladas pelo método descrito no protocolo para DDRT-PCR elaborado pela prof<sup>a</sup> Ildinete Pereira do Laboratório de Biologia Molecular (UnB). No nosso laboratório foram feitas modificações de forma a atender as necessidades deste trabalho. Após a corrida do DNA marcado radioativamente, o gel foi aderido a uma folha de papel de filtro, e seco no sistema calor-vácuo, a 80 °C, por 30 min. Em seguida, foi exposto a um filme de Raio-X por 1 a 3 dias a -80 °C. O filme foi sobreposto ao gel aderido ao papel para que fossem recortadas as regiões de interesse. Os recortes foram transferidos para tubos de microcentrifuga e imersos em quantidade suficiente de água miliQ (normalmente entre 200 a 500 µL), incubados durante 30 min. à temperatura ambiente (TA) sendo em seguida fervidos a 100°C por 15 min. Após a fervura, os tubos foram passados imediatamente para o gelo e centrifugados por 5 min. a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se 1/10 do volume de 3 M NaOAc (pH 4,0), 5 µL de glicogênio e 3,5 volumes de etanol 100%, para promover a precipitação do DNA. As misturas foram incubadas, preferencialmente durante a noite, a -20°C, e centrifugadas por 30 min. a 14.000 rpm. O sedimento foi lavado com etanol 80%, seco por 5 min. no vácuo e ressuspensão em 20 µL de H<sub>2</sub>O miliQ. O DNA mantido a -20°C permaneceu estável por no máximo 1 mês.

## 7. INICIADORES, ADAPTADORES E SONDAS

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para seqüências conservadas de minicírculos foram derivados dos publicados por STURM et al. (1989): **SK35** – 5' ATA.ATG.TAC. GGG.(T/G)GA.GAT.GC 3'; **SK36** – 5' GGT.TCG.ATT.GGG.GTT.GGT.G 3'; **SK67** – 5' GGT.TTT. GGG.AGG.GG(C/G).(G/C)(T/G)T.C; **SK34** – 5' ACA.CCA.ACC.CCA.ATC.GAA.CC 3'.

Foram desenhados três oligonucleotídeos derivados de LINE-1 a partir da seqüência obtida do clone HUMC11, genbank acesso - gbIL19088I: **L1Rta1**: 5' – CTG.GCC.AGA.ACT.TCC.AAC.AC – 3'; **L1Rta2**: 5' – GTT.TGT.AGT.TCT.CCT.TGA.AGA.G – 3', **L1RTs1**: 5' – CAA.GCC.GGG.CAG. AGA.CAC – 3', que anelam no clone genbank HUMC11 (DOMBROSKI et al.,1993), respectivamente, nas posições: fita negativa, bases 4000 a 4002, e bases 4323 a 4348, e na fita positiva, bases 3542 a 3523.

## MÉTODOS

As seqüências obtidas dos diversos segmentos de DNAs clonados a partir do genoma de macrófagos transfectados e do *T. cruzi*, originaram os oligonucleotídios: **M6a1**: 5' – CCT.TTG.ACA.AAA TTC.AACAACC – 3' (posição 3801 a 3821 do clone genbank HUMCL1); **TcVA**: 5' - GCA.CCT.CCA.TTT.ACC.ATA.AAA.CA – 3'; **TcVS**: 5' – GAG.AGT.TGG.TGA.TAG.TTG.TGG – 3'; **C6.80s**: 5' – GAG.AGT.GGT.GGT.AGT. GCT.TTG – 3'; **C6.80a**: 5' – CCA.CTC.CAA.CCC.ACT.CCA.AC – 3'; **IS**: 5' – GTG.GCA.TAG TTC.CCA.ACT.TCG – 3'; **Sat2**: – 5' – GTGT.GTG.TGT.GTG.TGT GTG.TAT.AC – 3'; **SI**: 5' – CGA. ATC.CAC.TCC. ACT.CCC.AC – 3'; **S2**: 5' – GAG.TTG.AGT. GAA.GAA.TGG.AAT.G – 3'; **M9S2**: 5'- GCC.CAT.TCA. GTA.TGA.TAT.TGG – 3'; **Lihinf**: 5' – AAA CCG.AAT.CCA.GCA.GCA.AAT.C – 3'; **MA**: 5' – AAC. TCA.GTT.CTG.GGA.GGC.A – 3'; **AI**: 5' – ATG. TTC.AGG.GAA.AGG.GAC.TGT – 3'; **A2**: 5' – TTC AGG.GAA.AGG.GAC.TGT.CTC – 3'; **A3**: 5'– TGT.TCA. GGG.AAA.GGG.ACT.GTC – 3' ; **A4** – 5' GTT.CAG.GGA.AAG.GGA.CTG.TCT – 3'.

Os oligonucleotídios utilizados como iniciadores na amplificação do gene mamífero  $\beta$ -actina foram desenhados a partir da seqüência acesso MMACTBR depositada no genebank. O produto esperado da amplificação gerou um fragmento com 800 pb, correspondente ao gene sem o íntron:  **$\beta$ As**: 5' – ATC.TGG.CAC.CAC.ACC.TTC.TAC.AAT.GAG.CTG.CG – 3' - desenhado a partir da posição 364 pb fita negativa, do acesso MMACTBR; **M $\beta$ Aa**: 5' – CAT.CGT.ACT. CCT.GCT.TGC.TGA.TCC.ACA.TCT.GC – 3', iniciadores desenhado a partir da posição 1139 pb da fita positiva do acesso MMACTBR -  $\beta$ actina murina;

Oligonucleotídios desenhados para a formação de adaptadores para as capturas foram: **LinkCla**: 5' – CGA.TGC.GGC.CGC.TCG.AGA.G – 3'; **Pcla**: 5' – CTC.TCG.AGC.GGC.CGC.AT – 3', o anelamento deste par de iniciadores forma o adaptador LClA. **MrCla**: 5' - CCT.TCA.GGA.AAC. AGC.TAT.GAC.AT - 3'; **Cmrc**: 5' - CGA.TGT.CAT.AGC.TGT. TTC.CTG.AAG.G - 3' , o anelamento do par forma o adaptador MclA, que é compatível com extremidades geradas pela digestão de DNAs com *Taq* I. **pEco**: 5' - AAT.TCT.CTC.GAG.CGG.CCG.CAT.CG - 3', o anelamento deste iniciadores com o *Linkela* forma o adaptador **LEco**.

Todos os oligonucleotídios foram analisados quanto a auto complementaridade, temperatura de anelamento, pelo programa DNAmam. No seqüenciamento, os iniciadores desenhados a partir de DNAs clonados foram analisados, também, quanto a complementaridade com o vetor, e com o segmento já

## MÉTODOS

---

seqüenciado, utilizado-se o mesmo programa. Nos experimentos de amplificação por PCR, os pares de iniciadores foram desenhados de forma a evitar a auto amplificação.

As sondas de kDNA foram obtidas pela extração e digestão com *EcoR* I do kDNA do *T. cruzi* estoque Berenice. A sonda 122 também foi obtida do estoque Berenice de *T. cruzi*, a partir da clonagem do produto de amplificação, entre os iniciadores *SK67/SK34* correspondentes a região conservada de minicírculo de kDNA.

As marcações radioativas foram feitas com  $\alpha$  e  $\gamma$   $P^{32}$  ATP e  $\alpha S^{35}$  ATP (3000 Ci/mMol) procedentes da Amersham (UK). As sondas  $\alpha$  foram marcadas com kit “Random Iniciadores DNA labelling system” e dNTPs da Gibco-BRL. As sondas  $\gamma$  foram marcadas com enzima PNK (polinucleotideo kinase) e seu respectivo tampão da Promega. As sondas purificadas através de coluna contendo Sephadex G-50, apresentaram atividade específica média de  $1 - 5 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de DNA.

A marcação de fragmentos de tamanho intermediário, como no caso da sonda 122 pb, se deu pelo método de PCR quente, onde o dATP foi substituído pelo  $\gamma$   $P^{32}$  ATP, com o intuito de melhorar a atividade específica da marcação. Neste caso a marcação foi monitorada também em gel de acrilamida desnaturante.

## 8. SOUTHERN BLOT

Após eletroforeses em gel de agarose, os DNAs de interesse foram transferidos por capilaridade para a membrana de “nylon Byodine B”, pelo método alcalino, conforme orientação do fabricante (Pall Bio Support. East Hills, NY 11548). Resumidamente, o protocolo consistiu de uma etapa de depurinização com HCl 0,2 N por um período não superior a 10 minutos, seguida de uma lavagem rápida em água destilada e incubação com 0,4 M de NaOH por 30 – 40 min. A membrana encharcada com SSC 2X (0,3 M NaCl, e 0,03 M de citrato de sódio), em seguida, era posta para secar a temperatura ambiente. Quando o DNA era menor que 4 kb omitiu-se a depurinização.

A solução de pré-hibridação foi a mesma da hibridação [12 mL PEG 8000 50%, 20,4 mL dH<sub>2</sub>O, 21 mL SDS 20%, 4,5 mL SSPE 20X (175,3 g NaCl, 27,6 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 7,4 g EDTA para 1000 mL dH<sub>2</sub>O, ajustado o pH para 7,4)].

As membranas foram pré-hibridizadas durante pelo menos 30 min. a 65 °C, e hibridizadas durante a noite a 64 °C. As lavagens foram feitas pelo método descrito no manual do fabricante, sem

## MÉTODOS

---

modificações, com graus crescentes de estringências conforme descrito a seguir: duas vezes: SSC 2X , 0,1%SDS, durante 15 min. à temperatura ambiente; e uma vez: SSC 0,1X , 0,1% SDS, durante 20 min. à 65 °C. Removido o excesso de líquido, a membrana úmida foi envolta em filme de PVC, e acondicionada com filme de raio-x (Kodak X- OMAT) em cassetes contendo intensificador de sinal, sendo o conjunto mantido a temperatura de -80 °C durante o período de exposição. No caso de reaproveitamento da membrana para nova hibridação, a sonda anelada ao DNA fixado foi removida segundo recomendação do fabricante, após incubação a 65 °C por 60 min. com 20 mL de solução de formamida (110 mL de Formamida, 20 mL de SSPE 20 X, 10 mL de SDS 20%, 60 mL de água deionizada estéril) para cada cm<sup>2</sup> de membrana. Realizado o tratamento, a membrana foi mergulhada no mesmo volume de uma solução contendo 0,1 X de SSC e 0,1% de SDS, durante 1 min. à temperatura ambiente. Em seguida a membrana dehibridada, ainda úmida, foi novamente envolta no filme de PVC para nova exposição, durante um período de pelo menos 10 dias, com a finalidade de verificar a eficiência da remoção da sonda, antes da nova hibridação.

### 9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLIMERASE CHAIN REACTION)

As PCRs foram utilizadas para as confirmações da presença do kDNA nas linhagens subclonais de macrófagos, na obtenção de segmentos de minicírculos a partir de *T. cruzi*, em diferentes ocasiões, para amplificação de bandas isoladas de géis, ou de bancos genômicos, nas estratégias de PCR inversa, amplificação de flancos de kDNA clonado em vetores, no método de captura, e na obtenção de sondas. A quantidade de DNA usados nas amplificações com diferentes iniciadores foram: 50ng de DNA provenientes de bandas genômicas isoladas; 2.10<sup>7</sup> pfu banco genômico em fago previamente fervidos por 5 min. em água; 100 pg de kDNA de *T. cruzi*. Estas quantidades foram definidas em função do teste de sensibilidade otimizado por Argañaraz (1996), para iniciadores de kDNA.

De um modo geral as reações foram feitas para o volume final de 50 µL por amostra, com 0,5 U de enzima *Taq*-polimerase, ou *Tth*, e respectivo tampão, 0,2 mM de cada dNTP e 20 pMoles do par de iniciadores. No caso da enzima *Tth* (Promega), foi feita a padronização da quantidade de Mg (OAc)<sub>2</sub> necessária para a reação, que no nosso caso foi de 3 µL de uma solução 25 mM.

Como a maioria dos iniciadores foi desenhado para serem compatíveis em amplificações com os iniciadores de kDNA, empregou-se o programa abaixo:

## MÉTODOS

---

### Programa kDNA:

- 94 °C /2 min.;
- 32 ciclos: 64 °C/1min; 72 °C/1 min.; 94 °C/30s;
- 64 °C/1 min.;
- 72 °C/5 min.;
- Refrigeração a 4°C;

Nas situações onde iniciadores dos vetores participavam das ampliações foram usados os programas:

### Programa λgt10

- 94 °C /2 min.;
- 30 ciclos: 53 °C/1min; 72 °C/2 min; 94 °C/1min;
- 53 °C/1 min.;
- 72 °C/10 min.;
- Refrigeração a 4°C;

### Programa plasmídeo

- 95 °C /2 min.;
- 30 ciclos: 95 °C/1min; 46 °C/30s; 70 °C/1 min.;
- Refrigeração a 4°C;

Nas ampliações de linkers com a enzima *Tth*:

### Programa XLClα

- 94 °C /1 min.;
- 32 ciclos: 94 °C/30s; 68 °C/5min;
- 70 °C/10 min.;
- Refrigeração a 4°C;

## 10. CLONAGENS

### 10.1 - Plasmídios

As clonagens de produtos de PCR foram feitas com o auxílio do kit TA (Invitrogen) no plasmídios PCR II e PCR 2.1. Nas construções genômicas enriquecidas e nas subclonagens, os plasmídios foram cortados com as enzimas de restrição apropriadas e tratados com fosfatase alcalina, conforme descrito anteriormente. Na elaboração do banco enriquecido usou-se a relação de 200 ng de inserto para 200 ng de plasmídeo tratado, e em subclonagem 100 ng de plasmídeo e inserto, na relação dada pela fórmula abaixo:

$$X \text{ ng (inserto)} = \frac{(\text{tamanho do inserto em pb}) \times (100 \text{ ng do vetor})}{(\text{tamanho do plasmídeo em pb})}$$

## MÉTODOS

---

As misturas de ligação foram feitas para um volume final entre 10 – 20  $\mu\text{L}$  com 5 a 10 unidades weis de enzima T4 DNA ligase (Pharmacia) e seu tampão a 1X de concentração, 1 mM de ATP e os DNAs. A mistura foi incubada a 14 °C durante a noite, sendo inativada, posteriormente, por aquecimento, conforme orientação do fabricante.

### 10.2 - Transformação

As transformações foram feitas com 25 a 50 ng de plasmídeo ligado para cada 100  $\mu\text{L}$  de células competentes preparadas de acordo com protocolo descrito em SAMBROOK et al.(1989) ou 10 ng no caso de células ultra-competentes adquiridas da GIBCO-BRL, de acordo com protocolo do fabricante. Após a mistura das células ao DNA, foi feita a incubação em gelo durante pelo menos 30 min. Transcorrida a incubação, fez-se o choque térmico a 42 °C, por 2 min., e transferiu-se o tubo novamente para o gelo por mais 2 min. Em seguida foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de meio de cultura NZY, e a mistura foi levada para incubar por 1 h a 37 °C com agitação de 225 rpm. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  – 100  $\mu\text{L}$  foram semeadas em placas de Petri contendo meio NZY sólido com ampicilina, e incubados a 37 °C conforme descrito no item: 2-Culturas de Células.

Como sítio de clonagem da maioria dos vetores escolhidos está dentro do gene  $\beta$  galactosidase, o meio de cultivo sólido foi acrescido de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de X-gal durante o preparo das placas, o que permitiu a seleção das bactérias que receberam plasmídios com insertos, em detrimento das que receberam apenas o vetor vazio.

No caso da bactéria Sure cells a transformação foi feita também por eletroporação, conforme descrito em SAMBROOK (1989), sendo as alíquotas plaqueadas e cultivada como anteriormente.

## 11. CONFIRMAÇÃO DA ORIGEM HÍBRIDA DOS CLONES DO GRUPO A (A, C E D)

Segmentos de DNA com sinais positivos quando hibridados com DNA de macrófago normal, e com kDNA, foram clonados por Argañaraz (1996), em plasmídeo PCRII mantidos em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Três dos 5 clones (A, C, e D), cedidos para seqüenciamento e análise, apresentaram seqüências de bases de DNA, com os iniciadores (*iniciadores*) SK36 presentes em ambas às extremidades do segmento, em orientação invertida e complementar quando comparados entre si. Após o iniciador, seguiu-se uma seqüência de 5 bases com correspondência ao final das regiões conservadas de minicírculo, e mais internamente, uma seqüência de DNA do hospedeiro correspondente a elemento da família LINE – 1

## MÉTODOS

---

(L1), flanqueado por uma repetição do tipo satélite III e uma região com identidade não definida, conforme mostrado na **Figura 7**. Com a finalidade de confirmar a suposta origem indicada pela análise em banco de dados, o clone A foi subdividido enzimaticamente conforme estratégia experimental apresentada na **Figura 1** e itens 12.1, 12.2. e 12.3. Os fragmentos radio marcados foram empregados como sonda na hibridação por Southern de 25 ug de DNA genômico de macrófago normal DNA e de 16 ug DNA total de *T. cruzi*, digeridos com a enzima de restrição *EcoR* I, sendo as condições de transferência dos DNAs para as membranas, hibridações e lavagens realizadas de acordo com o procedimento padrão descrito no item 9.

### 11.1 - Isolamento da região satélite (MAS)

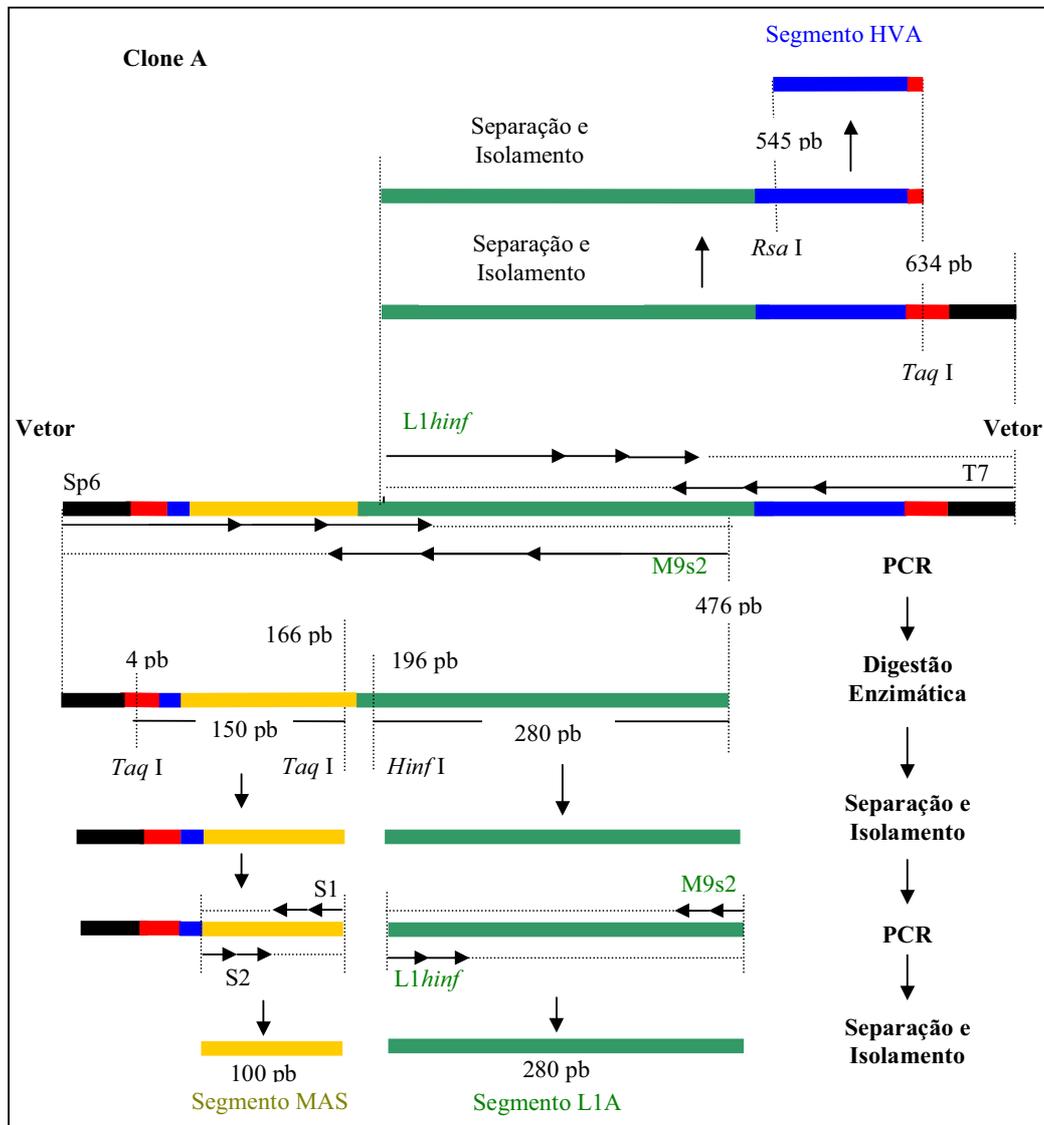
Inicialmente, foi feita a amplificação do inserto a partir dos iniciadores do vetor, sendo em seguida purificado do gel de agarose por QIAEx, conforme mostrado na **Figura 1**. O material obtido foi digerido com as enzimas *Taq* I e *Hinf* I, sendo isolada do gel de agarose a banda de 100 pb correspondente a região satélite. Esta banda foi então diluída para 0,01ng e amplificada com os *iniciadores* sat1/sat2, novamente isolada do gel e marcada radioativamente por *Random iniciador* e *PCR*.

### 11.2 - Isolamento da Região L1A

A região L1A foi isolada a partir da amplificação do segmento m9s2/*iniciador* vetor (sp6) do clone A (**Figura 1**), seguido de purificação e digestão com a enzima *Hinf* I. A banda de 280 pb foi então isolada em gel de agarose 2% e marcada por *Random iniciador*.

### 11.3 - Isolamento da Região HVA

A região variável foi isolada conforme mostrado na **Figura 1**, a partir da digestão do inserto *Hinf* I / *Taq* I com a enzima *Rsa* I seguido da purificação em agarose 2% e marcação da banda de 89 pb por *random iniciador*.



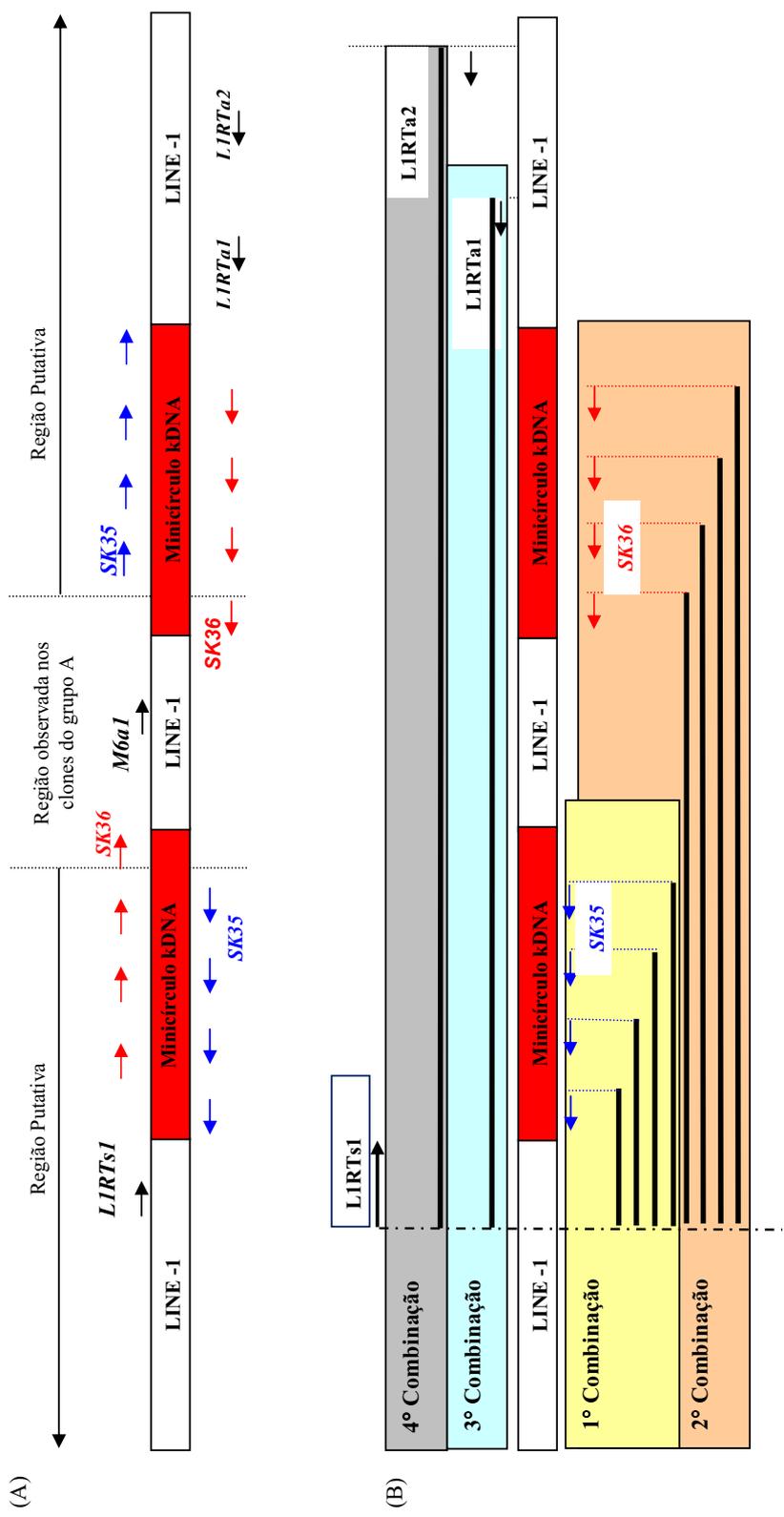
**Figura 1.** Sondas geradas a partir da subdivisão do clone A para confirmação da origem híbrida dos clones da família LINE-1. Linhas: preta, vetor; vermelha, região conservada de minicírculo de kDNA; azul, região variável do minicírculo; amarela, satélite; verde, fragmento do elemento LINE-1. Estratégia experimental para obtenção da sonda MAS, L1A e HVA.

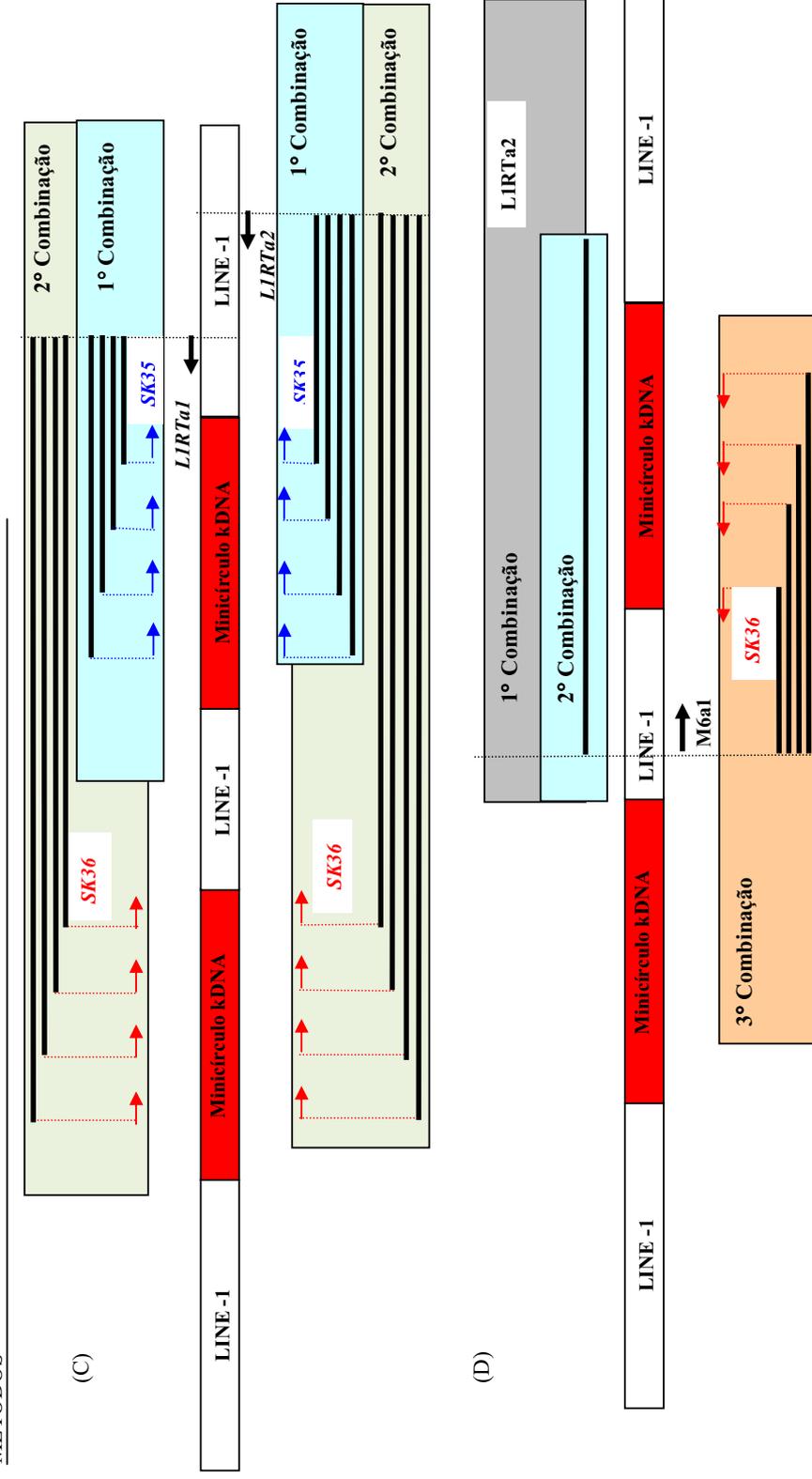
## 12. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTEGRAÇÃO COM INICIADORES DE LINE-1 E DE MINICÍRCULO DE kDNA

A partir das informações dos seqüenciamentos do grupo A, elaborou-se a estratégia experimental apresentada na **Figura 2**, partindo do pressuposto de que a integração teria ocorrido dentro de um segmento de LINE-1. Portanto, foram desenhados os oligonucleotídeos: *M6a1*, *LIRTa1*, *LIRTa2* e *LIRTs1*, que em combinação com os iniciadores, Sk35 e Sk36, amplificaram, por PCR, os DNAs moldes isolados da primeira partida de macrófagos transfectados “A” e “G”, e normais, bem como o de *T. cruzi*. As reações de amplificações foram feitas de acordo com o protocolo padrão descrito no item 10 e o programa utilizado foi o “kDNA”. Os produtos obtidos das amplificações, após visualização em gel de agarose 1%, foram transferidos para membrana de “Nylon”, para hibridação com os oligonucleotídeos radio marcados: SK35, SK36, ou *M6a1*, segundo a técnica de *Southern blot* descrita anteriormente, com a finalidade de verificar a especificidade da amplificação. Após a análise da auto-radiografia resultante, da primeira hibridação, a membrana foi dehibridada, e em seguida rehibridada com o segundo oligonucleotídeo, e posteriormente com o terceiro, conforme procedimento detalhado no capítulo *Southern blot*. Confirmado o sinal positivo nas três hibridações, a banda de interesse foi isolada do gel de agarose por QIAEx, ligada ao vetor PCRII, para transformação da bactéria hospedeira INV $\alpha$ F’, de acordo com os protocolos padrões. Os transformantes foram selecionados como descrito no item: “Hibridação de Colônia”.

Estratégia semelhante foi empregada para analisar amostras de DNA isoladas do sangue proveniente de humanos chagásicos. O DNA foi obtido de acordo com o protocolo descrito em SAMBROOK et al., 1989 e gentilmente cedido por Socorro Braga, para realização da amplificação do kDNA integrado através da mesma abordagem experimental. No caso, foram empregados os iniciadores SK36, de região conservada de minicírculos de kDNA, em combinação com o iniciador *M6a1*, desenhado a partir do LINE-1 do grupo A, de acordo com o protocolo padrão usado nas PCRs, e programa kDNA. A especificidade da amplificação foi confirmada por *Southern blot* com a sonda de 122 pb de kDNA. O produto amplificado foi clonado no vetor PCR2.1 e utilizado para transformar a hospedeira DH5 $\alpha$ , conforma protocolos já descritos. Os insertos recuperados dos clones foram novamente hibridados por *Southern blot*, e submetidos a seqüenciamento.

MÉTODOS





**Figura 2.** Estratégia experimental para amplificação da região de integração, partindo do pressuposto de que a integração teria ocorrido dentro de um segmento de LINE-1. Os oligonucleotídeos derivados de LINE-1 foram desenhados a partir da sequência do clone HUMC11 (DOMBROSKI et al., 1993) genbank acesso gb|L190881: fita negativa, bases 4000 a 4002 (LIRTa1), bases 4323 a 4348 (LIRTa2), e na fita positiva bases 3542 a 3523 (LIRTs1). O oligonucleotídeo M6a1, obtido das informações dos clones do grupo A, corresponde ao mesmo LINE-1 as bases 3801 a 3821. A) Localização dos iniciadores na suposta região de integração dos minicírculos no LINE-1 e direção da amplificação. B) Estratégia de amplificação, tendo como um dos iniciadores o LIRTs1; B) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o LIRTa1; C) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o LIRTa1 e LIRTa2. D) Estratégia de amplificação tendo como um dos iniciadores o M6a1;

### 13. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO ENRIQUECIDO

#### 13.1 - Abordagem I: Construção do banco enriquecido em Fago $\lambda$ gt10.

Uma alíquota contendo 10  $\mu$ g de DNA do fago foi digerida totalmente com a enzima *EcoR* I, e tratada com fosfatase alcalina conforme protocolo padrão. O DNA de macrófago transfectado, utilizado neste experimento, foi isolado da terceira partida de células em cultura, aproximadamente dois anos da obtenção das linhagens subclonais. A ligação com o DNA de macrófago enriquecido da região positiva na hibridação com kDNA foi feita de acordo com a recomendação descrita no kit  $\lambda$ gt10-*EcoR* I-CIAP-Treated vector kit (Stratagene) para um volume final de 5  $\mu$ L. Em resumo, as regiões kDNA-positivas em *Southern blot*, proveniente das linhagens subclonais A11 e C4 digeridas com a enzima *EcoR* I, foram isoladas do gel de agarose por QIAEx e quantificados por espectrofotometricamente a 260 nm. Para cada construção, 0,1  $\mu$ g de DNA isolado foram misturados a 1  $\mu$ g de DNA de fago tratado. Adicionou-se o tampão de ligação, o rATP, para as concentrações finais de 1X e 1 mM respectivamente, 2 U de T4 DNA ligase, e água miliQ suficiente para completar o volume de reação. A ligação foi incubada 4°C durante 48h. Após este período, os DNAs virais reanelados foram empacotadas com o auxílio do kit GIGAPAK III Gold (Stratagene) de acordo com procedimento descrito no manual.

#### *a) Preparo das Bactérias*

As células utilizadas nas infecções virais foram preparadas a partir de colônias de bactérias colhidas de placas com dois dias de semeadura, em 5 mL de meio LB acrescido de 10 mM de  $MgSO_4$  e 0,2% (p/v) de maltose. O cultivo foi realizado durante a noite a 30 °C com 200 rpm de agitação. Na manhã seguinte, fez-se as leituras da densidade óptica a 600 nm, sendo removido o meio de cultura, por centrifugação 500 xg por 10 min., quando o valor da  $OD_{600} = 1,0$ . O sedimento foi ressuspensão para a  $OD_{600} = 0,5$  com 10 mM de  $MgSO_4$  (estéril) gelado, e mantido no gelo até o momento do uso.

#### *b) A infecção viral*

O banco foi titulado e amplificado de acordo com manual publicado no kit  $\lambda$ gt10/*EcoR* I /CIAP-Treated vector kit (Stratagene). Na titulação uma alíquota de 200  $\mu$ L de células preparadas conforme descrito no item anterior foram misturadas a 1  $\mu$ L do fago empacotado e outra alíquota a 0,1  $\mu$ L, sendo incubadas por 15 min. a 37 °C. Após este período, foram adicionados 3 mL de top agar-NZY a 48°C, misturados por inversão do tubo, e, imediatamente vertidos para placas de 90 mm com NZY. O meio foi

## MÉTODOS

---

solidificado após por 10 min. a temperatura ambiente, sendo posteriormente incubados a 37° por 14 a 18 h, até boa visualização das placas de lise. Na amplificação, foram misturados aproximadamente  $5.10^4$  pfu de bacteriófagos para cada 600  $\mu$ L de células preparadas, e incubados conforme anteriormente. Em seguida, adicionou-se 7 mL de top agar,-NZY que foram vertidos em placas de 150 mm com meio NZY. Após solidificação do meio de cultura, as células foram incubadas a 37 °C, até as placas de lise alcançarem diâmetros entre 1 a 2 mm. Então, 8 a 10 mL de solução tampão estéril de SM (5,8 g NaCl; 2,0 g do Mg SO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 50 mL de 1 M Tris-HCl pH 7,5; 5,0 mL de gelatina a 2% - p/v; água deionizada para completar o volume de 1litro), foram adicionados às placas, que, por sua vez, foram incubadas com leve agitação, a 4 °C durante a noite. Na manhã seguinte, foram coletadas as soluções para um tubo estéril, sendo feito uma lavagem adicional com mais 2 mL de tampão SM, para coletar os fagos restantes. Ao tubo com os fagos, foram adicionados 5% do volume final com clorofórmio, que foi incubado com agitação leve por 15 min. à temperatura ambiente. Por fim, o material foi centrifugado 500 x g por 10 min., para remover resíduos celulares. Acrescentou-se ao sobrenadante transferido para novo tubo, 0,3% de clorofórmio, para estocagem a 4 °C.

Os bancos foram construídos utilizando-se as *E. coli* : XL1Blue MRF', CES 201 e C600. Seleção dos fagos com sondas kDNA.

O banco foi diluído e titulado, como descrito anteriormente, para escolha da diluição de trabalho, de forma que a quantidade de fago nas placas, durante o 1° seleção (screening) ficasse em torno de 5.000 – 10.000 pfu. Então, 2 a 5  $\mu$ L da diluição escolhida foram usadas para infectar 600  $\mu$ L de células, plaqueadas e incubadas conforme descrito na preparação do banco.

A seleção dos fagos foi feita pelo método radioativo, em membrana de Nylon BIODINE A (Pall Bio Support. East Hills, NY 11548) de acordo com a recomendação descrita no protocolo do fabricante da membrana. Resumidamente, na primeira etapa, as placas contendo os fagos foram incubadas a 4 °C por 30 min. Membranas esterilizadas foram, então, colocadas em contato com as placas de lise na superfície do top agar-NZY, e marcada a posição, para incubação por mais 1h à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram refrigeradas a 4 °C durante 15 min., para facilitar a remoção das membranas. Os fagos aderidos às membranas foram incubados por 5 min. em soluções de desnaturação (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), e de neutralização (0,5 M Tris-HCl pH7,4; 1,5 M NaCl), sendo o DNA fixado pela secagem ao

## MÉTODOS

---

ar e posterior incubação a 80 °C por 30 min. em forno a vácuo. Concluído o tratamento, as membranas foram pré-hibridadas, hibridadas, lavadas e expostas conforme descrito na sessão *Southern blot*.

Os plaques positivos foram extraídos da agarose por incubação com 500 µL tampão SM a temperatura ambiente, sob agitação de 225 rpm por 2 h, e submetidos a segunda etapa de isolamento. Nesta etapa os fagos foram diluídos e titulados para a obtenção de plaques mais isolados (200 a 600 placas de lise por placa), sendo que a diluição mais freqüente para a obtenção deste resultado foi a de 1:10 em tampão SM. 2 a 5 µL da diluição foram empregados na infecção de 200 µL das bactérias, que, por sua vez, foram incubadas e plaqueadas como descrito, visando nova seleção de positivos. Estas etapas foram repetidas até a confirmação do isolamento do fago selecionado.

### *c) PCR para a confirmação do enriquecimento promovido pela seleção.*

Foram retiradas alíquotas do banco total, e de plaques positivos obtidos da primeira e segunda etapa seleção, com a finalidade de confirmar o enriquecimento dos fagos contendo os segmentos kDNA-positivos. As alíquotas foram tituladas e diluídas de forma a conterem aproximadamente 10.000 pfus/µL. Em seguida, foram adicionados a cada 10 µL de amostra, 90 µL de H<sub>2</sub>O miliQ, para incubação a 70 °C por 1 h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o gelo e submetidas à centrifugação para a coleta do material condensado nas paredes do tubo.

Uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi utilizada nas reações de PCR com o par de iniciadores SK34/SK67 de acordo com protocolo descrito no item correspondente. Neste experimento foram empregados o tampão e a enzima *Taq*-polimerase da Pharmacia.

## **14. ABORDAGEM II - CONSTRUÇÃO DO BANCO ENRIQUECIDO EM PLASMÍDIO E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS POR SOUTHERN BLOT COM SONDA DE KDNA .**

A mesma preparação de bandas genômicas utilizadas no experimento anterior, de A11 e C4, foram ligadas aos plasmídios e transformadas nas diferentes hospedeiras, de acordo com a metodologia descrita em Clonagem e transformação. Os transformantes que apresentaram coloração branca foram palitados em duplicata para placas contendo NZY e ampicilina, e incubados durante a noite a 37 °C.

Os transformantes foram selecionados pela técnica de hibridação de colônia descrita em 1975 por Grunstein e Hogness (em SAMBROOK et al., 1989), adaptado para membranas de Nylon BIODINE

## MÉTODOS

---

A (Pall Bio Support. East Hills, NY 11548). O protocolo de transferência, fixação, pré-hibridação e lavagem foram idênticos ao descrito para a seleção de fagos.

Os bancos foram construídos nas hospedeiras: DH5 $\alpha$ MCR, XL1Blue MRF<sup>+</sup>, Sure Cells e CES201.

### 15. ABORDAGEM III – PCR INVERSA

A técnica de PCR inversa foi feita de acordo com protocolo apresentado por Ochman et al. (descrito em Innis et al., 1990). Em uma primeira etapa, o DNA genômico da linhagem subclonal C6, isolado da primeira partida de cultivo desta célula, foi digerido com a enzima *EcoR* I. Em seguida a banda 2,4 kb, positiva para kDNA, com aproximadamente 1 $\mu$ g de DNA, foi isolada em gel de agarose 1%. O material foi purificado, circularizado e novamente precipitado, de acordo com a recomendação do protocolo.

A PCR foi feita com os iniciadores SK35/SK36 de acordo com protocolo e programa padrão já descritos. As bandas superiores a 1,4 kb, visualizadas em gel de agarose 1%, foram ligadas ao vetor PCR II e transformadas na bactéria hospedeira DH5 $\alpha$  e INV $\alpha$ F<sup>+</sup>. Os clones positivos por hibridação de colônia, foram amplificados e tiveram os plasmídios extraídos por lise alcalina. O tamanho dos insertos foi determinado por digestão com a enzima *EcoR* I e visualização em gel de agarose 1%. Os dois maiores clones escolhidos aleatoriamente foram seqüenciados e analisados em banco de dados e com o auxílio do programa DNAmam.

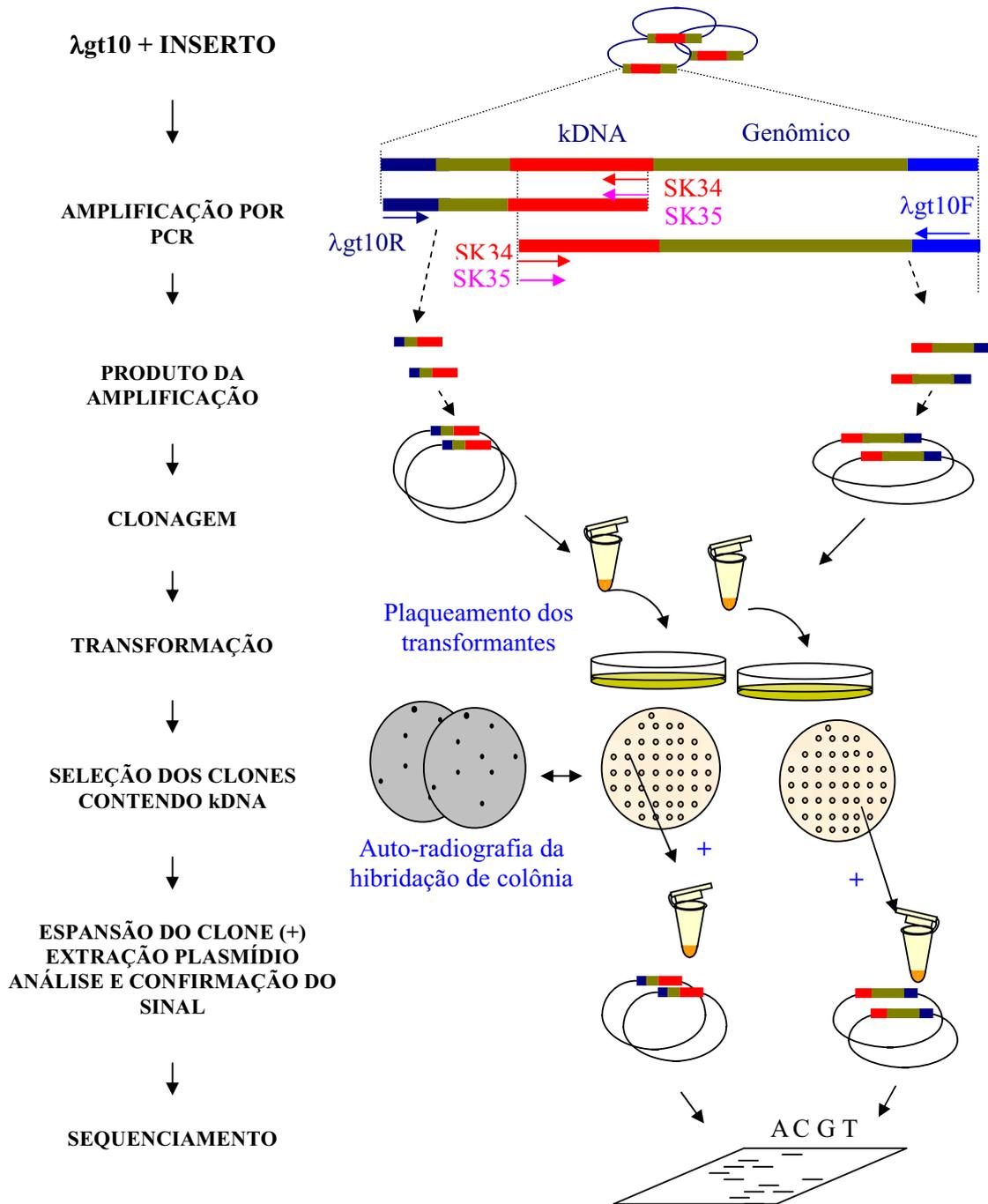
#### 16. ABORDAGEM IV - PRC COM INICIADORES DE KDNA EM ASSOCIAÇÃO COM INICIADORES DOS VETORES

A **Figura 3** mostra um resumo da estratégia experimental usada nesta abordagem para a obtenção do flanco de integração clonado em banco genômico construído no vetor  $\lambda$ gt10. Nas ampliações foram empregados os pares de os iniciadores: SK34/ $\lambda$  gt10R; SK34/ $\lambda$  gt10F; SK35/ $\lambda$  gt10R; SK35/ $\lambda$  gt10F. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do banco foi preparada com 90  $\mu$ L de água miliQ, conforme descrito na PCR quantitativa. Em cada tubo foram colocados 2  $\mu$ L da amostra, tampão, demais reagentes e *Taq*-polimerase da Pharmacia, para um volume final de 50  $\mu$ L, segundo descrito no item PCR. O programa empregado para os quatro sistemas de amplificação foi o *λgt10*. Os produtos amplificados foram clonados no vetor PCR2.1 e transformados na bactéria XL1BlueMRF'. A seleção foi feita por hibridação de colônia com sonda 122 (região conservada de kDNA). Os clones positivos foram amplificados, sendo feita a extração de plasmídios, a determinação do tamanho dos insertos clonados por análise em gel de agarose do produto da digestão dos clones com a enzima *EcoR* I, conforme protocolos já descritos. A confirmação da positividade dos insertos foi feita por *Southern blot* com as sondas de 122 pb e iniciadores internos às ampliações. Os clones foram seqüenciados como descrito anteriormente e submetidos análise.

#### 17. ABORDAGEM V - MÉTODO DE CAPTURA DO KDNA INTEGRADO NO DNA GENÔMICO.

O Método de Captura apresentado neste trabalho está baseado nos princípios da cromatografia de afinidade entre DNAs, onde uma sonda de DNA é ligada a uma superfície sólida (membrana de nylon) enquanto que a mistura de DNAs permanece em solução. Havendo complementaridade do DNA em solução com a sonda, ocorre a ligação entre os mesmos. A especificidade da ligação permite que somente o DNA complementar permaneça aderido a membrana, sendo as ligações inespecíficas removidas durante as lavagens com soluções de estringências crescentes.

A **Figura 4** mostra de forma esquemática a estratégia de captura. Em uma primeira etapa realizou-se a digestão do DNA genômico e a ligação do mesmo aos adaptadores (a); Em seguida, a sonda foi imobilizada na membrana de nylon (b); Depois se fez a hibridação do DNA com a sonda imobilizada (c). Nas etapas seguintes realizaram-se as lavagens e eluição do DNA específico (d).



**Figura 3.** Estratégia experimental empregada na obtenção e subclonagem dos segmentos híbridos kDNA/DNA hospedeiro. Amplificação do banco genômico construído no vetor  $\lambda$ gt10, por PCR, com iniciadores do vetor e da região conservada dos minicírculos.

## MÉTODOS

---

O material capturado foi amplificado por PCR a partir de iniciadores desenhados para anelar nos adaptadores (e). O DNA específico amplificado foi purificado em gel de acrilamida (f). Por último, foi feita clonagem e seqüenciamento (g).

Os adaptadores e iniciadores foram desenhados contendo múltiplos sítios de clonagem múltiplos, e foram testados quanto à especificidade de anelamento. A síntese dos adaptadores foi realizada no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas - UnB, com eficiência superior a 90% (GENE Assembler Special - Pharmacia), sendo posteriormente purificados em coluna NAP, de acordo com a orientação do fabricante. A qualidade dos oligonucleotídios foi confirmada em gel de acrilamida-TBE conforme protocolo em SAMBROOK et al. (1989).

### 17.1 - Padronização da ligação dos adaptadores ao DNA

Em uma primeira etapa, foram testados 4 tipos de abordagem para a ligação dos adaptadores ao DNA genômico digerido, que diferiam quanto à forma de realizar a defosforilação, se do adaptador ou do DNA genômico, se do genômico se havia diferença se a defosforilação fosse realizada na banda isolada ou no DNA total digerido. Assim foram montados os seguintes experimentos: 1) remoção do fósforo terminal dos fragmentos digeridos de DNA genômico, seguindo-se o anelamento e ligação dos adaptadores aos fragmentos genômicos, eletroforese em gel de agarose e isolamento da região kDNA-positiva; 2) remoção do fósforo terminal dos fragmentos de DNA genômico digeridos, isolamento da região kDNA-positiva; anelamento e ligação dos adaptadores ao DNA; 3) remoção do fósforo terminal dos adaptadores, ligação ao DNA genômico digerido, isolamento da região kDNA-positiva; 4) isolamento da região kDNA-positiva, ligação dos adaptadores defosforilados.

O tratamento com a fosfatase alcalina foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante da enzima, em função do cálculo estimado do número de extremidades de segmentos de DNA. Nestes experimentos foram utilizadas 10 µg de DNA genômico obtidos da terceira e quarta partida de cultivo da linhagem subclonal A11, digeridos com a enzima *EcoR* I. A relação molar de ligação ao adaptador foi de 1 de DNA para 100 de adaptador. A eficiência e qualidade da ligação dos sistemas foram monitoradas pela presença de sinal de hibridação com a sonda do adaptador e pela capacidade de recuperação do sinal kDNA-positivo, por *Southern blot*, após a amplificação de uma alíquota do material com os iniciadores dos adaptadores.

## MÉTODOS

---

O resultado deste teste permitiu estabelecer o procedimento a seguir, adotado em todas as capturas.

### **17.2 - Tratamento dos adaptadores com fosfatase alcalina e anelamento.**

As fitas complementares de cada adaptador foram misturadas a razão molar de 1:1 em um tubo microcentrífuga de 1,5 mL. Aproximadamente 10 µg da mistura foram tratadas com fosfatase alcalina, de acordo com o protocolo do fabricante da enzima (CIAP-Pharmacia). Após o período de incubação, foi acrescentado tampão de anelamento (1 M Tris-HCl pH 7,6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, e 160 mM de DTT, Pharmacia), na proporção de 1 µL do tampão para cada 6 µL da reação. O tubo foi transferido imediatamente para um Becker contendo 1,5 l de água fervente e deixada esfriar até a temperatura ambiente. O tempo de esfriamento da água foi suficiente para inativar CIAP e promover o anelamento do iniciador.

### **17.3 - Ligação do adaptador ao DNA digerido**

O DNA digerido com a enzima apropriada foi ligado ao adaptador de acordo com o protocolo padrão descrito anteriormente. A proporção do número de extremidades das moléculas DNA/adaptador no sistema de ligação foi otimizado para a relação molar de 1:100 a 1:1000.

### **17.4 - Imobilização da sonda em membrana de “nylon” por “dot blot”**

Foram testados dois protocolos de imobilização de DNAs em membranas de nylon. No primeiro as membranas Biodine B foram imersas na solução contendo o DNA, e levadas a secar a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram colocadas sobre papel de filtro com 0,4 M de NaOH, por 5 min. e transferidas para SSC 2X onde foram incubadas por mais 2 min. e novamente secas. No segundo, o DNA foi desnaturado por fervura e levado ao gelo, antes de ser transferido para as membranas.

### **17.5 - Experimento piloto**

Foi escolhido para este teste o clone 1C6, resultado da clonagem no vetor PCRII de uma seqüência de minicírculo de kDNA de 600 pb. Este clone foi escolhido por apresentar na sua estrutura a região conservada 122 pb. Este piloto teve como objetivo verificar a especificidade da captura do kDNA na mistura inserto/plasmídeo, tendo como sonda a região 122 pb.

Deste modo, 2 µg dos vetores contendo as seqüências 122 e 600 pb foram digeridos com *EcoR* I separadamente. As seqüências 122 pb foram isoladas do gel de agarose por QIAEx e imobilizadas em 8

## MÉTODOS

---

cm<sup>2</sup> da membrana BIODINE B pelo método alcalino de dot blot. A membrana foi cortada em 8 pedaços de 1 cm<sup>2</sup>.

Já a mistura de digestão do vetor, contendo o segmento 600 pb, foi dividida em duas alíquotas de 1 µg cada. Uma das alíquotas foi aplicada no gel de agarose para o isolamento, por QIAEx, do fragmento 600 pb liberado e do plasmídeo vazio. Adaptadores foram ligados aos extremos dos DNAs isolados por QIAEx e às extremidades dos DNAs da outra alíquota.

Para o monitoramento da hibridação, os segmentos ligados aos adaptadores tiveram as extremidades radio marcadas com 3 µL de  $\gamma\text{P}^{32}$ , e 10 U de PNK, para um volume final de 50 µL incubados por 1 hora a 37°C. Enquanto transcorria a marcação, as membranas foram incubadas com a solução de PEG descrita no item *Southern blot*, a 65 °C por 1 hora. Após esta etapa de pré-hibridação, acrescentou-se o DNA marcado e fervido por 5 min. à solução e o material foi hibridado durante a noite a 64 °C.

No dia seguinte a solução foi coletada e as membranas lavadas conforme segue: 1) lavagem com 100 volumes de SSC 2X e SDS 0,1% /cm<sup>2</sup> de membrana, por 15 min. a temperatura ambiente, sendo a solução posteriormente descartada; 2) lavagem com 1 volume de SSC 2 X e SDS 0,1% /cm<sup>2</sup> de membrana, por 30 min., a temperatura ambiente; 3) lavagem com 1 volume de SSC 1 X e SDS 0,1% /cm<sup>2</sup> de membrana por 30 min. a 64 °C; 4) lavagem com 1 volume de SSC 0,1 X e SDS 0,1% /cm<sup>2</sup> de membrana, por 1 hora a 64 °C; 5) lavagem com 1 volume de água miliQ /cm<sup>2</sup> de membrana, por 1 hora a 64 °C. As soluções colhidas nas etapas 2 a 5 foram concentradas individualmente em centricon 100 (blue), conforme protocolo do fabricante. As amostras foram, em seguida, lavadas com 2,5 mL com água miliQ, para remover o excesso de sal, e coletadas em tubo de microcentrífuga. O material foi mais uma vez concentrado em “speed vac”, a 37 °C, até o volume de 20 µL, o que em média era alcançado após 40 min. de tratamento. 2 µL de cada material capturado foram empregados na amplificação com iniciadores do adaptador, de acordo com o protocolo padrão para PCR, utilizando-se as enzimas e tampão da Pharmacia. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1%, transferidas para membrana de Nylon Biodine B, e hibridadas com a sonda 122 pb marcada radioativamente por random iniciador.

### 17.6 - Nível de detecção

Com a finalidade de se verificar o nível de detecção da técnica, 5 ng, 50 ng, 500 ng, e 5.000 ng de DNA genômico de *T. cruzi* do estoque Berenice foram digeridos com a enzima *Pst* I e ligados com o adaptador compatível. Foram imobilizados na superfície de 9 cm<sup>2</sup> de membrana, 50 ng /cm<sup>2</sup> de segmentos de 250 pb de cDNA, provenientes do gene Fosforilase, presente em cópia única no genoma do protozoário, gentilmente cedido pelo prof. Jaime Martins Santana Membranas. Estes DNAs foram hibridados, conforme descrito anteriormente. As membranas foram lavadas, inicialmente com SSC 2X a temperatura ambiente, por 15 min., e transferidas diretamente para SSC 0,1 X e SDS 0,1%, a 64 °C por 60 min. Por último, foram lavadas com água miliQ a 64 °C por 60 min. As soluções foram concentradas como anteriormente, e analisada por PCR e *Southern blot*.

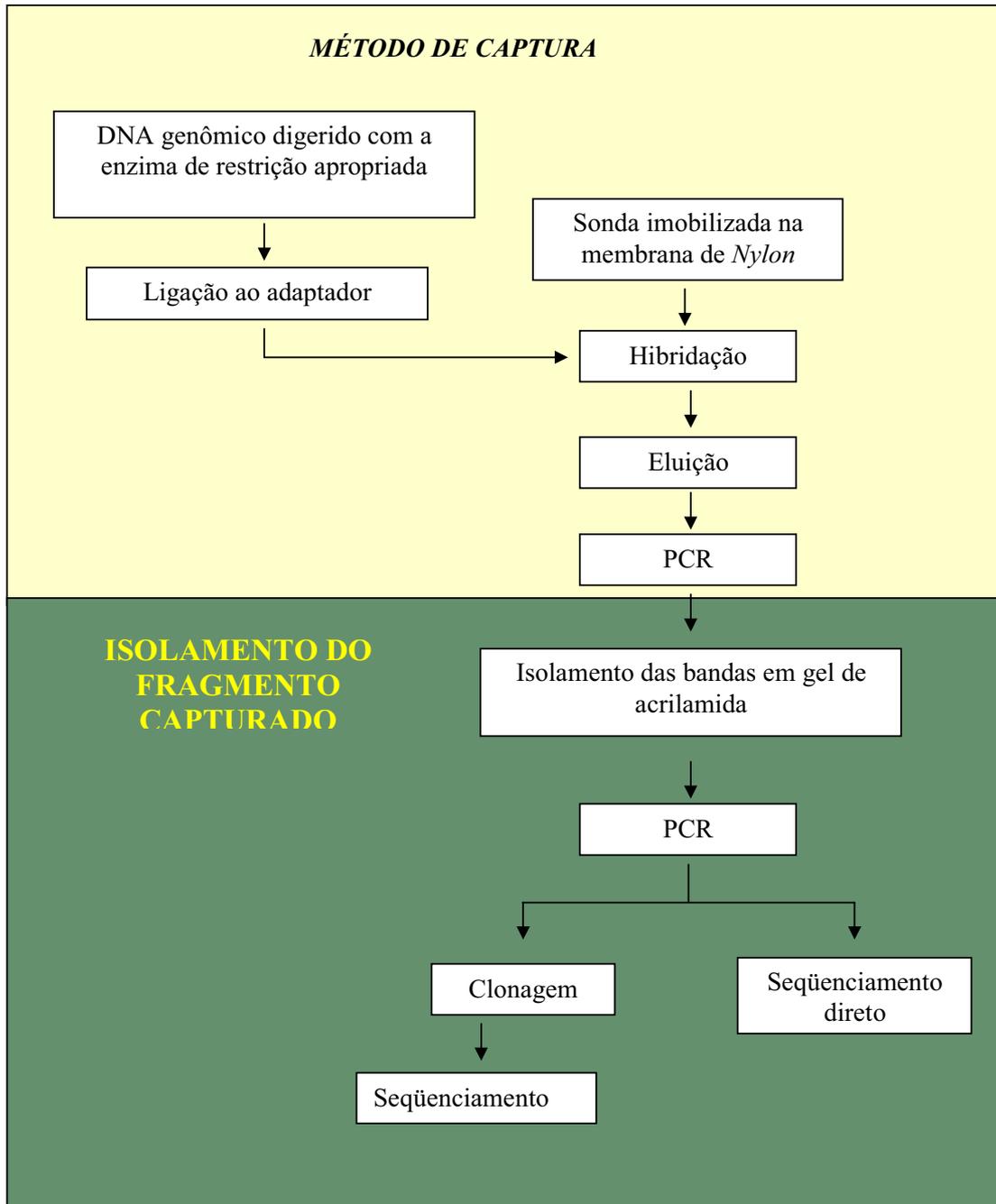
### 17.7 - Captura a partir do DNA do clone celular A11

Foram realizados dois tipos de capturas, o primeiro, a partir do DNA genômico total, obtido da quarta partida de cultivo da linhagem subclonal A11, digerido com a enzima *EcoR* I e ligado ao adaptador; o segundo a partir da região 1 a 3 kb kDNA positiva, isolada do mesmo DNA genômico digerido com a mesma enzima, igualmente com o adaptador. Em ambos os casos, foram empregados 10 µg dos DNAs na hibridação de 18 cm<sup>2</sup> de membranas, sobre a qual foram imobilizados 50 ng/cm<sup>2</sup> de kDNA digerido com *EcoR* I, incubadas como descrito anteriormente.

As membranas foram lavadas conforme de acordo com o experimento piloto, sendo colhidas as soluções: 1) 2a lavagem com SSC 2X e SDS 0,1%; 2) SSC 0,1X e SDS 0,1%, a 64 °C por 15 min., 3) água miliQ, durante 1 h. Foram também coletadas as soluções provenientes da incubação: 4) com água miliQ, durante a noite; 5) formamida (110 mL de formamida, 20 mL 20X SSPE, 10 mL 20% SDS, 60 mL ddH<sub>2</sub>O) 1 volume/cm<sup>2</sup> de membrana 70 °C por 1 h. Da mesma forma que das vezes anteriores, o material foi concentrado para 20 µL, sendo 2 µL usados nas amplificações com iniciador do adaptador. Foram testados os sistemas de PCRs: com a enzima Tth (programa Xcla), com as enzimas Taq-polimerase CenBio e Pharmacia (programa kDNA), conforme protocolos de cada enzima. O resultado foi analisado com sondas de kDNA radio marcadas.

A região de 1 a 3 kb do produto de amplificação do DNA genômico enriquecido, provenientes da coleta em H<sub>2</sub>O, foi isolada e submetida à nova amplificação com iniciadores do adaptador. As bandas da região 1 kb foram, então, radio marcadas pelo protocolo  $\gamma$ ATP, como descrito anteriormente, purificadas

em gel de acrilamida, e novamente amplificadas com os iniciadores do adaptador. Cada banda isolada a partir deste gel, foi analisada por *Southern blot* com sonda de kDNA, e re-isolada do gel de agarose, para



**Figura 4.** Etapas experimentais realizadas para a captura e isolamento da região de integração do kDNA no genoma hospedeiro murino para clonagem e seqüenciamento.

## MÉTODOS

---

clonagem no vetor PCR 2.1. Após a transformação da hospedeira DH5 $\alpha$ MCR, foram isolados os plasmídios de 6 a 18 clones provenientes de cada uma das bandas. O tamanho dos insertos liberados dos plasmídios pela digestão enzimática com a enzima *EcoR* I, foi determinado por análise em gel de agarose 1%. Os clones foram seqüenciados de acordo com protocolo padrão, e as seqüências fornecidas comparadas às demais já obtidas e analisadas em banco de dados.

### **17.8 - Captura da banda de 7 kb contendo kDNA, a partir da digestão do clone A11 com *Cla* I**

O DNA genômico da quarta partida de cultivo da linhagem subclonal A11, digerido com *Cla* I, foi ligado ao adaptador *Lcla*, conforme descrito anteriormente. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose. Em seguida a região correspondente à faixa de peso molecular de 6,5 a 7,5 kb, positiva em *Southern blot* com sonda de kDNA, foi isolada com o auxílio do kit QIAEx. A banda foi eluída num volume final de 20  $\mu$ L em água. Foi realizada uma amplificação por PCR do kDNA integrado, com a finalidade de confirmar a presença de kDNA no material eluído. Para tanto foram utilizados 2  $\mu$ L do eluído no QIAEx da banda positiva, e também das bandas negativas desta digestão e os iniciadores SK34 e SK 67 de minicírculo de kDNA, sendo utilizado como controle negativo da amplificação o do DNA de macrófago normal.

Confirmada a presença do minicírculo de kDNA na região coletada, os 18  $\mu$ L restantes da eluição foram utilizados na estratégia de captura, onde foram empregados 18 cm<sup>2</sup> de membrana contendo 50ng/cm<sup>2</sup> de kDNA imobiliza na hibridação.

Como descrito anteriormente, o DNA capturado foi concentrado e 2  $\mu$ L da captura foram utilizadas na amplificação com o iniciador do adaptador. Os produtos amplificados foram transferidos para membrana, visando à análise por *Southern blot*, com sonda de kDNA.

Outros 10  $\mu$ L da captura foram separados em gel de agarose 1%. As regiões menores e maiores que 3 kb foram isoladas por QIAEx, digeridos com a enzima *Taq* I (para cortar também dentro da região conservada do kDNA) e ligados a 100 ng do adaptador o *Mcl*a. O volume final foi ajustado para 15  $\mu$ L. Após a incubação de 48h a 4°C, o volume foi elevado para 500  $\mu$ L com água miliQ para remoção do excesso de adaptador em microcon 100®. A mistura foi então concentrada para 10  $\mu$ L em speed vac (aproximadamente 37° por 40 min.). Realizada nova PCR neste material com o par de iniciadores dos adaptadores *Lcla* e *Mcl*a, e as enzimas *Tth* e *Taq*-polimerase CenBio. O mesmo procedimento de

## MÉTODOS

---

isolamento das bandas maiores e menores a 3 kb, seguido de ligação do segundo adaptador, purificação e amplificação por PCR foi feito com o 5 µL (aproximadamente 50 ng) do produto amplificado da captura em H<sub>2</sub>O, para controle positivo das etapas.

### 18. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQÜÊNCIAS CLONADAS

Os insertos seqüenciados foram analisados pelo programa DNAMAN quanto ao número de bases, seqüências repetitivas diretas, invertidas, formação de alças e proporção das bases nitrogenadas na molécula. Pelo mesmo programa, as seqüências foram comparadas entre si, compondo um banco de dados próprio, que continha também seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* (STURM et al., 1989; acessos, X04680; U38184; M18815; M18816; M19176; M19179; X56188), regiões *Alu* (R88864; T99987; W01741; M21251; J04070), provenientes de bancos de dados e da literatura. Utilizou-se também para a comparação de seqüências clustal w (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Os segmentos também foram comparados às seqüências depositadas em banco de dados do sistema BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os clones foram analisados em partes e como um todo, de forma a identificar regiões com menor e maior significância em relação aos segmentos depositados.

Seqüências regulatórias foram analisadas pelo programa signal scan: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>; Para as análises de conformação espacial dos segmentos de DNA utilizou-se os programas: a) Presença de curvaturas e dobramentos: [http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/bend\\_it.html](http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/bend_it.html). b) Visualização da conformação: [http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/plot\\_it.html](http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/plot_it.html) e [http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/model\\_it.html](http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/model_it.html).

### 19. ANÁLISE DO SEGMENTO B7

#### 19.1 - Anotação genômica complementar

Além das análises “in silico” descritas no tópico 19, verificou-se no segmento B7 a presença de fases abertas de leitura, similaridades com seqüências de regiões promotoras e presença de regiões regulatórias da expressão gênica. O estudo foi realizado com o auxílio dos programas *ORF Search*, *Sequence Scan*, *Promoter Scan*, e *Signal Scan*, respectivamente.

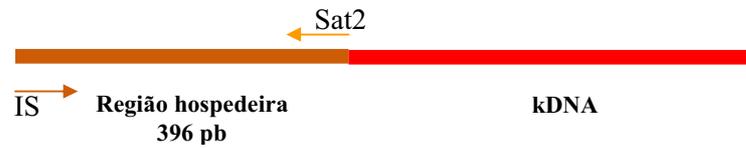
### 19.2 - Confirmação da integração

Foram desenhados 2 iniciadores, IS e S2 localizados nos flancos da região murina do clone B7. Estes iniciadores foram empregados nas ampliações de 100 ng dos DNAs genômico intactos provenientes das células de macrófagos normais, subclone A11 (segunda, terceira, e quarta, partida de cultivo e isolamento) e de *T. cruzi* cepa Berenice, conforme a estratégia experimental mostrada na Figura 5.

### 20. IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DAS REGIÕES DE 50 A 80 PB OBSERVADAS INTERCALANDO AS REGIÕES CONSERVADAS DE MINICÍRCULO

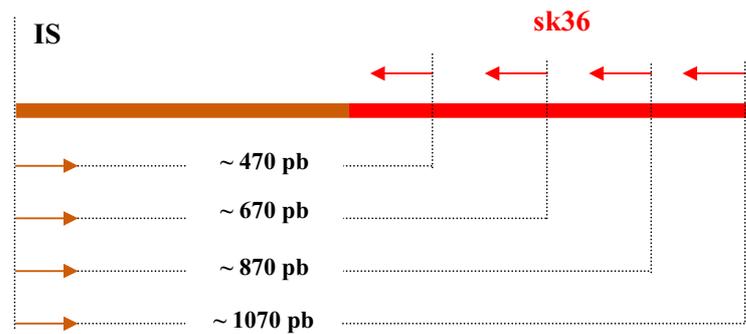
A **Figura 6** mostra a estratégia experimental usada para a obtenção da sonda da região 50 pb, observada nos clones de kDNA recuperados dos diferentes macrófagos, e da região 80 pb, atribuídas à região variável de minicírculos de kDNA. Primeiramente foram desenhados os iniciadores em orientações invertidas das regiões terminais do segmento 50 pb, *TcVa* e *TcVs*, sendo o mesmo realizado para a região 80 pb, (iniciadores *C6.80a* e *C6.80s*). Paralelamente, foram isolados os insertos que continham a região variável de 50 pb e 80 pb respectivamente dos plasmídios 1C6 e 2C6. Para tanto 500 ng dos plasmídios foram digerido com a enzima de restrição *EcoR* I de acordo com as especificações do fabricante. A mistura plasmídeo inserto foi submetida à separação eletroforética em gel de agarose 1,0%. As bandas correspondentes aos insertos foram isoladas do gel de agarose e os DNAs purificados pelo sistema QIAEx, de acordo com protocolo do fabricante. Em torno de 100 ng de insertos foram digeridos com a enzima *Taq* I, que corta no final da região conservada. Os fragmentos foram diluídos para a concentração de 0,001 ng, e usados nas reações da PCR (2 µL da solução diluída para 50 µL de mistura de final de reação). Após a amplificação, 1/3 do volume da PCR foi aplicado em gel de agarose 2%. Os fragmentos de tamanho esperado foram isolados por QIAEx. Aproximadamente 2 ng dos isolados foram empregados na marcação radioativa por PCR, onde também os iniciadores estavam previamente marcados com  $\gamma\text{P}^{32}$ . As sondas foram utilizadas em *Southern blot* com membranas contendo 50 µg de DNA de macrófago normal e 7µg de kDNA de *T. cruzi*, ambos digeridos com *EcoR* I. A hibridação também foi repetida somente com os iniciadores marcados. As membranas foram expostas por um prazo de até 3 e 30 dias, para garantia da especificidade do sinal.

**A) Amplificação da região hospedeira com os iniciadores IS/Sat2**



Resultado esperado	DNA normal	A11	<i>T. cruzi</i>
PCR IS/Sat2	+	+	-
<i>Southern blot</i> com sonda da região hospedeira 396	+	+	-

**B) Amplificação da Região Híbrida iniciadores IS/ sk36**



Resultado esperado	DNA normal	A11	<i>T. cruzi</i>
PCR IS/SK36	-	+	-
<i>Southern blot</i> com sonda hospedeira 396, e sonda 122 região conservada de minicírculo de kDNA	-	+	-

**Figura 5.** Estratégia experimental para a confirmação da presença da região de integração no clone celular A11, através da amplificação por PCR do DNA hospedeiro normal, clone celular A11, e *T. cruzi*. A) tamanho esperado da sequência amplificada com os iniciadores IS / S2; B) tamanho esperado da amplificação com o iniciador hospedeiro IS e de kDNA sk36.

## **21. VERIFICAÇÃO DO TAMANHO DA REGIÃO VARIÁVEL 50 PB ANTES DA INTEGRAÇÃO.**

### **21.1 Construção do Banco de kDNA e seleção do clone portador da região**

Uma alíquota contendo 1 ug de kDNA foi digerida com a enzima de restrição *EcoR* I. O produto digerido foi ligado ao fago  $\lambda$ gt10 e empacotado, conforme orientação do fabricante. As partículas virais foram utilizadas na infecção das hospedeiras XL1BlueMRF' e CES201. As placas de lise foram transferidas para a membrana de Nylon Biodine A para a realização da hibridação de colônia com a sonda TcVA (sonda de 20 mer desenhada para anelar com a seqüência 50 pb, das regiões variáveis dos minicírculo de kDNAs recuperados das regiões de integração).

Foram analisadas aproximadamente 600.000 placas de lise de cada banco sendo coletados plaques com sinal positivo de hibridação somente na hospedeira XL1BlueMRF'. A exemplo do ocorrido com a clonagem da região de integração houve perda da positividade das 14 placas de lise selecionadas e aumento significativo de fagos sem inserto durante o processo de enriquecimento.

### **21.2 - Captura e clonagem dos minicírculos de kDNA com a seqüência 50 pb**

Para a captura dos minicírculos de kDNA portadores da região variável 50 pb foram utilizados um total de 18 cm<sup>2</sup> de membrana contendo 150 ng/cm<sup>2</sup> do iniciador TcVA. Esta membrana foi hibridizada com 1µg de kDNA digerido com a enzima *EcoR* I e ligado ao adaptador Eco, de acordo com protocolo padrão descrito anteriormente. As diferentes lavagens foram coletadas, concentradas, amplificadas com iniciador do adaptador, e hibridizadas por Southern blot com o TcVA marcado radioativamente. Depois de confirmada a presença do sinal positivo com a sonda TcVA no kDNA capturado, o produto foi clonado no vetor PCR 2.1 e utilizado para transformar a bactéria hospedeira DH5 $\alpha$ , conforme protocolos descritos anteriormente. Foram analisados 360 transformantes por hibridação de colônia com a sonda TcVA, .

### **21.3 - Amplificação da região variável 50 pb do kDNA**

Os iniciadores TcVA e TcVS foram utilizados para estimar o tamanho da região variável do minicírculo antes da integração. Para tanto 100 pg de kDNA do estoque Berenice foram amplificados pelo programa kDNA, com *Taq*-polimerase da Pharmacia de acordo com recomendações do fabricante. O produto foi hibridado com os iniciadores TcVa, e SK35. Este produto também foi clonado no vetor PCR 2.1, na hospedeira DH5 $\alpha$ .

## **22. PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO CLONE B7 EM GEL DE AGAROSE E ACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE**

O segmento B7 foi liberado do vetor pela digestão com as enzimas *EcoR* I e/ou *Not* I realizadas segundo recomendação dos fabricantes. Alternativamente, o mesmo inserto foi obtido pela amplificação com iniciadores do adaptador, conforme protocolo padrão. Após isolamento em gel de agarose por QIAEx, os fragmentos obtidos por PCR foram submetidos a uma etapa adicional de restrição com as enzimas citadas, e eletroforese em gel de agarose para reisolamento, com a finalidade de eliminar eventual contaminação com o plasmídeo. Estes insertos foram novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e transferidos para a realização de *Southern blot* com sonda de kDNA, de como descrito anteriormente. Os insertos repurificados também foram analisados em gel não desnaturante de acrilamida-TBE 5%, corado com prata posteriormente a eletroforese a 600 V/50 min. a 4 °C sistema horizontal LKB (em Sambroock, 1989).

## **23. COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DE MINICÍRCULOS DE kDNA DEPOSITADAS EM BANCO DE DADOS.**

Os minicírculos de kDNA obtidos dos bancos de dados do sistema BLAST, foram analisados pelo programa DNAmam. Foi identificada cada uma das seqüências das regiões variáveis, que por sua vez, compuseram arquivos individuais, analisados quanto à proporção entre de bases. Os resultados foram comparados à mesma análise realizada dos segmentos obtidos dos das regiões de integração.

## **24. NORTHERN BLOT E RT PCR PARA A ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO PRODUTO DE kDNA INTEGRADO**

O RNA total do clone celular A11 foi extraído com o reagente Trizol (Gibco) de acordo o protocolo do fabricante. A RT-PCR foi feita com o iniciador poli-A em combinação com os iniciadores IS, Sat2, MA, SK35, SK36, SK34, de acordo com protocolo descrito SAMBROOK (1989), tendo como controle a amplificação da  $\beta$ -actina murina com o iniciador M $\beta$ Aa/ $\beta$ As.

## **25. SUBCLONAGEM DA FASE DE LEITURA 2 (ORF2) EM VETOR DE EXPRESSÃO PGEX4T3**

A ORF2 foi obtida pela amplificação do clone B7 com os iniciadores MA e SK36, e clonagem em vetor PCR 2.1 em DH5 $\alpha$ . Selecionou-se os transformantes que continham a banda de 450 pb. Esta região compreende toda a ORF mais uma pequena região supostamente não traduzida em ambos os flancos.

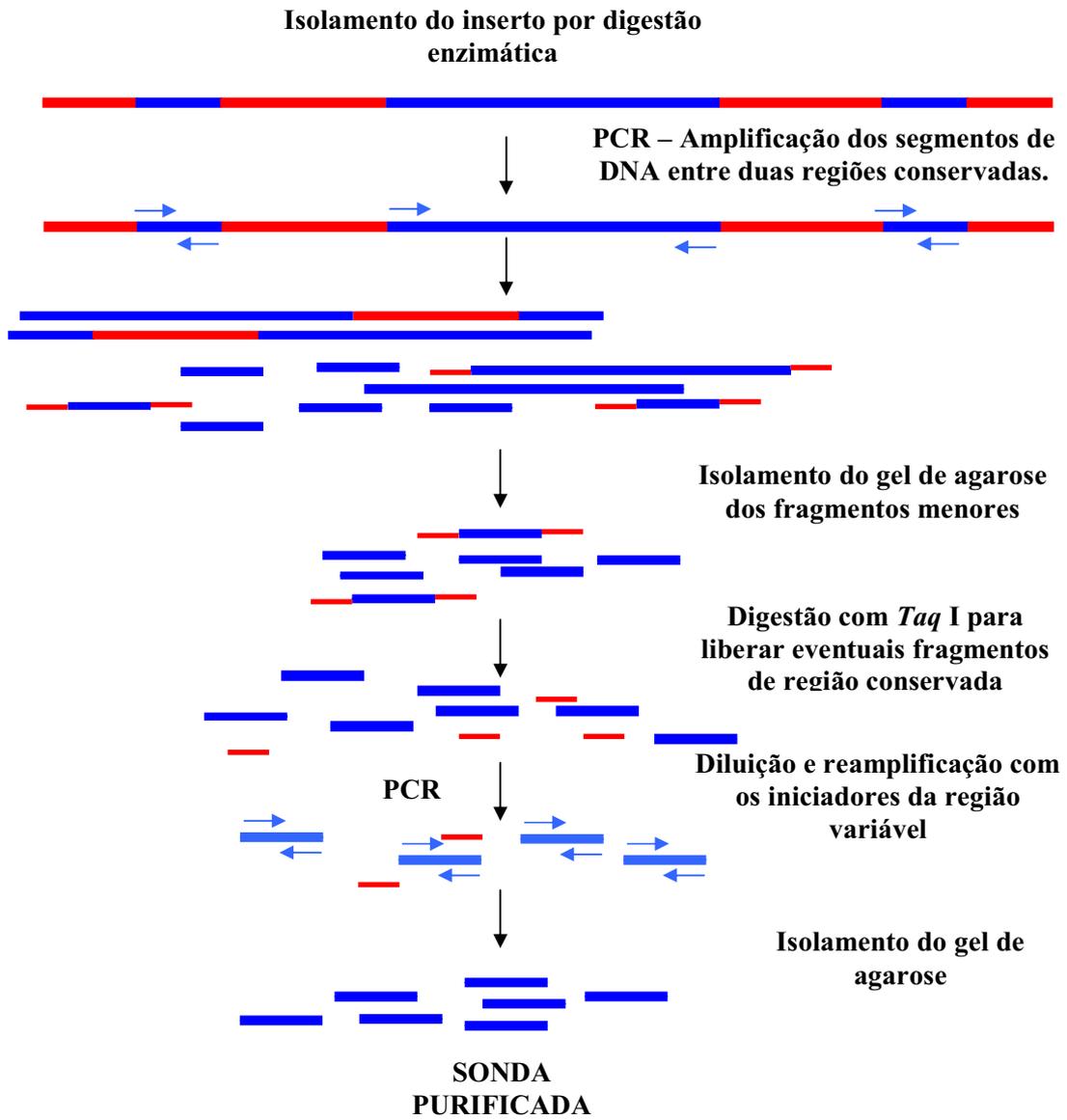
## MÉTODOS

---

O clone foi digerido com a enzima *EcoR* I e o inserto transferido para o mesmo sítio no vetor pGEX4T3. Foram analisados 65 transformantes, por análise de restrição com a enzima *Nsi* I/*Bam* H, para determinar a orientação do inserto no vetor. Em 20 dos casos, as análises foram feitas também por PCR com os iniciadores do vetor e inserto, e, em 4 casos, os insertos foram seqüenciados por uma das extremidades.

### **26. SUBCLONAGEM DA FASE DE LEITURA 2 (ORF2) EM VETOR DE EXPRESSÃO pPIC9 DE LEVEDURA.**

Foram desenhados 4 oligonucleotídeos (iniciadores 1, 2, 3 e 4), que amplificaram o clone B7 a partir do código de iniciação da tradução da ORF 2 em conjunto com o iniciador o SK36, conforme protocolo padrão, e programa kDNA. Deste modo, foram obtidos quatro tipos de seqüências, que diferiam quanto às fases de leitura e presença do sinal de início da tradução. Os produtos correspondentes ao menor segmento contendo a ORF 2 de cada amplificação, foram isolados do gel de agarose 2%, por QIAEx. Após 48 h, os segmentos foram quantificados e ligados a 200 ng do vetor de expressão pPIC9, previamente digerido com a enzima *Sna* I e tratado com fosfatase alcalina, de acordo com os protocolos descritos anteriormente. Metade de cada mistura de ligação foi individualmente empregada para transformar as células competentes XL1gold, apropriadas para amplificar este tipo de vetor, e outra metade para transformar a DH5 $\alpha$ . A presença e orientação dos insertos clonados foram determinadas pela amplificação por PCR com iniciadores da subclonagem e do vetor.

**ESTRATÉGIA**

**Figura 6.** Estratégia experimental empregada no isolamento das regiões 50 pb do clone 1C6, 80 pb e do clone 2C6. Setas azuis indicam a direção das amplificações realizadas com os iniciadores TcVa/TcVs, Clone 1C6, e C6.80a/C6.80s no Clone 2C6.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. CLONES COM SEQÜÊNCIAS DE MINICÍRCULO DE KDNA E ELEMENTO LINE-1 OBTIDAS POR AMPLIFICAÇÃO COM INICIADORES SK36

A amplificação de integrações contíguas com iniciadores da região conservada de minicírculos resultou em cinco clones que quando usados como sonda geraram sinais de hibridação positivos por *Southern blot* em DNAs de macrófago humano normal e de *T. cruzi*. Dois dos clones, “A” e “B”, foram apresentados por Argañaraz (1996) e os demais, “C”, “D” e “E” compõem o presente trabalho de tese (**Figura 7**). Os insertos apresentaram tamanho entre 300 a 1100 pb, e mostraram a presença dos iniciadores da região conservada do minicírculo invertidos e complementares entre si nas extremidades, seguidos de 5 a 9 bases correspondentes ao final da região conservada (**Figura 7 e 8**). Subseqüente a estas bases, em pelo menos um dos flancos, verificou-se uma desproporção entre purinas e pirimidinas entre as fitas de DNA, o que é sugestivo da presença de conformação não B. Parte dos resultados foi apresentada na publicação em anexo.

Os clones C, D, e E apresentaram seqüências de elemento repetitivo LINE-1. O clone E mostrou 93% com de identidade entre as bases 17 e 350 com a fita positiva do acesso do genbank ref|NW\_925351.1|HsCraAADB02\_460, e 89% entre as bases 349 a 981 com a fita positiva do acesso ref|NW\_921918.1|HsCraAADB02\_151, pertencentes aos cromossomos 4 e 12, respectivamente. As bases 331 a 1040 apresentam similaridade de 82% com o LINE-1 do clone HUMCL1 bases 4903-5585 (acesso gbIL19088I). Seguiu-se a esta região um segmento com identidade não significativa em relação às seqüências depositadas nos bancos de dados.

As seqüências C e D apresentaram identidade aproximada de 90% em comparação ao clone A, descrito por Argañaraz (1996). Estas seqüências foram agrupadas e analisadas conjuntamente e o agrupamento foi denominado de seqüências do grupo A. Neste grupo, subseqüente ao final da região conservada (**Figura 7**) verificou-se a presença de aproximadamente 340 pb com identidade de 70 a 90 % com a região 3611 a 3954 pb (gbIL19088I) do elemento LINE-1, um microsatélite com repetições do tipo satélite III (clone hssat13, acesso gbIX82942I) e uma região com identidade não definida na análise de similaridade com segmentos depositados nos bancos de dados, cuja origem foi atribuída à região variável do minicírculo integrado.

### 1.1 Confirmação da origem híbrida humana/*Trypanosoma cruzi* dos clones pertencentes ao grupo A.

As análises dos DNAs de macrófagos normais e de *T. cruzi* com as sondas: LINE-1 (L1A), de região de microssatélite humano (MAS) e da suposta região hipervariável de minicírculo (HVA) (**Figura 8**) obtidas pela estratégia experimental apresentada na **Figura 1** confirmou a origem híbrida dos clones do grupo A. A região LINE-1 estava presente em múltiplas cópias no DNA do macrófago humano e ausentes no *T. cruzi*. Os dois genomas continham a seqüência de microssatélite e que a região com identidade desconhecida estava presente somente no *T. cruzi*, com provável origem em uma região hipervariável de minicírculo de kDNA.

## 2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DE INTEGRAÇÃO COM OS INICIADORES DE LINE-1 E DE MINICÍRCULO DE KDNA

As amplificações das regiões de integração presentes nos macrófagos infectados e tratados e linhagens clonais A e G (Argañaraz, 1996), segundo estratégia detalhada na Figura 2 (2a, b, c, d) e hibridação por *Southern blot* com as sondas: de LINE-1 (*M6a1*, *LIRTa1*, *LIRTa2* e *LIRTs1*,) e kDNA (*SK35* e *SK36*) geraram fragmentos. Contudo somente os segmentos provenientes do DNA infectado e tratado amplificado com o par de iniciadores *SK35/LIRTa1* apresentaram sinal positivo de hibridação por *Southern blot* com a sonda interna, *SK36* (**Figura 9**). O resultado sugere a presença de pelo menos uma região conservada de minicírculo de kDNA no produto amplificado. Este mesmo segmento apresentou sinal positivo de hibridação obtido com a sonda do iniciador *LIRTa1* indicando a presença de um flanco humano. As bandas positivas obtidas da amplificação, isoladas do gel de agarose e clonadas no vetor PCRII na hospedeira bactéria INV $\alpha$ F', contrariamente ao esperado, não geraram colônias com insertos positivos para kDNA em *Southern blot*, em 1000 transformantes analisados.

A mesma estratégia repetida com as amostras de DNA de sangue obtidas de pacientes chagásicos, gentilmente cedidas por Socorro Braga, não geraram sinal de amplificação com os iniciadores *SK35*, *SK36* e *L1hinf*. Contudo, o par de iniciadores *SK36* e *M6a1* produziu segmentos positivos com a sonda de minicírculo 122 pb (**Figura 10**). A clonagem destas bandas em DH5 $\alpha$  e CES201, gerou seqüências que não apresentaram características atribuíveis a minicírculos de kDNA ou a LINE-1. Frente ao resultado sugestivo de instabilidade dos insertos clonados, realizou-se nova abordagem para a clonagem das regiões híbridas. Optou-se, portanto pela construção e seleção de bancos genômico enriquecidos da integração, elaborados em diferentes vetores e bactérias hospedeiras.

## RESULTADOS

## Clone A: 638 bp;

```

1      GTTTCGATTG GGTTGGTGTA ATTAGGAGGA GTTGAGTGGG AGGGAAATGG AGTTGAGTGA AGGATGGAAT
71     GGAATGAGAT GGAATGGAAT GGAATGGAAT GGAATGGAAT GGAATGGAAT GGAATGGAAT GAAAGGAGTG
141    GAGTGGAGTG GGAGTGGAGT GGATTCGAAA TCCTCAATAA AACTACTACCA AACCGAATCC AGCAGCAAAAT
211    CAAAGCTTAT CCACCATGAT CCAAATGGGC TGCATCCTGG ATGCAGGATG CAGCTGTAC ATCACATCTC
281    ACATAATCAG CCATTCNNA TCAAACCCAC GTCCAAAAC CAATGATATG TCAATGATGC AGAAAGCCTT
351    TTGACAAAAT TCAACAACCT TCATTGCCTA AAACCTCAA TAAATTAGAT ATTGATGGGA TTGGTATCTC
421    AAAATAATAA GAGCTATTTA TGTCAAACCC TCCAGCAATA TCATACTGAA TGGGCTTTTC CTGGAAGCAT
491    TCCCTTTGAA AATCTCAGTT ACCTTTCTTT TGGATATGTG TGTGAGGAAA GAGTACCTAC AACTACCTC
561    TTTAGTTAAA TGCCATATAC AATAAATATT AATACCTACA GTCCTCATGT TGTATATTAC ACCAACCCCA
631    ATCGAACC

```

## Clone C: 662 bp;

```

1      GTTTCGATTG GGTTGGTGTA AATTAGGAGG AGTTGAGTGG AAGGGAAATG GAGTTGAGTG AAGGATGGAA
71     TGGAAATGAGA TGGAAATGGAA TGGAAATGGAA TGGAAATGGAA TGGAAATGGAA TGGAAATGGAA TGGAAATGGAA
141    AGGGAAAGGTA AGGGTGGTGG GAAGTAAGGT GGTGCGCTAA TCCTCAATAA AACTACTACCA AACCGATCCA
211    CGAGCAAAAT AAAAAGCTTA TCCACCATGA TCCAAAACCTGG GCTGCATCCC TGGGTCGAA GGCTGGTTCA
281    CATCAACAAT AATCAATCAC ATATCCAAA CCCACGTCCA AAACCTCAATG ATATGTCAAT GATGCAGAAA
351    GCCTTTTGAC AAAATTCAAC AACCTTCATT GCCTAAAAC CTCAATAAAT TAGATATTGA TGGGATTGGT
421    ATCTCAAGGG ATGTATCTCT AATATTAAGA GTCATTTAGT CAAACCCACA GCCAATATCA TACTGAATGG
491    GTNAAAAACC TGAAGGCAT TCCCTTTGAA AATCTTCAGT TACCTTTCTT TTGGATATGT GTGTGAGGGA
561    AAGAGTACCT ACAAACTACC CTTTTAGTTA AATGCCATAT ACAATAAATA TTAATACCTT ACATGTCCCT
631    ATGTTGTATA TTACACCAAC CCCAATCGAA CC

```

## Clone D: 625 bp;

```

1      GTTTCGATTG GGTTGGTGTA AATATAGTGG AGTTGAGTGG AAGGGAAATG AATGGAATGA GATGGAATGG
71     AATGGAATGG AATGGAATGG AATGGAATGG AATGGAATGG AATGGAATGG GAAGATGGAG TGGAGTGGAG
141    TGGAGTGGAT TNGAAATNT CAATCTTCCA CTACCAAAAC GAATCCAGCA GCAAAATCAA GCTTATCCAC
211    CATGATCCAA ATGGGCTGCA TCCTGGATGC AGGATGCAGC TGTACATCA CATCTCACAT AATCAGCCAT
281    TCNNNATCAA ACCCACGTCC AAAACTCAAT GATATGTCAA TGATGCAGAA AGCCTTTTGA CAAAATTCAA
351    CAACCTTCAT TGCTAAAAC TCTCAATAAA TTAGATATTG ATGGGATTGG TATCTCAAAA TAATAAGAGC
421    TATATATGGC ATTATGTCAA CCACAGCAAT TTCATACCTG AATGGCAAAC CTGGAAGCAT CCCTTTGAAA
491    ATCTCAGTAC CTTTCTTTTG GATATGTGTG TGACCAAGA GTACCTACAA CTACCTTTTA GTTAAAATGC
561    CATATACAAT AAATATTAAT ACCTACAGTC CTCATGTGTG ATATTACACC AACCCCAATC GAAAC

```

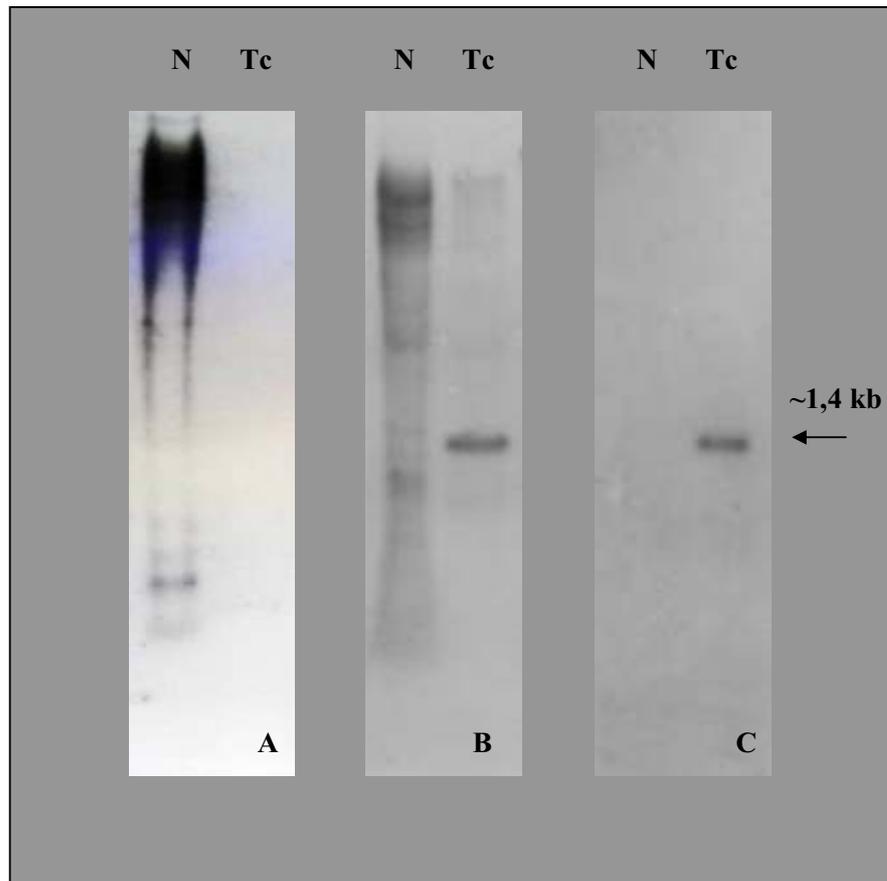
## Clone E: 1067 bp;

```

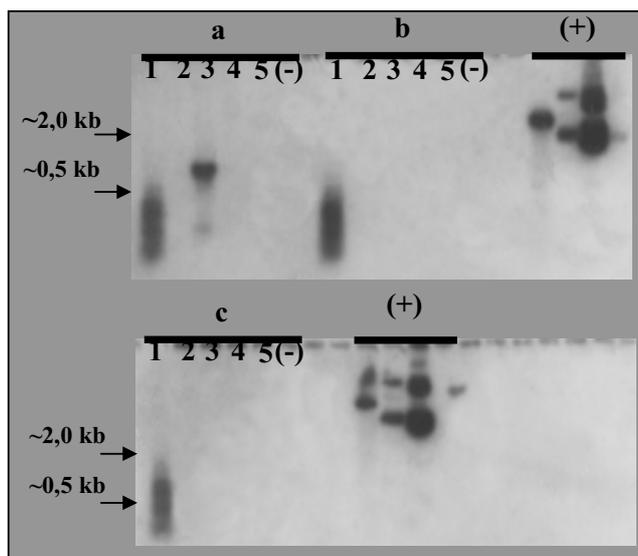
1      GTTTCGATTG GGTTGGTGTA TATACAGCCT ACCATGATTC CAAGTGGTAC AAGTATTTTT TTCCAAATGC
71     CTTAAAAAAT ATTTTGGCTT ATTTTGAAT ATATTCCAGA AAAAAGCAAT GTCACCCAAG TCTCCCAACA
141    TCTCTCTAAA TATATACTTG TGTACGGTT CAAAATGTAA ATAAAAACCT AAGACTATTT CCTACTTCTG
211    ATGAGAGGCT ATATCTCATG CCTTTGTTC CCTAACACC TGGCCAAAAA TGCAGTCTGT GTGCATGGTT
281    AGCATTATG TAATGTGTG CAAATTGGAA AAGGAATGAA AAGTGGGAAA GGTCAAAGCT CTGGAAACCC
351    TGGAAAGCAAG CTTAGGCAAT CCTTCCTGGA CCCTAAGGAA CAGGTAAGAA ATTTTCATGGA CAAAGATACC
421    AAAACCAATT GCAACAAAAA CAAAAATTGA CAGGTGGGAT CTAATTAAAC CTAAAAGCTT GCACACAGCA
491    AAAGAACTA TCAACAGAGT AAACAGACAA CCTACAGGAA GTGTGAAAAA CATTTACAAA CTATGCATCT
561    GACAAAGGTC TAATATCCAG CATTTATAAG GAACTTAGCA AATTTACAAA AGAAACAACC CCATTAATAA
631    GTGGACAAG GACATGAACA GACACCTCTC AAAAGATGAC ATACGTGCAG CCAAGGAGCA TATGAAAAAA
701    ATTCCATATC ACTAATCATT AGAGAATTGC AAATCGAAAC CACAATGAGA TACCATCTCA CGCCAGTACG
771    AATGGTGATT ATTAATAAAGT CAGGAAACAA TAGATGCTGT GGAGAAATAG ATGAGGTTGT GGAGAAATAC
841    GAAACGGCTT TTACACTGTT GGTGGGAAAT GCAAATTAGT TCAACCATGG TAGAAGACAG TATTGTGATT
911    CCTTAGGGAT ACTGGAACCA AAAATACCAT TTGACCCAGC AATCCCATTA CTAGGTATAT ACTCAAAGGA
981    ATATAAATCA TTGTACTATA AAAGACACAT GCACACCTAG GTTTTATGTC TACATACTAC ATATATTACA
1151 CCAACCCCAA TCGAACC

```

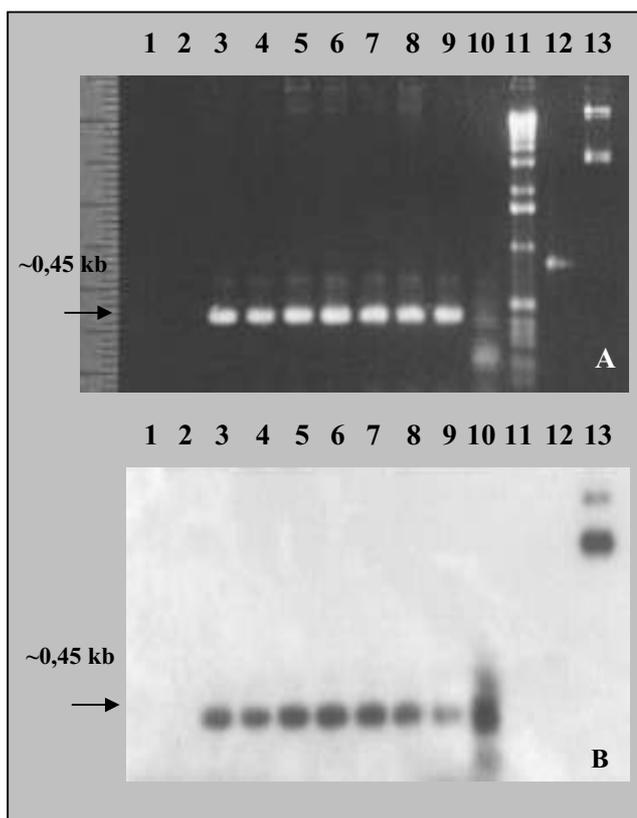
**Figura 7.** Sequências pertencentes ao grupo A: clones A, C, D e E, obtidos por amplificação de macrófagos transfectados com *Trypanosoma cruzi*, comparadas a seqüências depositadas em banco de dados. Caracteres em vermelho sublinhado, seqüência de bases do iniciador sk36 utilizado na amplificação da extremidade da região conservada de minicírculos de kDNA, região em vermelho não sublinhada bases com correspondência a extremidade da região conservada (Sturm et al., 1989). Caracteres azuis, fragmento putativo de região variável de minicírculos. Em preto, região com identidade indefinida. Amarelo escuro, repetições com identidade entre 84 a 97% com satélite III humano (hssat13 acessos gbIX82942I). Verde, identidade de 70 a 90% com o elemento LINE-1 (HUM1C1C acesso gbL19088I): clones A, C e D, similaridade entre as bases 3611 a 3954 do LINE-1; clone E: similaridade na região entre as bases 4895 - 5590. Itálico: desproporção entre purinas e pirimidinas na fita.



**Figura 8.** DNAs isolados de macrófagos de humanos normais (N) e *Trypanosoma cruzi* (Tc), digeridos com a enzima *EcoR* I e hibridados por *Southern blot* com as sondas isoladas dos clones do grupo A conforme estratégia experimental mostrada na Figura 1. A estringência máxima das lavagens foi de 65 °C/ 20 min com solução 0,1X de SSC e 0,1% SDS. a) Observa-se o sinal positivo de hibridação do fragmento de 280 pb pertencentes à região L1 do clone A (L1A) apenas na linha correspondente ao DNA de macrófago normal; b) Nota-se o sinal de hibridação do segmento de 100 pb pertencente à região satélite do clone A (MAS) no DNA macrófago normal e no DNA de *T. cruzi*; c) segmento de 89 pb proveniente da região variável de minicírculos de kDNA isolada do Clone A (HVA) mostrando sinal de hibridação positiva somente no DNA de *T. cruzi*.



**Figura 9.** Segmentos de DNAs obtidos pela amplificação por PCR do DNA de macrófago normal (2), infectado e tratado (3), linhagem subclonal A (4) linhagem subclonal G (5), e de *Trypanosoma cruzi* (1) com os iniciadores: a) SK 35 e L1RTa1; b) SK 35 e L1RTa2; c) SK 35 e L1RTs1, hibridados por *Southern blot* com a sonda SK36 de minicírculo de kDNA. (-) controle negativo de amplificação; (+) controles positivos de amplificação e hibridação. Observa-se a presença do sinal positivo de hibridação na linha correspondente a amplificação do DNA de macrófago infectado e tratado com os iniciadores SK35 e L1RTa1 e amplificação unidirecional gerada pelo iniciador SK35 nos DNAs de *T. cruzi*.



**Figura 10.** Segmentos de DNAs contendo kDNA e DNA humano proveniente de amostras de sangue de pacientes chagásicos. A) Visualização em gel de agarose dos segmentos de DNA amplificados por PCR com os iniciadores SK36 e m6a1: DNAs de pacientes chagásicos (2 a 9) e DNA de *T. cruzi* (10); controle negativo de amplificação (1), controle positivo de amplificação (12). B) *Southern blot* do mesmo gel hibridado com a sonda 122 (região conservada que compreende a minicírculo de kDNA), controle negativo de hibridação (12), controle positivo de hibridação (13), marcador de tamanho molecular (1 kb ladder Gibco BRL), estringência de lavagem de acordo com protocolo padrão.

### 3. CONSTRUÇÃO DO BANCO ENRIQUECIDO DA REGIÃO DE INTEGRAÇÃO

#### 3.1 - Posição do kDNA nas linhagens celulares subclonais A11, C4 digeridas com a enzima *EcoR I*.

O padrão de restrição de 16 µg de DNA das linhagens subclonais C4, C6, e A11, examinadas com sonda de kDNA, pelo método de *Southern blot* demonstrou que as linhagens clonais não são idênticas quanto à posição da integração no genoma hospedeiro. A digestão do clone A11 com a enzima *EcoR I* (**Figura 11**) gerou pelo menos duas bandas, uma com aproximadamente 3,2 kb e outra com 0,8 kb. Enquanto que o clone C4 e C6 mostraram uma banda única com aproximadamente 2,1 kb e 2,4 kb, respectivamente (dados não mostrados). Após cultivos sucessivos das linhagens subclonais, observou-se uma intermitência no sinal de hibridação, o que nem sempre foi recuperado com o aumento nas concentrações do DNA (25 e 60 µg). Entretanto, as faixas de massa molecular correspondente ao sinal de hibridação produziram ampliações positivas por PCR com iniciadores de minicírculos de kDNA (**Figura 12a e b**), indicando a presença desta categoria de moléculas naquelas faixas de tamanho molecular mesmo que em menor quantidade.

#### 3.2 - Clonagem da região de kDNA integrada no genoma hospedeiro

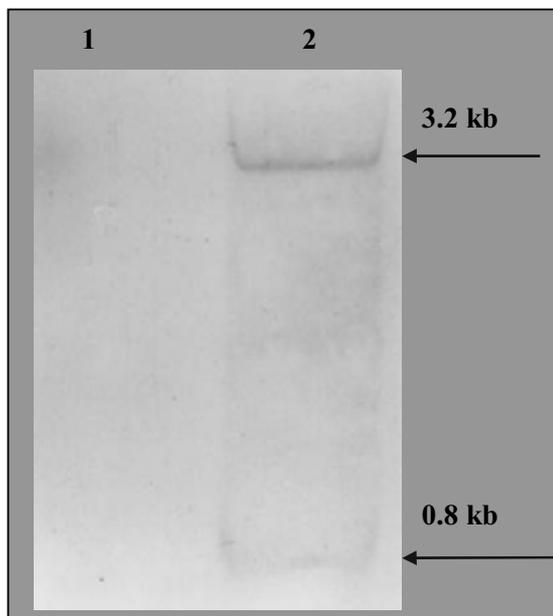
##### a) Abordagem I - Clonagem da banda 3,2 kb A11 e 2,1kb C4 em fago $\lambda$ gt10.

Somente o banco enriquecido da região 2,11 Kb de C4 *EcoR I*, clonadas no fago  $\lambda$ gt10 na hospedeira XL1blueMRF<sup>+</sup>, gerou clones positivos por hibridação de colônia com sonda de kDNA. As demais combinações de bancos enriquecidos (banda 3,2 Kb de A11 e hospedeiras: XL1blueMRF<sup>+</sup>, CES201 e C600, e banda 2,11 Kb de C4 em CES201 e C600) não geraram clones positivos em 600.000 placas de lises analisadas.

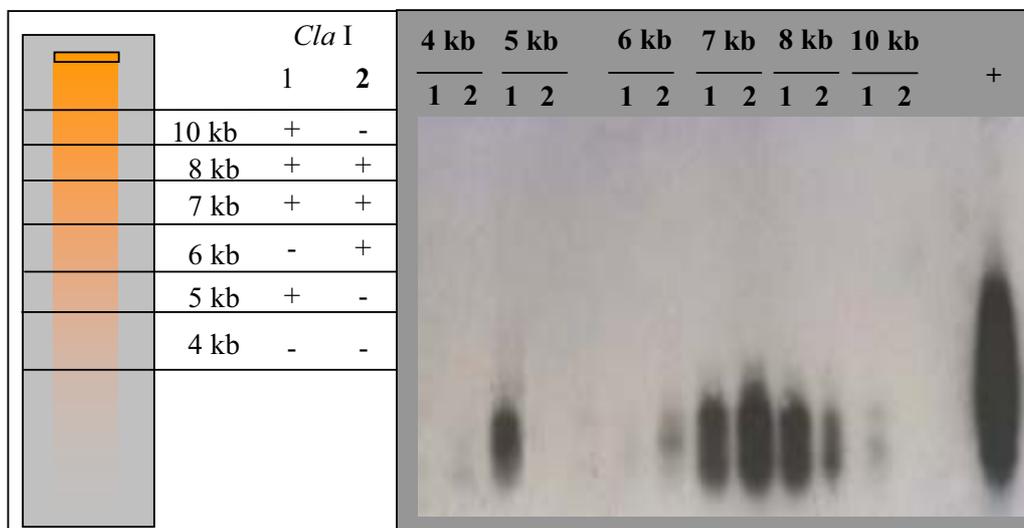
Do banco 2,11Kb C4/ XL1blueMRF<sup>+</sup> obteve-se 20 placas de lise positivas para kDNA. A frequência de aparecimento do sinal positivo foi de uma placa para cada 500 fagos negativos. Contudo observou-se perda de positividade nas etapas subseqüentes de enriquecimento. Coletou-se uma proporção de uma placa positiva com 3-7 placas negativas, numa expectativa de 1 placa positivo para 3 a 7 negativos na segunda etapa de enriquecimento. Entretanto, obteve-se foi 1:2.000, em todas as tentativas de aumento da frequência do sinal, sugerindo a perda do inserto durante a replicação do fago. Realizou-se, então, uma PCR com a finalidade de tentar qualificar a intensidade do sinal positivo do banco e da

## RESULTADOS

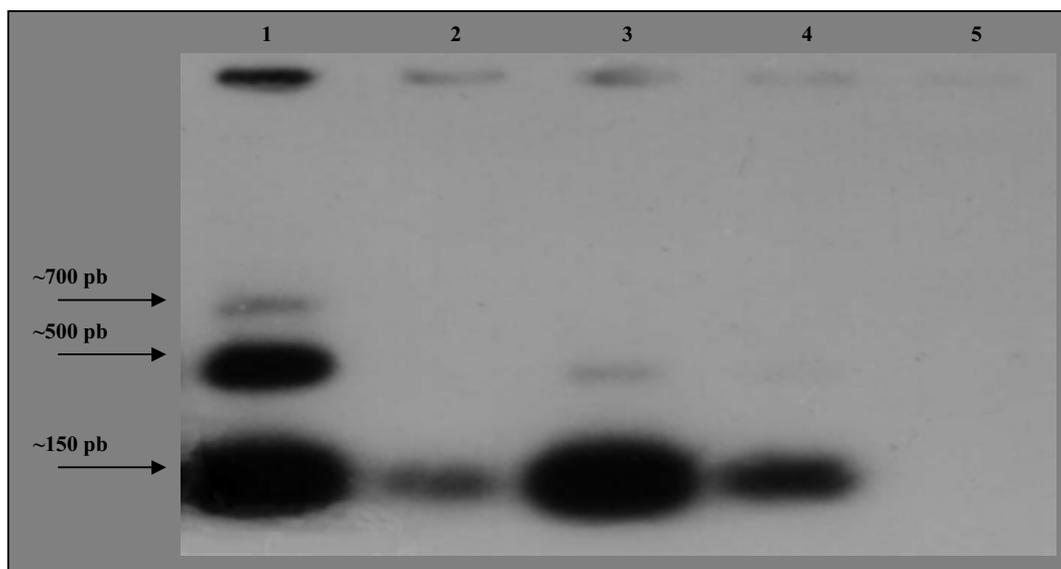
placa de lise positiva para kDNA coletada para a segunda etapa de seleção para enriquecimento do fago de interesse. O resultado mostrado na **Figura 13** confirma a presença do kDNA tanto no banco como nas



**Figura 12.** Padrão de hibridação por *Southern blot* do DNA de macrófago subclone A11 (2) digerido com a enzima *EcoRI* e do macrófago normal (1) com a sonda 122 proveniente da região conservada de minicírculos de kDNA. Observa-se o sinal positivo de hibridação na posição de 3,2 kb e 0,8 kb no clone C4 após a lavagem das membranas com SSC 0,1X e SDS 0,1% durante 20 min a 65 °C.



**Figura 12.** Localização dos segmentos de kDNA no genomas das linhagens subclonais A11 (coluna 1) e C4 (coluna 2) digeridos com a enzima de restrição *Cla* I. A) Esquema ilustrativo da estratégia experimental utilizada na coleta dos diferentes segmentos de DNA separados por tamanho através de eletroforese em gel de agarose 0,8% sem brometo de etídio. Após leve coloração o gel foi subdividido de acordo com o esquema. O DNA isolado de cada faixa foi amplificado por PCR com os iniciadores sk35/sk36, específicos para minicírculo de kDNA. O resultado positivo (+) ou negativo (-) das amplificações e hibridação foi anotado ao lado da faixa correspondente. B) Visualização por *Southern blot* com a sonda 122 da presença de minicírculos de kDNA presentes nas diferentes faixas moleculares dos DNAs de A11 e C4 digeridos com *Cla* I após amplificação conforme estratégia mostrada no item 12A.



**Figura 13.** Perda do minicírculo de kDNA da região de integração clonada no fago  $\lambda$ gt10 durante processo de enriquecimento e purificação do vetor. Observa-se a redução no sinal de hibridação em *Southern blot* do produto de amplificação da região conservada de minicírculo (iniciadores SK67/ SK34) com a sonda 122 de minicírculos de kDNA. Linha 1, amplificação do banco A11  $\lambda$ gt10; Linha 2, amplificação dos fagos eluídos na primeira etapa de purificação do selecionado 1; Linha 3, segunda etapa de purificação do selecionado; Linha 4, terceira etapa de purificação do selecionado 3; Linha 5, controle negativo da amplificação e hibridação.

placas de lise coletadas, porém, observa-se uma significativa diluição do sinal positivo de hibridação com sonda de kDNA. A amplificação por PCR dos fagos coletados juntamente com a placa de lise kDNA positiva, com iniciadores somente do vetor ( $\lambda$ gt10R e  $\lambda$ gt10F), permitiu observar um aumento no número de fagos sem inserto. O aumento significativo de fagos sem inserto e a raridade do sinal positivo durante as etapas subsequentes de isolamento inviabilizaram a recuperação dos clones portadores da região kDNA positiva integrada no genoma hospedeiro.

***b) Abordagem II - Clonagem das bandas de 3,2 kb e 2,1 kb dos subclones A11 e C4 em plasmídio.***

Foram analisados de 300 a 3000 clones provenientes de cada uma das clonagens das bandas 3,2 Kb de A11 e 2,1 Kb de C4 nos vetores PCR 2.1 e pBluescript, nas hospedeiras XL1BlueMRF<sup>+</sup>, DH5 $\alpha$ MCR, e SURE-cells, através de hibridação de colônia com sonda de kDNA. Foram selecionados somente 7 clones positivos, todos provenientes da clonagem de C4 em PCR 2.1 na XL1BlueMRF<sup>+</sup>. Estes clones apresentaram rearranjo do vetor, e perda de um dos sítios *EcoR* I da clonagem, como demonstrou a análises de restrição, e confirmado pela não obtenção do inserto após amplificação com os iniciadores do vetor, e impossibilidade de seqüenciar a partir do sítio de anelamento do iniciador M13 reverso.

## RESULTADOS

---

Não obstante ter-se clonados segmentos de DNA com aproximadamente 2,3 kb, o tamanho dos recuperados não foi superior a 600 pb. O resultado do seqüenciamento parcial desses DNAs mostrou regiões conservadas de minicírculo intercaladas por uma seqüência de aproximadamente 50 bases. A **Figura 14a** mostra, a título de ilustração, o resultado do seqüenciamento do clone 1C4 já que os demais apresentaram seqüências semelhantes.

### *c) Abordagem III - Clonagem a partir de PCR inversa*

A PCR inversa com os iniciadores *SK35* e *SK36* da região 2,4 kb-kDNA obtida da digestão do subclone C6 com a enzima *EcoR I* e resultou em fragmentos com tamanho superior a 1,4 kb. A clonagem do material amplificado no vetor PCR II e hospedeira *DH5 $\alpha$*  geraram, aproximadamente, 2000 transformantes. A análise de restrição dos clones positivos e negativos com a sonda 122 por Southern blot com a enzima *EcoR I* mostrou que os insertos positivos possuíam no máximo 660 pb, enquanto que os negativos apresentavam tamanho na faixa esperada de 1,4 kb.

O seqüenciamento de 2 clones positivos um com tamanho de 660 pb e outro com 400 pb revelou que os clones apresentaram regiões conservadas completas de kDNA intercaladas por segmentos repetidos de DNA com 50 e 80 pb respectivamente (**Figura 14 b e c**). As regiões repetidas de 50 pb do clone 1C6 apresentaram identidade da ordem de 90% entre si e com o segmento de 50 pb dos clones do grupo 1C4. Em relação ao clone 2C6, esta semelhança esteve em torno de 75%.

### *d) Abordagem IV – Fragmentação da estrutura repetitiva do kDNA integrado presente nos fagos $\lambda$ gt10.*

A estratégia experimental mostrada na **Figura 2**, empregada para romper as repetições de kDNA presentes nos vetor  $\lambda$ gt10, resultou em ampliações com sinal de hibridação positivo com a sonda 122 pb. A clonagem do produto no vetor PCR 2.1 e hospedeira *E. coli*, XL1BlueMRF' permitiu a seleção de 14 clones positivos com a sonda 122 pela técnica de hibridação de colônia. O tamanho dos insertos e a análise dos seqüenciamentos foram apresentados na **Tabela I** e **Figura 15**. De acordo com a similaridade de suas seqüências os clones foram agrupados em quatro categorias. O resultado da comparação das seqüências com outras depositadas no genebank e com os demais clones obtidos por outras estratégias mostrou a inexistência de segmentos de região conservada (região 122) ou outras regiões atribuíveis à minicírculos de kDNA na maioria dos clones analisados. Apenas um grupo apresentou similaridade com o iniciador *SK35*, que no clone estava organizado em múltiplos. Houve alterações na seqüência

## RESULTADOS

## a) 1C4:

```

1      GAATTCGGCT TGGTTCGATT GGGGTTGGTG TAATATAGAG AGTTTGGTGA TAGTTGTGGT
61     GTTTTATGTA AATGGAGGTG CTGAAATGCA GATTTTGATT TTNAGGGCGT CAGATTTCCG
121    ACAAATCATT CATCTCCCCG ACNNGGCGAA GTGGTGNGT TACTTAGTGT CGATGGGTGG
181    G

```

## b) 1C6

```

1      GGTTTCGATTG GGGTTGGTGT AATATAGAGA GTTTGGTGAT AGTTGTGGTG TTTTATGGTA
61     AATGGAGGTG CTGAAAATTG GCAGAATTTT GATTTTGGGA GGGGCGTTCA GATTTGCGCG
121    GAAAATTCAT GCATCTCCCC CGTACATTAT TTGGCCGAAA GTGGGGGTTG TTTACGCGAG
181    GTGGGTTCGA TTGGGGTTGG TGTAATATAG AGAGTTTGGT GATAGTTGTG GTGTTTATGG
241    TAAATGGAGG TCTAAAATGC AGATTTATTT GGAGGCTCAG TTGCGAATCA TGCATCTCCC
301    CCGTACTGAC TGCTAATAGG TCTCACGACG CGGTTCGATG GGTGGTGTAT ATAAAAGGTT
361    GTGATAGTTG TGCTGCTTTA TGTCAAATGG AGGTGCTTGA AAATGCAGAA CTTTTGATTT
421    TGGGAGGGCG TTCAGACTTT TGGGCGGAAA ACTTCATGCA TCTCCCCCGT ACATTACCTT
481    TGGCCGAAAG TGGGGGTCTG TTTACGGGAG GCTGGGGTTC GATTGGGGTT GGTGTAATAT
541    AGAGAGTTTG GTGATAGTTG TGGTGTTTTA TGGTAAATGG AGGTGCTGAA AACTGGCAGA
601    ATTTTGATTT TGGGAGGGGC GTTCAGATTT TGGCCGAAA ATTCATGCAT CTCCCCGTA
661    CATTAT

```

## c) 2C6

```

1      GGTTTCGATTG GGGTTGGTGT AATATAGAGA CTGGTGGTAG TGCTTTGGTA ACCGATATAC
61     TCAGATTATC ATTTTAGTTT GAATGTTGTA TAGTTGGAGG TGTATTGTTT ATTTGCATGT
181    TGGGAGTGGG TTGGAGTGGG TTGGAGTGGG GATAGAATTC CCGAAAGTGT GGTTTTGGGA
241    GGGGCGCTCA AATTATGGCC GGAAAATTCA TGCATCTCCC CCGTACATTA TTTGGTCCAA
301    AAAC TGGGGG TGTGTTTTGT GGAGGTTGGG TTCGATTGGG TTGGTGTAAAT ATAGAGAGTG
361    GTGGTAGTGC TTTGGTAACC GATATACTTC AGATTAGCAT TTTAGTTTGA ATGTTGTATA
421    GTTGGAGGTG TATGTTATTG CATGTTGGAG TGGGTTGGAG TGGGTTGGAG TGGGTATACA
481    ATTTCCCGAA AGTGTGGTTT TGGGAGGGGC GTTCAAATTT ATGGCCGAAA ATTCATGCAT
541    CTCCCCGTA CATTAT

```

## d) M1

```

1      GGTTTCGATTG GGGTTGGTGT AATATAGAGA GTTTGGTGAT AGTTGTGGTG TTTTATGGTA
61     AATGGAGGTG NTGAAAATTG GCAGAATTTT GATTTTNGGA GGGGCGTTCA GATTTTGGGC
121    GAAAATTCAT TGCATCNCCC CCNTACATTA T

```

**Figura 14.** Sequências dos DNAs obtidos da clonagem em fago  $\lambda$  gt10 das bandas de DNA genômico proveniente das linhagens clonais C4, C6, e de macrófago de coelho chagásico que apresentaram sinal de hibridação positivo com a sonda de minicírculo 122. a) Sequenciamento parcial do segmento 1C4, obtido da clonagem da região 2.1 kb do C4 digerido com *EcoR* I, a partir de banco genômico enriquecido; b e c) Clones 1C6 e 2C6, obtidos da clonagem da região 2.4 kb do C6 *EcoR* I pela técnica de PCR inversa. d) Clone M1 obtido da amplificação de macrófagos de coelho chagásicos com o iniciador SK36. Em preto: sítio de clonagem *EcoR* I do vetor. Em vermelho e azul, regiões conservadas e variáveis de minicírculo de kDNA respectivamente. Observa-se a presença de encurtamento nas regiões variáveis em todos os clones analisados quando comparados ao consenso esperado de 220 pb. As regiões variáveis encurtadas dos clones 1C4, 1C6 e M1 apresentam identidade na ordem de 95% entre si.

## RESULTADOS

do vetor nos clones do grupo 1 e 4 (**Figura 15**). No caso do grupo 1 os sinais sugerem rearranjo do vetor. Já no grupo 4 observa-se perda de 16 bases da região *EcoR* I do segmento  $\lambda$ gt10R, múltiplas repetições do iniciador SK35, seguido por 47 bases, com predominância de repetições G/T, sem correspondência com seqüências dos vetores de clonagem ou com os iniciadores usados na amplificação. O conjunto das informações foi sugestivo de instabilidade genética dos segmentos clonados.

Observou-se pouca identidade entre os integrantes dos diferentes grupos. Em comum, observou-se que todos os clones possuíam seqüências ricas em T, e segmentos com desproporção entre bases púricas e pirimídicas.

**Tabela I.** Insetos obtidos pela subclonagem dos flancos da integração presentes nos fagos  $\lambda$ gt10 do banco construído com o DNA da linhagem subclonais de C4, positivos na hibridação de colônia, e negativos em *Southern blot* com sonda 122 pb e com iniciadores de kDNA internos. Os tamanhos foram ajustados após o seqüenciamento, sendo excluídas as bases do  $\lambda$ gt10.

CLONE C4	TAMANHO (pb)		SEQUENCIAMENTO (bases)	
	agarose	Seq.	Grupo	OBSERVAÇÃO
35R21	-	218	1	Seqüência do vetor
34R39	-	330		
34R38	600	494	2	Segmentos ricos em T/C, A/G; (grupo 35F 4 e 10 – seqüência parciais)
34R16	600	494		
35F14	600	471		
35F20	600	471		
35F10	1100			
35F4	1100			
35F1	200	125	3	Ricos em T
35F7	300	266		
34R59	-	74		
35R2	-	96	4	Repetições de sk35
35R14	400	-		Não seqüenciados.
34R1	800	-		
34R55	800	-		

## RESULTADOS

**GRUPO 1:****Clones 35R21 e 34R39**

λGT10	GTCACTGTCATACCATTTCATCAATGTCCTTGATATCGTAGGGTTCACAAGCTTCACACCA	362
35R21	.....	0
34R39	.....	6
λGT10	.....CGAACCAGCTCTAACCATGCTAATCAATGGATATTTCCCTTTGGGCTCAACG	414
35R21	.....	25
34R39	.....	65
λGT10	TGCCCAACAAATCTAACATTCGAATCAGAGGTGCCATTGAGCA.GCCAGTCAACACTTAC	473
35R21	-----	86
34R39	-----g-.-g-----	124
λGT10	GCCAAGAGCTGACGCAAGTTCTGGTAAAAAGCGTGGTCGCTTAGTTTTA.CCGTTTTCG.	531
35R21	-----	144
34R39	-----a-----g----cgc-----c-----a	184
λGT10	AGCTGCTCTATA.GACTGCTGGGTAGT.CCCCACCTTTTGAGCAAGTTCAGCCTGGTTAA	589
35R21	-----	202
34R39	-----g-----g-----g-t-----	244
λGT10	GTCCAAGCTGAATTCCTTTTGCTTTTTTACCCTGGAAGAAATACTCATAAGCCACCTC	645
35R21	-----	218
34R39	-----t-----	259

**B) GRUPO 2:****Clones 34R38 e 34R16: 494 bp.****Iniciadores do vetor completos****λat10R**

1	GAATTCATAC AATGATGGGC TGTTGGGGAG GGAGGATGGG AATTTAGGAA GTAGGGCCTT
61	CTAGAAGGGA ATGGGTCCAT GGGGGCTCAC CTTGGGGATG ATAACTTGCT CCTGGCTCTC
121	TCTCACTCTC CCATCCCAT TCTCCATGA TACTGAGCCC TGTGGAGCCA CATGCTCTTT
181	ACCTGGTTC AATTAACAAG TAGAGGTACC CAGATCTAGC TTGCAGCTCT GTCTAGCCCT
241	AAGCGGCTGT CTGCTGTTGC TCCCTATCCC TCTCTCCTTC CCCTGTGCTC TCCACTCCCC
301	TCTGTGCCCT ATTCCCAGT CTGCAGACTG GTAACAAAGG CCAAGCAGGA AGAGATTCAA
361	ACTCCAAAAC ACCAATGCCT GTTTCATAAC AAACCACAGA TCTCAGGTTT CAAATATTTT
421	CTAATGAGTG TTAACAGATT AAATGTTGTT GTTGGCTACC TTCTAACAAAG TTCAGGTTTCG
481	ATTGGGGTTG GTGT

**CLONES 35 F14 e 35F20: 471 bp;**

1	ATAATGTACG GGGGAGATGC TGAGAGAGAC ACTGAGGAGA TGGGAAGACC TGGGCGGGAC
61	TGGAGGAGAG GTAAC TAACC AAGTGGTAGG CATAGAGTAG TAGTTGAAAT GGTTGAAATG
121	GTTAAGTAAG TTAAGGACTA GACAGGGAAG AGCCAAAGCC TATCTTAGGC ATTTAATAAT
181	GAATAATTAC TCTCAGAGTC ATCATTCCAA AAGAAAATGT TTTGCTTGTT TTTTTTATAC
241	TTCTTCCATT CTTCACATCC TACCCACAGG AACACAATGG TGGCACAAGC CGGCTTCTTC
301	TCTGAGGACC CATCGAGTCT CAGCTGGCAT TCACAATCTC TTTTATAAGT ACTTGATTCT
361	TAATTGCCAA CTCACATGGC TGTGGATGTC CAGAGGCTAG AGGTATTGGA TTCCCCCGGA
421	GCTGGAGTTC ACAGGTAGTT GTGAGCCTCA CAACTTTGGG TGTTTGAATT C λat10F

## RESULTADOS

## CLONES 35 F4 e 35F10

Insertos com aproximadamente 1000 pb. Seqüenciados 312 bp e 293;

Leitura a partir do iniciador M13rev

```

1      TATAATGTAC GGGGGAGATG CCCTGCCTCA TATGCCCATG GAACCATGAA TGAATAAGTT
61     GCTCCACCAC TCAGTACTAA CAGTTTGTGG GTGATGGGTG GACAAAAAAG AGAGCAGGAG
121    GTTTGCTTTG AGAATCTGTC AAGCCCAAAA GAAAAGAGAG AAAGAGTAGT TAGACAAAGT
181    TGGCAAAGTT TCTCTTTTCT GAATTGCCAT TATCCCAAGG TCCTCTCCTG CATTTTGGAG
241    GAAGCATAAG GGGACAGTTG GGTTTTGTGG ACATTGAAAT AAATTTGGCC TAGTAAATGA
301    AAGATGAAGA CAA.....(região não seqüenciada).....
293    CTCAACATAG ACTCAGAGAC AGATAGACAG ACAGACAGAC AAGCTTATAT ACCATATATT
233    TAGACATAAC CATAACAGTCT GCAGGAAAT TACTGGTCTT CCGNTTCCAT GAGGAAAAAT
173    TGAATGTTCT TAGACACATG TACAGCGATT TGCTTCAGGA TTCTTGGATG TTGCTTACTG
113    ACTTACACTG AGAGTAGACT CTAGGCTTTC ATACACACCA CAACTAAAGC CAAATTTGAA
173    GCAAGCTTTA ATTAAATACT GACCACGTCC ATCTCTAGTC CATCTCTGAA TTC λgt10

```

## C) GRUPO 3:

Clone 34R59: 74 bp;

```

1      ACACCAACCC CAATCGAACC CCCAACTGAA TTCTTTTGCT TTTTACCCTG GAAGAAATGC
61     TCATAAGCCA CCTC λgt10R

```

Clone 35F1: 125 bp;

```

λgt10F
1      GAATTCGTTA TACAATTCAG ATATTTTTTA AAATATTCAC TTTTAAGTTT TGGGGCATTG
61     TAGAGATTTG TTTTGCATTT GTTGTCTCTC TGGGATTACG GTTGATCTC ACCCGTACAT
121    TATA

```

Clone 35F7: 266 bp;

```

1      ATAATGTACG GGGGAGATGC AAAAGACGAG GTACCTTCTC GTTGCTCTTA ACAATATCAG
61     CCAAATCACC TCTCAAGAAG AGCAGAATTC TGAATATGCA TTTCTCAAGG AAATGAGTTT
121    CCTACTTGTA AGGAAAGGAA TGCCATAAAG TTTCTTTTAC ATTGATCAGC AGTAAAGAAA
181    CTGTACATTA AACTCTACCA TTAATTTTCA TTTAAACTG CTCTGTGAA TTCAGCTTGG
      ACTTAACCAG GCTGAACTTG CTCAA λgt10F

```

## D) GRUPO 4:

Clone 35R2: 139 bp;

```

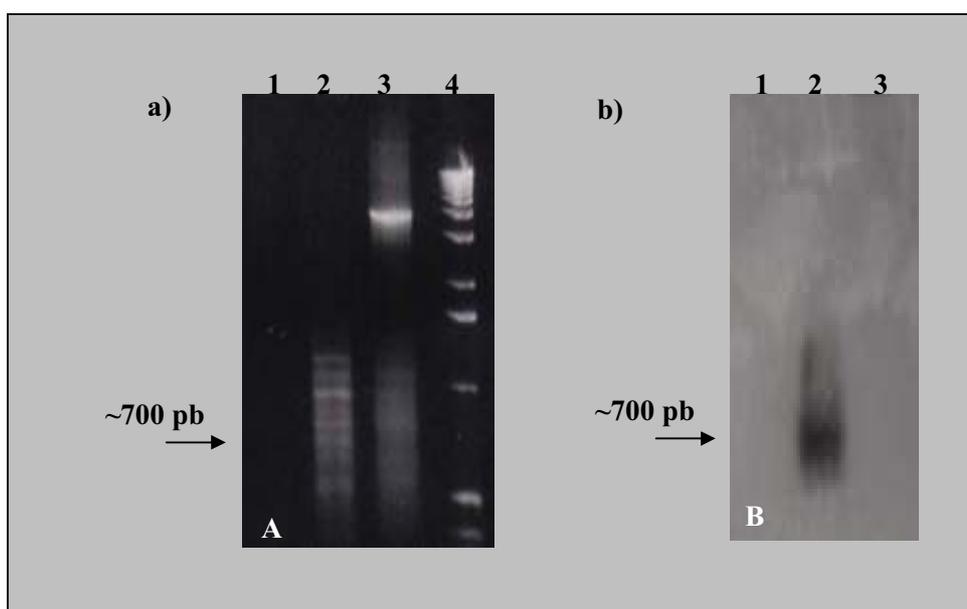
1      ATAATGTAAG GGTGAGATGC ATAATGTACG GGGGAGATGT ATAATGTACG GGGGAGATTGC
61     CAGTTAGCTT TGGTGGTGTG TGGCAGTTGT AGTCCTGAAC GAAAACATAC CCTGGAAGAAA
123    TACTCATAAG CCACCTC
      ||| |||||
      (3'- GAATTCCTTT TGCTTTTAC CCTGGAAG - 5')
      λgt10R truncado

```

**Figura 15.** Resultado do seqüenciamento dos clones pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4 obtidos da estratégia de fragmentação da estrutura repetitiva do kDNA. Em azul, iniciador do fago λgt10; em rosa e vermelho, iniciadores SK34 e SK35 de kDNA respectivamente. A) GRUPO 1: Clones 35R21 e 34R39 com identidade aproximada de 95% ao λgt10 entre as bases 356 a 604. Traço, identidade ao λgt10; ponto, ausência de base. B) GRUPO 2: Agrupamento dos clones com a mesma seqüência. Excluído valor de pares de bases o iniciador do fago. Peculiaridade entre os subgrupos 2: presença de regiões ricas em A/G, C/T (retângulo laranja). C) GRUPO 3: Clones pequenos. Observa-se a presença de segmentos de DNA (preto), com origem indefinida, unindo os iniciadores completos usados nas ampliações. Observa-se nos clones 35F1 e 35 F7, regiões ricas nas bases A/T. D) GRUPO 4: Inserto mostrando múltiplos do iniciador SK35, com pequenas alterações na seqüência de bases. Seta vermelha indica a orientação da repetição do SK35; seguem-se as repetições do iniciador, uma região, em preto, sem similaridade de seqüência a outros clones seqüenciados. Observa-se o iniciador λgt10R truncado.

*e) Abordagem V - Método de Captura*

A técnica de captura foi desenvolvida partindo do pressuposto de que seria possível recuperar seletivamente DNAs que estivessem hibridados a sondas homólogas ou parcialmente homólogas imobilizadas em membranas (Figura 16), o que permitiu purificar segmentos de kDNA integrados no genoma hospedeiro. Em virtude da instabilidade dos segmentos quando clonados, os fragmentos recuperados foram perpetuados satisfatoriamente por amplificação a partir de adaptadores ligados às suas extremidades.

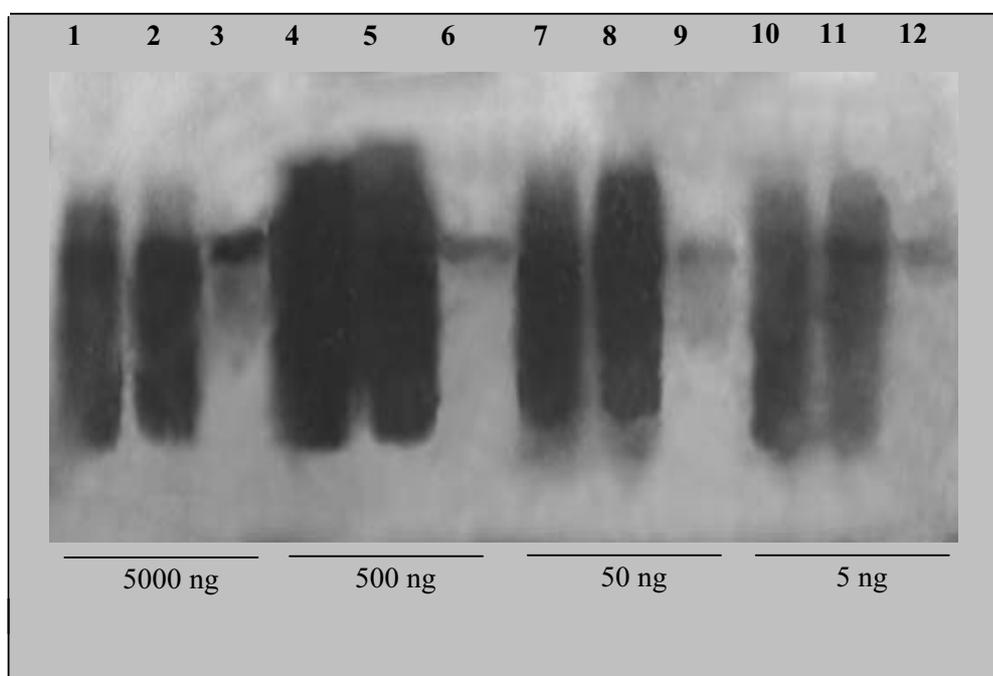


**Figura 16.** Captura do segmento de minicírculo de kDNA com a sonda de região conservada 122 a partir do clone 1C6 digerido com a enzima *EcoR* I. A) Confirmação da ligação do adaptador *Eco* no segmento de kDNA isolado do clone 1C6 (Linha 2) e nos fragmentos do clone 1C6 digerido com a enzima *EcoR* I (Linha 3), através do sinal positivo de amplificação com iniciadores do adaptador visualizado no gel de agarose. Linha 1: Controle negativo da amplificação; Linha 4: marcador de peso molecular (kb ladder gibco). B) Confirmação da captura dos segmentos de minicírculo a partir da mistura com o vetor visualizado na Linha 2. Eluição a 0,1X SSC e SDS 0,1% pelo sinal positivo em *Southern blot* com a sonda 122, Linha 1. Eluição a 1X SSC e 0,1% SDS; Linha 2. Eluição a 0,1X SSC e SDS 0,1%; Linha 3. Controle negativo.

## RESULTADOS

- **Sensibilidade do método de captura**

O nível de detecção da técnica foi aferido através da captura de um gene cópia única de *T. cruzi* por um fragmento de cDNA de 250 pb. O teste consistiu em usar diferentes concentrações de DNA genômico total (5.000 ng, 500 ng, 50 ng, 5 ng), mantendo-se constante a quantidade de sonda imobilizada, conforme descrito no Material e Métodos. A **Figura 17** mostra o resultado da hibridação dos produtos amplificados com os iniciadores do adaptador, com a sonda de cDNA 250 pb. O segmento do gene cópia única foi capturado em todas as concentrações de genômico testadas, indicando que é possível recuperar seqüências específicas de até 5 ng de material.



**Figura 17.** Sensibilidade do método de captura. *Southern blot* da captura de segmentos do gene *fosforilase*<sup>+</sup> de *T. cruzi* presente em cópia única no genoma (Jaime M. Santana, comunicação oral) a partir do DNA genômico total nas concentrações de 5000 ng, 500 ng, 50 ng, e 5 ng, recuperados nas eluições realizadas com: Linhas 1, 4, 7 e 10 – água; linhas 2, 5, 8, e 11 - 0,1X SSC e 0,1 SDS, Linhas 3, 6, 9 e 12 - 2X SSC e 0,1% SDS.

- **Captura do kDNA integrado no DNA genômico do subclone A11**

Diante dos resultados positivos obtidos no experimento piloto, foram utilizados 1 µg de DNA da região 3,2 kb do clone A11 para a captura do kDNA integrado. Como descrito anteriormente, as frações eluídas foram amplificadas a partir dos iniciadores do adaptador e hibridizadas com sonda de kDNA, gerando os resultados mostrados na **Figura 18a e b**. Na **Figura 18a** observa-se ampliações no material colhido nas estringências 2X SSC com SDS 0,1%, H<sub>2</sub>O e controle positivo da amplificação, que neste experimento foi a região 3,2 kb do subclone A11 ligada ao adaptador. Na **Figura 18b** verifica-se a hibridação positiva na faixa de 200 a 1.400 pb do material amplificado a partir das eluições 0,1X SSC e 0,1% SDS e H<sub>2</sub>O. O sinal positivo indicando a presença do kDNA na linha correspondente à amplificação do A11-3,2 kb partir dos iniciadores do adaptador só foi visualizado após 7 dias de exposição do filme de raio X.

Com a finalidade de verificar se a captura da região de integração a partir da banda *EcoR* I A11-3,2 kb reproduziria o mesmo perfil de bandas de uma recuperação a partir do DNA genômico total de A11, uma nova captura foi realizada utilizando-se 5 µg do DNA genômico total digerido com e ligado ao adaptador. Os resultados da amplificação e da hibridação dos materiais eluídos foram apresentados na **Figura 19**. Observa-se uma forte semelhança nos perfis de eluição e hibridação com sonda de kDNA do material capturado tanto do DNA genômico quanto do obtido da banda 3,2 kb.

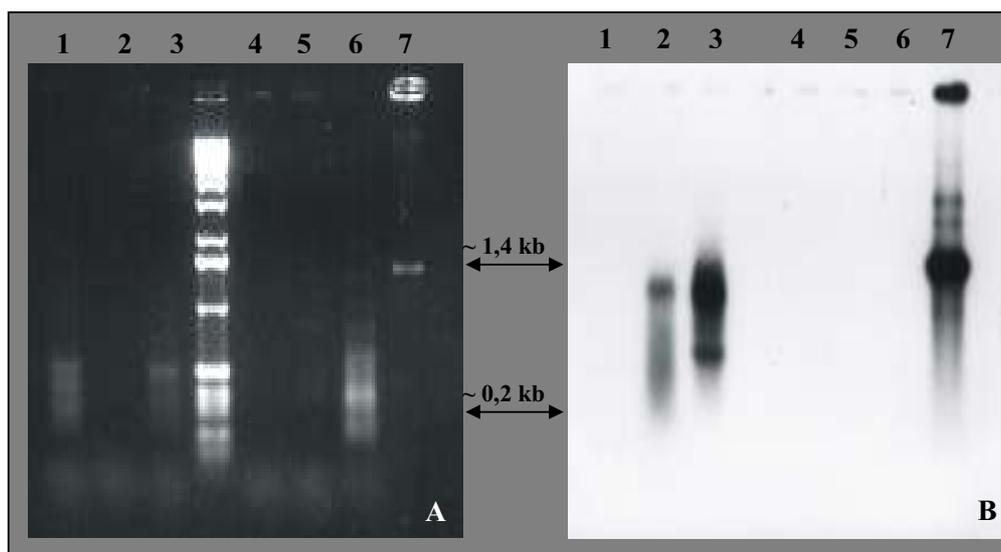
Em ambas as estratégias de captura, não se observou ampliações de fragmentos maiores que 1.400 pb com sinal positivo para kDNA. Em consequência da não recuperação da esperada positividade na região 3,2 kb, aventou-se a possibilidade das bandas estarem presentes, mas numa concentração inferior ao nível de detecção da técnica de *Southern blot*. O isolamento e a amplificação com iniciadores do adaptador da região correspondente a faixa de 3,2 kb não mostrou a presença da banda no tamanho esperado.

Para descartar a possibilidade de estruturas anormais presentes na região híbrida 3,2 kb estarem bloqueando a amplificação, aumentou-se a estringência da PCR pela adição de DMSO (Winship, 1989) e elevou-se o número de ciclos e o tempo de extensão. Este procedimento promove a abertura das fitas de DNA nas regiões onde com alta concentração de C/ G e/ou estruturas secundárias com tendência a formação de dobramentos. Contudo, a maior banda positiva por *Southern blot* com sonda de kDNA amplificada nestas condições apresentou tamanho de 600 pb (**Figura 20a**). A clonagem da banda no vetor

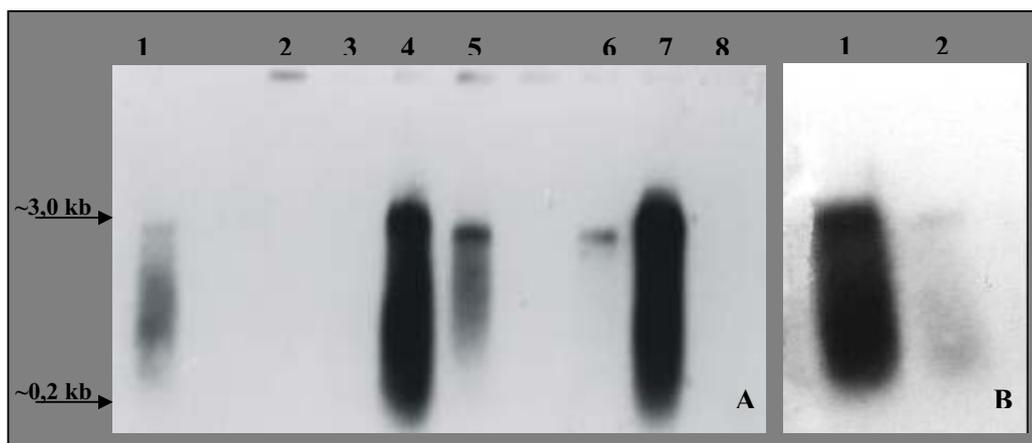
## RESULTADOS

PCR2.1 tendo como bactéria hospedeira a DH5 $\alpha$ , resultou em clones com tamanho inferior a 400 pb e sem sinal de hibridação com sonda da região conservada de kDNA (**Figura 20b**).

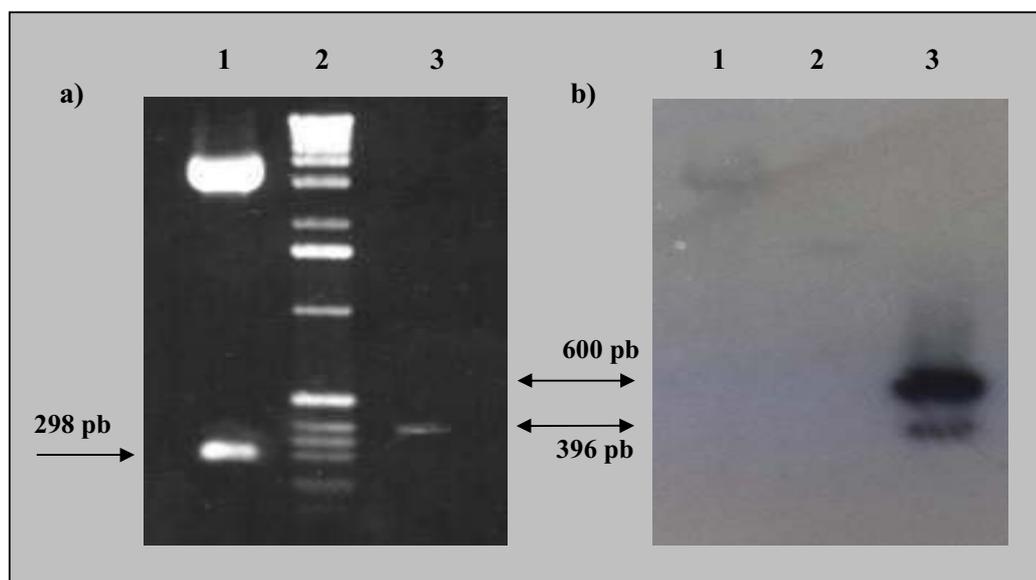
Decidiu-se, então, amplificar o material capturado na fração eluída em H<sub>2</sub>O utilizando-se o sistema XL- PCR (Promega), desenvolvido pelo fabricante para amplificar segmentos de DNA com tamanhos na faixa de 4 a 50 kb e DNAs considerados “difíceis”. Esta amplificação resultou em bandas com sinal positivo de hibridação, em *Southern blot*, com a sonda 122 apresentando tamanho de até 3 kb (**Figura 21**). Com o objetivo de aumentar a concentração da banda para a clonagem e verificar a existência de bandas de maior peso molécula, foram isolados do gel de agarose os DNAs amplificados nas faixas moleculares até 1 kb, entre 1 e 2 kb e acima de 3 kb. O resultado da reamplificação com a enzima *Tth* polimerase pelo sistema XL- PCR dos DNAs isolados repetiu o padrão de amplificação obtido no sistema de PCR normal, com bandas entre 200 a 1.400 pb (**Figura 22**).



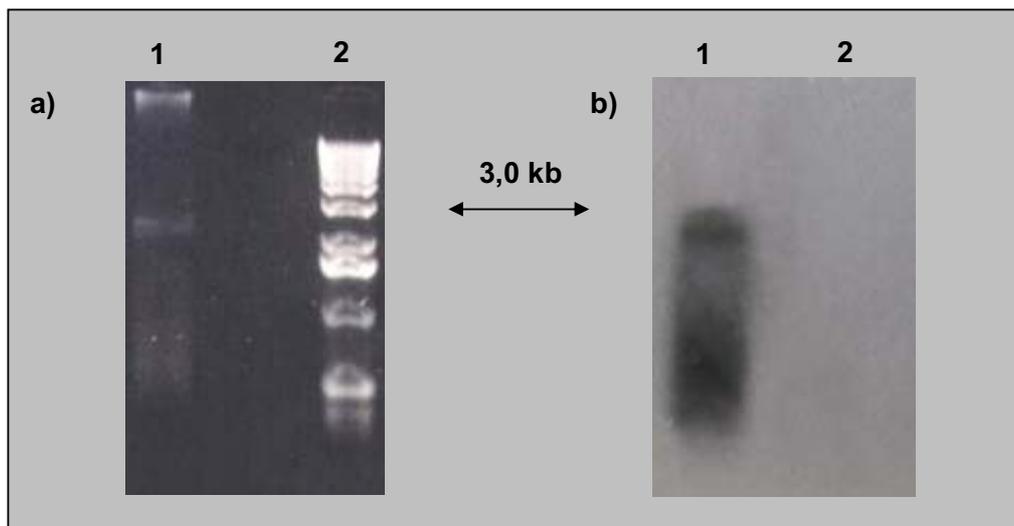
**Figura 18.** Amplificação a partir dos iniciadores do adaptador dos fragmentos de minicírculos de kDNA capturados da região 3,2 kb do subclone A11 digerido com a enzima *EcoR* I. A) gel de agarose mostrando a amplificação dos produtos provenientes das eluições: 1. SSC 2 X, SDS 1%, 15 min à temperatura ambiente; 2. SSC 0,1 X, SDS 1% por 15 min a 65 °C; 3. H<sub>2</sub>O por 1 h a 65 °C; 4. Controle negativo de amplificação da PCR; 5. 100  $\mu$ g de *T. cruzi* amplificados com o iniciador do adaptador; 6. DNA do subclone A11 digerido com *EcoR* I e ligado ao adaptador, não capturado; 7. kDNA de *T. cruzi* digerido com *EcoR* I. B) Análise por *Southern blot* do mesmo gel após hibridação com a sonda de kDNA com de lavagem de acordo protocolo padrão descrito no material e métodos . Observa-se o sinal de hibridação na faixa de peso molecular entre de 0,2 a 1,4 kb nas Linhas 2 e 3 e no controle positivo de hibridação Linha 7.



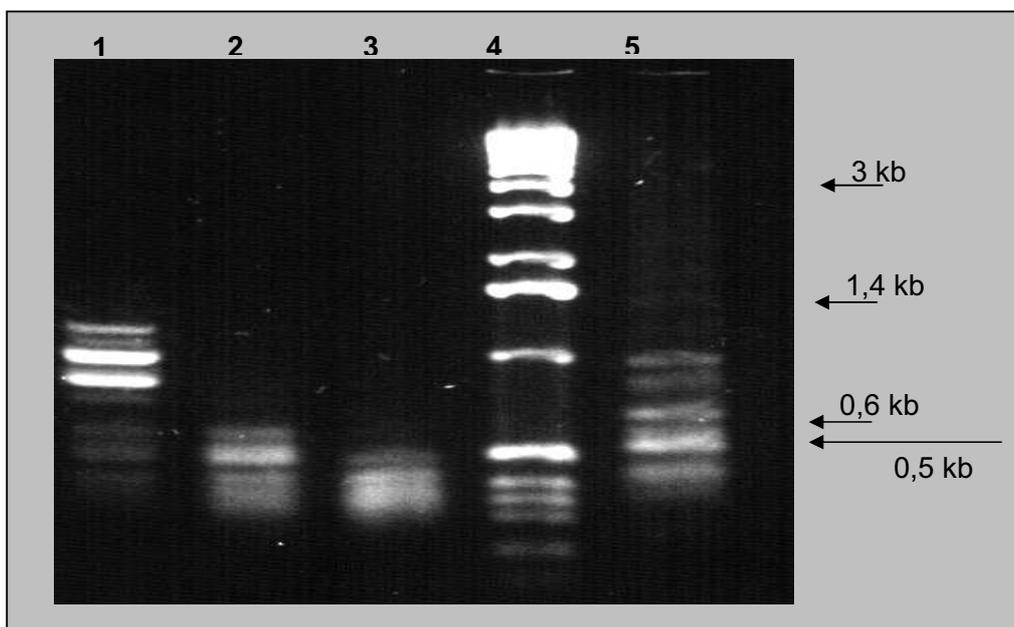
**Figura 19.** Captura da região de integração de minicírculo de kDNA do subclone A11 digerido com a enzima *EcoR* I, após amplificação por PCR com os iniciadores do adaptador, e hibridação por *Southern blot* com sonda de kDNA, as lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo padrão descrito no item 9 do material e métodos, sendo a última lavagem realizada a 65 °C por 20 min com a solução SSC 0.1X e SDS 0,1% . A) Comparação do perfil de bandas entre as capturas realizadas da banda 3.2 kb (Linhas 3 , 4 e 5) com as obtidas do DNA total (6, 7 e 8), observa-se o sinal positivo de hibridação com sonda de kDNA ns Linhas 4 e 7, eluição com SSC 0,1 X, SDS 0,1%, por 1h à 65 °C; e nas Linhas 5 e 6 eluição em H<sub>2</sub>O durante a noite a 65 °C, e ausência de sinal nas Linhas 3 e 8, correspondente às eluição com SSC 2 X, SDS 0,1% , por 15 min à temperatura ambiente; nas Linhas 1 e 2, tem-se respectivamente os controles positivo e negativo da amplificação e hibridação; B) Eluição da região de integração capturado do DNA total realizada em solução de formamida a 65 °C por 1 h (Linha 1); e H<sub>2</sub>O durante a noite à 65°C (Linha 2).



**Figura 20.** Rearranjo da região de integração capturada do macrófago A11 após clonagem no vetor PCR2.1 e multiplicação na bactéria hospedeira DH5 $\alpha$ . a) Comparação entre o tamanho dos segmentos amplificado e o recuperado da clonagem visualizada através de eletroforese em gel de agarose: Linha 1. fragmentos liberados da digestão do clone com *EcoR* I; Linha 2. marcador de peso molecular 1 KB ladder (GIBCO); Linha 3. banda 600 pb obtida da amplificação da região de integração capturada do A11 na presença de DMSO. b) Mesmo gel mostrando a perda da região conservada de minicírculo de kDNA no segmento proveniente do clone constatada pela falta do sinal positivo de hibridação por *Southern blot* com a sonda 122 (Linha 1), e o sinal positivo de hibridação com a sonda 122 pb no segmento antes da clonagem (Linha 3).



**Figura 21.** Regiões de integração de minicírculos de kDNA capturado do macrófago A11-*EcoR* I amplificado com os iniciadores do adaptador, pelo método XL-PCR (Promega) (Linhas 1); padrão de tamanho molecular (Linhas 2). a) visualização da amplificação em gel de agarose; b) sinal positivo de hibridação por *Southern blot*, do mesmo gel, com sonda 122 da região conservada (hibridação e lavagens realizadas de acordo com protocolo padrão descrito no item *Southern blot* do material e métodos - Estringência da última lavagem SSC 0,1 X SDS 0,1% a 65 °C por 20 min).



**Figura 22.** Padrão de bandas dos DNAs provenientes da capturados a do macrófago A11-3,2 kb, coletados em ddH<sub>2</sub>O, após reamplificação com a enzima *Tth*-polimerase e iniciadores do adaptador. Resultado da reamplificação das faixas de tamanho molecular “até 1 kb”, “entre 1 e 2 kb” e “acima de 3 kb” (Linhas 1, 2 e 3, respectivamente). Linha 4, padrão de peso molecular KB ladder (Gibco); Linha 5, A11-3,2 kb ligado ao adaptador (controle positivo da amplificação).

- **Isolamento das bandas capturadas da linhagem subclonal de macrófago A11 - *EcoR I***

Como o padrão das bandas provenientes da captura, visualizadas em gel de agarose, se assemelhavam, independentemente da estratégia de amplificação adotada, optou-se por realizar o isolamento dos produtos de PCR que apresentaram melhor definição de bandas após eletroforese. Desta forma decidiu-se realizar o isolamento das regiões de integração obtidas da reamplificação da região 1-2 kb com a enzima *Tth*-polimerase (**Figura 22**). Para tanto, aproximadamente 20 ng desse produto de amplificação foi radiomarcado e separado em gel de acrilamida desnaturante, como descrito em Material e Métodos que resultou no padrão mostrado na **Figura 23**.

As 12 primeiras bandas, em ordem decrescente de tamanho, foram isoladas e analisadas em gel de agarose e por *Southern blot* com sonda de kDNA. O resultado desse experimento está ilustrado na **Figura 24**. Nota-se que todas as bandas apresentaram sinal de hibridação positivo. Algumas, porém, mostraram além da banda principal, bandas adventícias menores. Para descartar estas bandas menores, realizou-se o reisolamento da banda principal a partir do gel de agarose. Estas bandas foram submetidas à nova eletroforese em gel de agarose e analisadas *Southern blot* com sonda de kDNA, confirmando-se a purificação. Curiosamente, estas mesmas bandas purificadas, quando reamplificadas a partir do adaptador, mais uma vez geraram bandas adventícias menores, no mesmo padrão observado anteriormente.

- **Clonagem das bandas isoladas**

As bandas reisoladas do gel de agarose foram clonadas em aceptor no sítio de *EcoR V* do vetor PCR 2.1 e utilizadas na transformação da DH5 $\alpha$ . As colônias selecionadas para extração do plasmídeo, apresentaram tempo de crescimento e aspecto característicos de *E. coli*. A **Tabela II** mostrou o tamanho dos insertos recuperados de cada transformação, bem como o número de clones analisados. Todavia, apesar das diversas tentativas não foi possível obter transformantes das bandas 4 e 5, em nenhuma das hospedeiras testadas (DH5 $\alpha$ , Sure Cells, CES210, XL1BlueMRF). As clonagens dos segmentos de tamanhos superiores ou igual a 700 pb geraram insertos contendo kDNA de tamanho igual ou inferior a 600 pb. Obteve-se apenas um clone com fragmento de 1.200 pb, originado da clonagem da banda 7 denominado de B7.

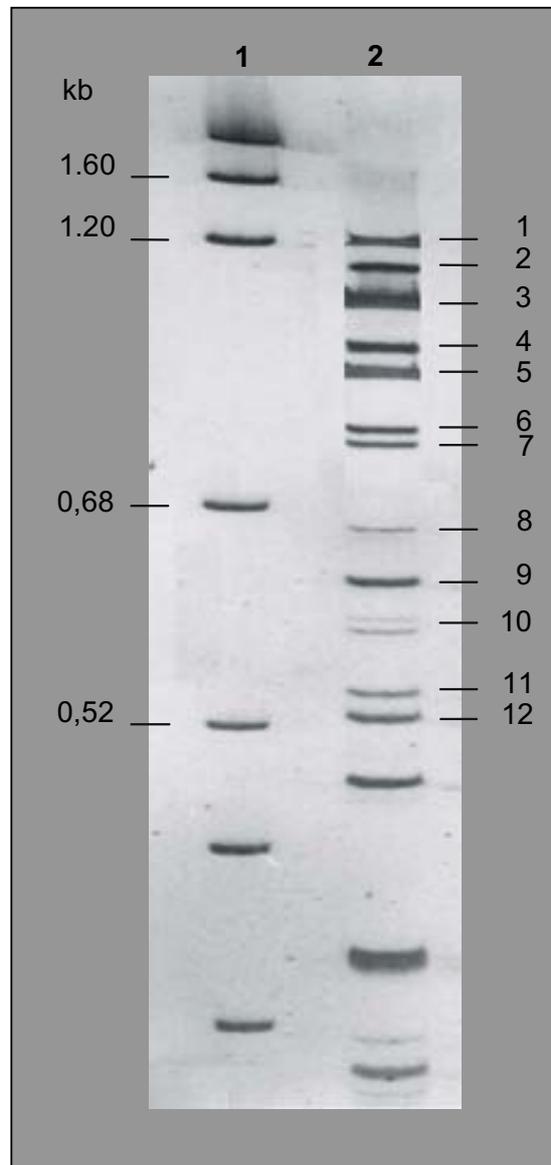
## RESULTADOS

---

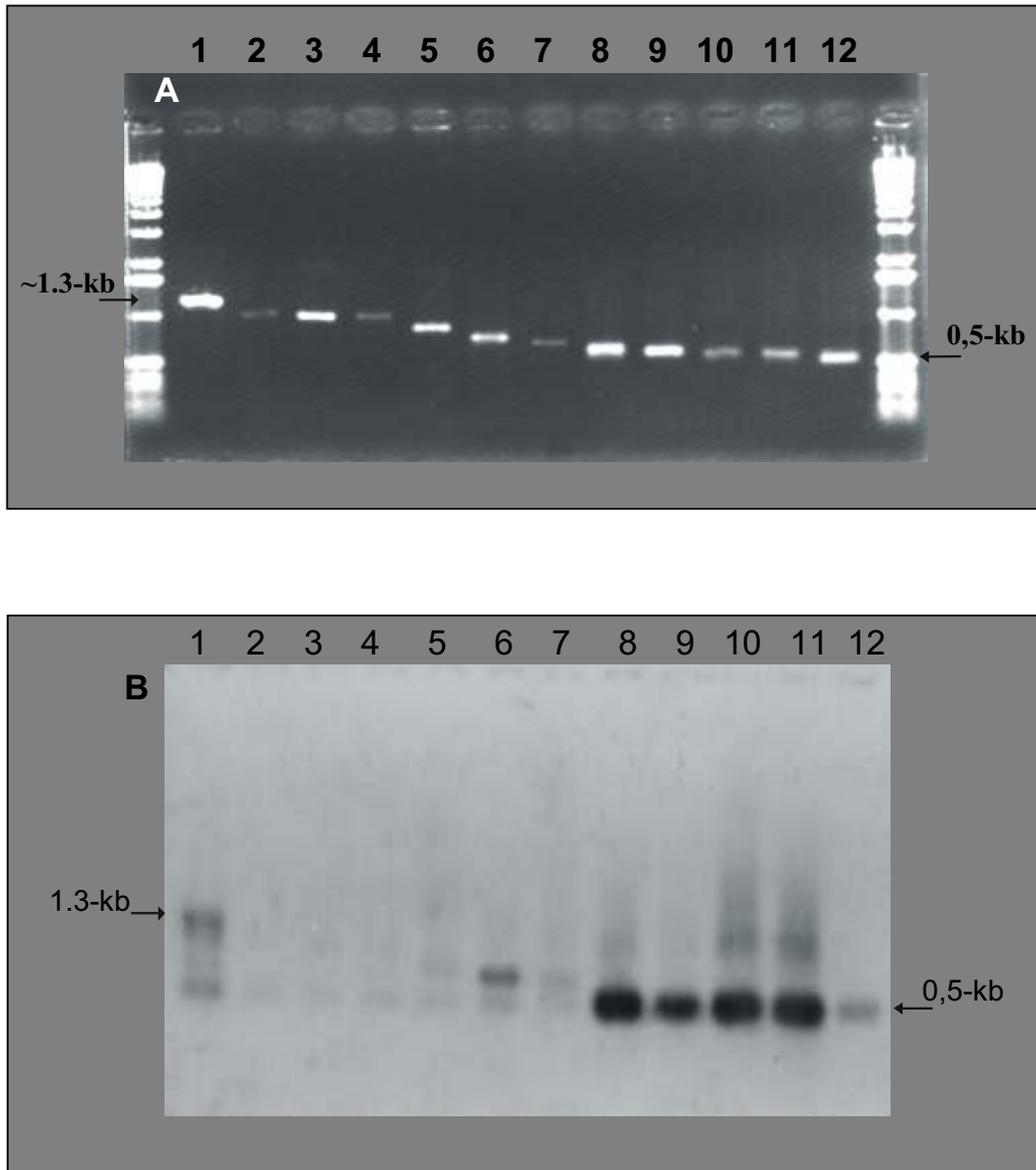
Apesar do sinal positivo com a sonda de kDNA prévio à clonagem, a banda 6 produziu clones somente com hibridação negativa, sendo que três insertos apresentaram tamanho próximo ao esperado de 700 pb, um menor com 600 pb, e dois clones aparentemente sem insertos. A banda 7 gerou no total 12 clones, com padrão de digestão parcial quando digerido com a enzima *EcoR* I: quatro com insertos no tamanho esperado, um menor com 500 pb, dois plasmídios sem insertos quatro com plasmídios com tamanho inferior ao esperado, todos negativos para kDNA, e apenas um clone positivo denominado B7, com tamanho superior ao esperado (1.200 pb). Os clones provenientes da banda 8 forneceram plasmídios com seqüências positivas para kDNA. A maioria dos plasmídios provenientes da clonagem das bandas 6, 7, e 8, quando digeridos produziram padrão semelhante a uma digestão enzimática parcial (**Figura 25**). Este resultado foi reproduzido com preparações plasmidiais provenientes de diferentes métodos de extração (Lise Alcalina, Wizard, ou Maxiprep) e sugere rearranjo e população mista de plasmídios.

Foram selecionados doze transformantes para o seqüenciamento, oito destes positivos para kDNA em *Southern blot* e quatro negativos. As seqüências obtidas foram comparadas entre si e analisadas em banco de dados do sistema BLAST. O seqüenciamento do DNA capturado mostrou a presença do adaptador nas duas extremidades do segmento. Entretanto, na maioria dos casos verificaram-se alterações no adaptador do flanco próximo ao sítio M13-Reverse do vetor (**Figura 26**). Nos clones 1B, 2C, 10C e 11B e 11E 9G e F, observou-se a ausência do sítio *EcoR* I do adaptador. O clone 7E apresentou inserção de 15 bases (5' AGCCGAATTCGGCTT 3') entre o sítio de clonagem do vetor e o início do adaptador no lado próximo ao sítio M13-Reverse. As 10 primeiras bases da inserção (5' AGCCGAATTC 3') correspondem em seqüência a duas regiões presentes no sítio de clonagem do vetor PCR2.1: 1) bases 292 – 283, na orientação invertida e complementar em relação a M13, 2) bases na orientação direta 295 – 304, região próximo ao T7-Promoter. As 5 bases subseqüentes (5' GGCTT 3') correspondem às posições 289 – 293, ou: 290 – 285 do vetor. Observa-se a ausência da última base do sítio *EcoR* I do adaptador.

Dentre os clones que apresentaram sinal positivo com sonda de kDNA, apenas o 12A não mostrou seqüências de região conservada, sugerindo que a captura e hibridação se deram por similaridade com a região variável de minicírculos. Os demais positivos, incluindo o clone B7, mostraram regiões conservadas completas, com identidade na faixa de 95% em relação aos consensos depositados em bancos de dados (acessos gbIM18814I; gbIM19188I; gbIM19187I), intercaladas por segmentos repetidos curtos não superiores a 50 pb, com seqüência de bases semelhante às obtidas dos subclones de macrófagos C4 e C6 (**Figura 14 a, b, e d**).



**Figura 23.** kDNA da banda A11-3,2 kb capturado e eluído em ddH<sub>2</sub>O amplificado com os iniciadores do adaptador. Linha 2. Padrão das bandas obtidas, em gel de acrilamida 3,5 %, da reamplificação da região 1-2 kb. As 12 primeiras bandas foram isoladas do gel de acrilamida; Linha 1. padrão molecular 1 kb ladder BRL Gibco.

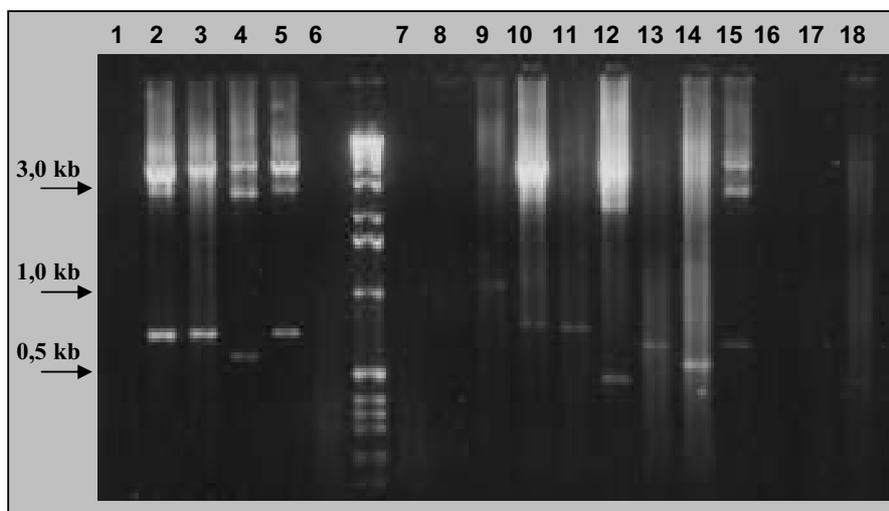


**Figura 24.** kDNA do macrófago A11-3,2 kb capturado e eluído em ddH<sub>2</sub>O após purificação das bandas do gel acrilamida 3,5%. As 12 bandas isoladas individualmente foram reamplificadas com os iniciadores do adaptador. A) Visualização em gel de agarose das 12 maiores bandas isoladas do gel de acrilamida. B) Hibridação do mesmo gel, por *Southern blot*, com a sonda de região conservada de 122 pb; observa-se o sinal positivo, em diferentes intensidades, em todas as bandas analisadas, após lavagem das membranas em estringência máxima de SSC 0,1X e SDS 0,1 %. A 65°C/ 20 min.

## RESULTADOS

**Tabela II.** Comparação entre os tamanhos dos segmentos de kDNA em pares de bases (pb) do macrófago A11-3,2 kb bandas 1 a 12 (B1 a 12 – Figura 25) isolados do gel de acrilamida antes e após a clonagem no vetor PCR 2.1 e multiplicação na hospedeira a bactéria *E. coli* DH5  $\alpha$ .

Nome	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	D1
N <sup>o</sup> de clones analisados	12	12	12	0	0	6	12	8	8	6	6	6	2
Tamanho das bandas isoladas da acrilamida	1300	1200	1100	950	900	800	770	650	630	600	580	520	570
Tamanho do inserto recuperado após clonagem	600	600	600	0	0	750	750 1200	600	600	600	550	500	450
Positividade das insertos isolados da acrilamida (Sonda 122 minicírculo de kDNA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positividade dos insertos recuperados após clonagem (sonda 122 de minicírculo de kdna)	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-



**Figura 25.** Padrão de migração dos segmentos de kDNA capturados do A11-*EcoR* I após clonagem no vetor PCR 2.1 multiplicação na hospedeira a bactéria *E. coli* DH5  $\alpha$ . Os plasmídios isolados foram digeridos com enzima de restrição *EcoR* I para a liberação dos insertos do vetor, e submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1,0%. Linhas 1 a 6, insertos originados da clonagem da banda B6 (800 pb); Linhas 7 a 12, insertos originados da clonagem de B7 (770 pb); Linhas 13 a 18, insertos originados da clonagem de B8 (650) pb.

## RESULTADOS

## Clone 6-1

Adaptadores e sítio de clonagem do vetor normais

(Extremidade M13 do vetor)

```

ACTAGTAACG GCGGCCAGTG TGCTGGAATT CCGCTTCGAT GCGGCCGCTC GAGAGAATTC
1  TAATTTATCC GTGTCTACTT TGTGCTTTTA ATAGCACACA TGAAACCATT TTTATTGAAT
61  TTGGTCAGTT TTTGTCCNTA TAAATTGGGG GAAAGTAGCT GTTCATCATA GTCAAGTCAC
121 AGGAGTCGAC TGTGCAATGG AGTTCNTCAT GTNTTCCAAT TCTGTGCCGT CAGCTGCCTG
181 GCATCGTGGG GCTTCCGTTT TGCCTTAAAG GGTGTGTGGA ACCACAGAGG CATAGGTGGA
241 CAAGAAC.....
1  GTAAACACCT TGCCGCTGCC CCTGCTATTG AAAAAANANA ACCGTGAANA GCTCGGNATG
61  GTCTCTGCCA CTGCAGGCAT CGATGGTGGA AGCTGGAAGC CGGGCTGTAG TGTGACGTGG
121 CAAGACACAC TTAAGGCCTG CTGAGGCACT GGGAGCTGTG GATGCAACCG TGGGGTATTA
181 AGAGGAGACT TTCAGCCATT CCTAGATCCC CTCCAGGAA NNACTGAGAG ACAGAGTCCA
241 CGTTTCTGAN GAGGTTGAAT TCTCTCGAGC GCGCCGATCG AAGCCGAATT CTGCAGATAT
CCATCACACTG GCGG
(Extremidade T7 do vetor)

```

## Clone 7E

Alteração no vetor próximo ao sítio *EcoR* I do flanco M13.

(Extremidade M13 do vetor)

```

TG GAATTCGGCT TAGCCGAATT CCGCTTCGAT GCGGCCGCTC GAGAGAATT↓
1  GTGAGCAGCT TGGCTCGGAT ATTTGTNNCA AAATGCCGGT TTCATCTGCT TTCGGGTAAA
61  AACGCATACG TGTACTAACC AACAATTAAC AGATGCGTTA TACTTTAATA ATAGCCGTAA
121 CCGTACGTTG GAAGTTCTTT ATAAGTGTTC TTCCATACAT TTGGAACAAT GATAATGGTT
181 AGTTTTTCAC CATAACAATTG TACCACTCGA ACCGAAGTTT TATGACGCAT GTTACGAGTT
241 GCTTGTGCAA CTCTCACTCC CGATGT.....
1  TGGTCGTAAA NCAACCAACG TTGTGGCTTT ACCTAATGCT TCTTACCTGA CCTAAAATAC
61  AATGAATTTA AAGTTTTTGG TGCCTGTTCT GCAAAAATAG TGCTTTTGCA TCTTCAATTT
121 GTGCAAAAAC AGTTTCAGTC ATACGGTCAT GAAGTACTTG TTTTACTTCA TTAGGAAATT
181 TCAGAAAACAC CTTTTAAAGT GAATNAAAAB ACCACGTTCT AAACGGTGGG ACTGGAGTAT
241 TACAGTTTTT GAAAATGTCA GTCGCTTTAG ATGACCAAGG TGAAATCGTA CCCACACGTG
301 GTGTTACTAA AATCTGAATC TCATCACTTG CTGGTTGACG AAGTTCAAAA GACTCACCGT
361...CATTTAAT A ATTCTCTCGA GCGGCCGAT CGAAGCCGAA TTCTGC
G
(Extremidade T7 do vetor)

```

## Clone 9G

Ausência do sítio *EcoR* I do adaptador próximo ao M13 do vetor.

(Extremidade M13 do vetor)

```

TCCACTAG TAACGGCCGC CAGTGTGCTG GAATTCGGCT TCGATGCGGC CGCTCGAGAG
1  CTCAGGGGTA CTGGTTAGTT CATATTGTTG TTCCACCTAT AGGGTTGCAG CTCCCTTTAG
61  CTCCTTGGGT ACTTCTCTA GCTCTACCAT CGGGGGCCCT GTGAATCCAT CCAATAGCTG
121 ACTGTGAAGC ATCCACTTCT GTGTTTGCTA GGCCCCGCA TAGTCTCACA AGAGAGAGCT
181 ATATCTAGGG ATCCTTGAG CAAAATCTTG CTAGTATACC ACAATGGTAT CAGCATTTGG
241 AAGCTGATTA TGGGATTGAN CCTGGATATG GCAGTCTCTA GATGGTCCAT CCTTTCGTCA
301 CAGCTCCAAA CTTTGTCTCT GTAACCTCTT CCATGGGTGT TTTGTTCCAT ATCTTGAGAT
361 TTTCTAAAATA CCAGCATPCA TCGCTATAAA GTTTCCTTCT TTCACCTGAC TTGGCTAATA
421 ATCTCAAGGA AGTTCTGGTA ACATGTGTTT CATCTGTTTC TAGGAACATT TTTGTTTTAT
481 TATTTATTTT TTGAGATTTT AATATAGTTA TATCATTTCT TCTTTACTTT CCTCNCCAA
541...ATCATCTCAT AACCTTCAT TCTCTTTTGA ATTCTCTCGA GCGGCCGAT CGAAGCCGAA
601 TTC
(Extremidade T7 do vetor)

```

## RESULTADOS

**Clone 9F**

Ausência do sítio *Eco* R I do adaptador próximo ao M13 do vetor.

(Extremidade M13 do vetor)

CCACTAG TAACGGCCGC CACTGTGCTG GAATTCNGCT TCGATGCGGC CGCTCGAGAG

1 CTCAGGGGTA CTGGTTAGTT CATATTGCTG TTCCACCTAT AGGGTTGCAG CTCCCTTTAG  
61 CTCTTGGGT ACTTTCTCTA GCTCTGCCAT CGGGGGCCCT GCGATCCATC CAATAGTCTGA  
121 CTGTGTAGCA TCCACTTCTG TGTTTGCTAG GCCCCGGCAT AGTCTCACAA GAGAGAGCTA  
181 TATCTGGGNC CTTTCAGCAA AATCTTGCTA GTATACCACA ATGGTATCAG CATTTGGAAG  
241 CTCATTATGG GATTGANCCT GGATATGGCA GTNCTACATG GTCATCCTTT CGTCACAGCT  
301 CCAACTTTG TNCNGTGAC TCCTTCCATG GGGTGTNTG GTTCCCATAT CTCAGATTTN  
361 NTAATATCCA GCATTCATCG CTATAAAGTT TACTTACTTT TCACCTGACT TGGCTATATC  
421 TCAGGAGTTC TGGTAGATGT GTTTCA

**Clone 12A**

Alteração no vetor próximo ao sítio *Eco*R I do flanco M13.

(Extremidade M13 do vetor)

G TGCTGGAATT CCGCTTCGAT GCGGCCGCTC GAGAGAATT.

1 ACACATTTCA ATCAATAAGC TGTCTAAGCC GTTTTGGTAC ATATCATTGC GGGCATCTTG  
61 AAATGTACGA TCCCAAATTG CTTTCAATT TGCTCAGGTC GACTTGGGCC ACAAAGTGC  
121 ATCACTCCAA CCATGGTCAT CACGAGCAAT GGAAGCCATG ACACGCCAA GGTCCGAGTA  
181 CAATACATTG GAAGCTTTTA AATAGGCGGT GTGTTGCCCT TTTAACTGT CGGGCATGTT  
241 AAAACGTTCA AGCACATCGG CAGCATTTAC ACAAACAAA GAAACATTTG CCTGAGCGCC  
301 AAGCGAAGTG AATTTCAAGG AATTAGTTCC CTTTGAAGT ACGACCCGAC CCAAGTGATG  
361 TCCTCCGGGT TAAAAGTTTA ATCCGAAATC GGCCTTGCTT GTTATGATGA ACTGCATGTG  
421 TTCATTAGCC TACTTCTCT GTCGGANAGT TTAGACTTNN NNNNNAATTC AGGTGTAGTT  
481 TGCTAGGAAG CTG

**Clones 1B e 2C**

Ausência do sítio *Eco*R I do adaptador próximo ao M13 do vetor.

(Extremidade M13 do vetor)

TGCTG GAATTNNCT TCGATGCGGC CGCTCGAGA.

1 GGCTTATAAT GTACGGGGGA GATGCATGAA TTTCCGGCC AAAATCTGAA CGCCTCCCA  
61 AAATCAAAAT TCTGCCAAGT TTTCAGCAC TCCATTTACC ATAAAACAC CACAACATC  
121 ACCAACTCT CTATTACACC AACCCCAATC GAACCCACC TCCCGTAAAC ACCCCCACT  
181 TTCGGCCAAA TAATGTACGG GGGAGATCGA TGAAGTTTTG CCGCCAAAAT CTGAACGCC  
214 TCCAAAATC AAAATTCTGC CAGTTTTAC CACCTCCATT TGACCATAAA ACACCACAAA  
301 CTATACCAA ACTCTTATA TTACAACCAA ACCCAATCG AACCCGACC TGCCGTTAAA  
361 ACGAAGGCCG G.....

**Clones 10C, 11B e 11E**

Ausência do sítio *Eco*R I do adaptador próximo ao M13 do vetor.

(Extremidade M13 do vetor)

CT GGAATTCGGC TTCGATGCGG CCGTCGAGAG

1 GCTTATAANG TACGGNGGAG ATGCATGAAT TTNCCGGCCA AAATCTGAAC GCCCTCCAA  
2 AATCAAAAT GCTGCCAGTT TTNTGCAGCA CCTCCATTTA CCATAAACA CCACAATAT  
121 CACCAAACCT TCTATACTGA CACCAACCC AATCGAAGCC CCCACCTCC CGTTAAACAA  
181 CCCCACCTT TCGCCTAAT AATGTGACGG GGGAGATGCA TGAATTTTGC CGCCAAAATC  
241 TGAACGCCCC TCCAAAATC AAAATTGCTG CCAAGTTTTC AGCGACCTCC ATTTGACCGA  
301 TGAAAAGCG ACCACCAACC TATGCACCA AAATCTCTA TATTGACACC AACCCCAATC  
361 GAAGAAAGCC CAGCCTGCC GTTTAAACGA AGCCCCACT TTACGGCCAA ATAAATGTAC  
421 GGGGGAGATG CATGGATTTT CCCGGNCGAA AAATCTGGAG GNCCCTCCG AAAAGCAAAA  
481 TTCTGCAAGT TTCAGCAGG NCNATTTACC ATAAAACACC ACAACTATCA CTAGANGCTT  
541 GCTGCGTGAT ATTACTACGG AACTTTTCAA TCGAACCAAG CGGAATTC TCAGAGCGCC  
601 GCATCGAAG CGAATTC

(Extremidade T7 do vetor)

## RESULTADOS

## Clone 7-3 (B7)

Extremidade M13 do vetor) GCAGTGTGC TGGAAATTCGG CTT**CGATGCG** GCCGTCGAGA

1 **GAATTC**CTCTG TGGCATAGTT CCCAACTTCG ATGGCTTACC CTGTTACTCA GCAACATCCT

61 AGGACTGTCC ATCCTGCTTG AAAAATAAGG AAGTTGGCCA AAGTTATGGT TCAGAGGGTA

121 ACATACTTGT GGAACAGCAT GAGGGACCTC AGTTTGAATC CCCAGCGACC CTGTAAAAGT

181 CAGTTGTGAC TGTAATAACG GTATCATGCT ATAACTCCAG TTCTGGGAGG CAGAGACAGG

241 TGGGTCCCTG GAGTTCACAA GTCAGTCATC CTATTTCAAT AGATAGTTTT ATGTTCAAGG

301 AAAGGGACTG TCTCAAAATC GAGGAAGATA CACGCACAAC TCTGGTATAC ACACACACAC

361 ACACACACAC ACACACACAC ACACACTCAC ACACAGTTTT CAGCACCTCC ATTTACCATA

421 AAACACCACA ACTATCACCA AACTCTCTAT ATTACACCAA CCCCAATCGA ACCCCACCTC

481 CCGTAAACAA CCCCCACTT TCGGCCAAAT AATGTACGGG GGAGATGCAT GAATTTTCGG

541 GCCAAAATCT GAACGCCCTC CCAAATCAA AATTCTGCCA AGTTTTTCAGC ACCTCCATTT

601 ACCATAAAAA CACCACAACCT ATCACCACAAC TCTCTATTAC ACCAACCCCA ATCGAACCCC

661 CACCCTCCCG TAAACAACCC CCCACTTTCG GCCAAATAAT GTACGGGGGA GATGCATGAA

721 GTTTTGCCCG GAAAATCTGA ACGCCCTCCC AAAATCAAAA TTCTGCCAGT TTTCAGCACC

781 TCCATTTGAC CATAAAACAC CACAAAACCTA TCACCAAAAC CTCTATATTA CACCAACCCC

841 AATGCCCCAA TGCCCAATTC GTAACCCCAT CCTCCCGGTG AAACAACCCC CACTTTCGGC

901 CAAATAAGTT ACGGGGGAGA GCAGGAATTT TCCGTCCCAA AATCTGGAAT GCCCCTCCCA

961 AAAATCAAAA TTCTGCCGAA TTTTTTCAGC ACCTTCCATT TTACCATAAA ACACCACAAC

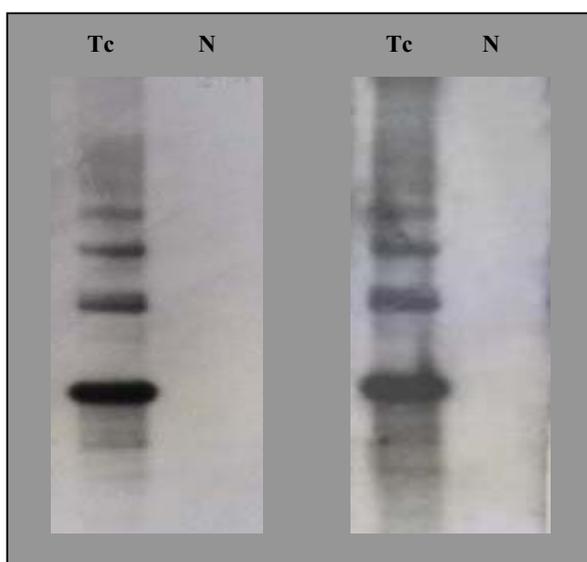
1021 TTATCACCAA ACTTCTTCTA TATTACACCA ACCCCAATCG AACCAAGCCG **AATTC**CTCTCG  
**AGCGGCC GCATCG** .. (Extremidade T7 do vetor)

**Figura 26.** Seqüenciamentos dos segmentos capturados da região kDNA do A11-*EcoR* I, clonados no vetor PCR2.1 na hospedeira DH5 $\alpha$ . Em rosa: seqüência plasmidial; marrom: adaptador; vermelho: região conservada de minicírculo de kDNA; azul: região variável do minicírculo; preto: região sem correspondência significativa às seqüências depositadas em banco de dados; verde: região identificada em *Southern blot* como pertencentes ao DNA humano; sublinhado: sítio *EcoR* I; Clones negativos na hibridação por *Southern blot* com sonda de kDNA: 6-1; 7E; 9G, 9F. Clones com sinal de hibridação positivo com sonda de kDNA: 12A; 1B, 2C, 10C, 11B, 11E, E 7-3 (B7).

#### 4. CARACTERIZAÇÃO DOS MINICÍRCULOS DE kDNA COM REGIÕES VARIÁVEIS ENCURTADAS PRESENTES NOS CLONES DE REGIÕES DA INTEGRAÇÃO.

##### 4.1. Origem das regiões repetidas 50 e 80 pb presentes entre as regiões conservadas de minicírculo.

A hibridação por *Southern blot* do macrófago normal e kDNA com as sondas 50 pb e 80 pb conforme estratégia apresentada na **Figura 6** mostrou que estes segmentos seriam porções de regiões variáveis de minicírculo (**Figura 27**) apesar de não apresentarem o tamanho esperado em relação ao consenso observado STURM et al. (1989).



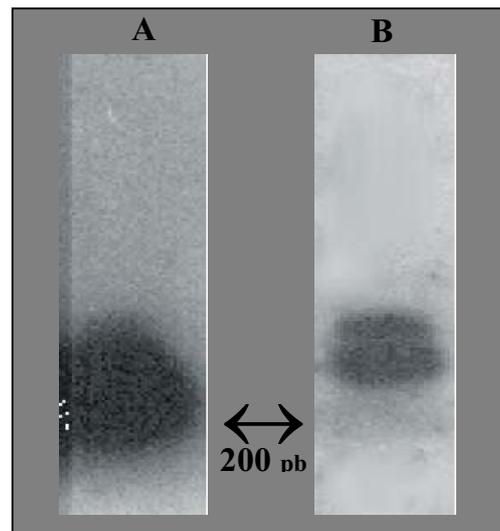
**Figura 27.** Padrão de hibridação em *Southern blot* dos DNAs de *Trypanosoma cruzi* (Tc) e Macrófago humano normal (N) digeridos com *EcoR* I com as sondas 50 pb (A) do clone 1C6 e 80 pb (B) do clone 2C6 isoladas de acordo com estratégia experimental mostrada na Figura 5. As lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo padrão para *Southern blot* descrito no item 9 do material e métodos.

##### 4.2. Instabilidade região variável de kDNA de *Trypanosoma cruzi* que originou o segmento 50 pb

O kDNA amplificado PCR com o par de iniciadores TcVA e TcVs e hibridação com sondas de região conservada de minicírculos (sonda 122 pb) indicou que as regiões variáveis encurtadas observadas nos clones 50 pb teriam no kDNA intacto tamanho equivalente ao esperado do consenso observado por Sturm et al. (1989), ou seja, em torno 200 pb (Figuras 28 a e b). Este segmento de 200 pb quando clonada no vetor PCR2.1 na hospedeira DH5 $\alpha$  resultou em clones com insertos de 50 pb. Os cinco clones seqüenciados apresentaram seqüências semelhantes aos segmentos 50 pb provenientes das linhagens subclonais de macrófago humano.

## RESULTADOS

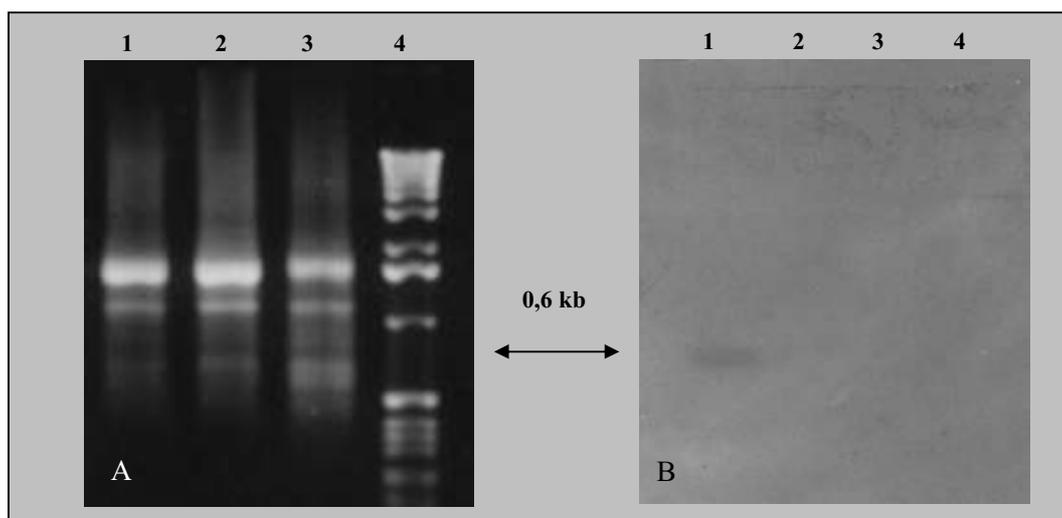
**Figura 28.** Região variável obtida da amplificação, por PCR, do DNA de *T. cruzi*, com os iniciadores da região variável TcVa e TcVs, desenhados a partir das informações obtidas dos minicírculos provenientes das regiões de integração, encurtadas do clone B7. Sinal de hibridação, por *Southern blot*, com as sondas TcVa (A). Mesma membrana hibridizada com a sonda de região conservada de 122 pb (B). Verificou-se que o tamanho da região variável amplificada foi de 200 pb, correspondente ao tamanho do consenso descrito na literatura. O sinal de hibridação observado foi obtido após sucessivas lavagens, sendo a de maior estringência realizada com de 0,1 X SSC e 0,1 % SDS por 20 min a 65 °C.



#### 4.3. Instabilidade genética do minicírculo de kDNA que deu origem às integrações quando clonados

A instabilidade dos minicírculos associados ao evento de integração, quando clonados em diferentes hospedeiras foi observado em diferentes combinações de vetores e linhagens bacterianas hospedeiras. A clonagem dos segmentos de kDNA digeridos e clonados no sítio *EcoR* I do fago  $\lambda$ gt10 nas hospedeiras XL1BlueMRF' e CES201 não gerou clones com sinais positivos em 600.000 placas de lises analisadas. Somente o banco construído em XL1BlueMRF' gerou placas com sinal de hibridação positivo com a sonda TcVA. Contudo verificou-se o rareamento do sinal nas seleções para o seu enriquecimento o que impossibilitou o isolamento do vetor com a inserção desejada.

Através da técnica de captura com a região variável de 50 pb imobilizada, isolou-se um segmento de minicírculo com 600 pb, com sinal positivo com a sonda TCVA em *Southern blot* (**Figura 29A e B**). A clonagem do produto capturado em DH5 $\alpha$  não gerou bactérias recombinantes positivas para esta sonda em 360 colônias analisadas.



**Figura 29.** Captura, a partir do DNA de *Trypanosoma cruzi*, das regiões variável de minicírculo de kDNA observada nos subclones de macrófago. A) Visualização do produto em gel de agarose 1%, após amplificação por PCR com iniciadores do adaptador: Linha 1. Eluído 2X SSC e SDS 0,1%; Linha 2. Eluído 0,1X SSC e SDS 0,1%. Linha 3. Eluído em H<sub>2</sub>O; Linha 4. Marcador de peso molecular. B) *Southern blot* do mesmo gel com a sonda TCVA, da região variável de interesse. O sinal de hibridação é observado após lavagem à estringência máxima de 0,1 X SSC e 0,1 % SDS por 20 min a 65 °C.

#### 4.4. Caracterização do segmento híbrido humano e minicírculo de kDNA do clone B7

A **Figura 30** mostrou a seqüência completa do clone B7 comparada às seqüências depositadas em banco de dados. A região compreendendo 1 a 396 apresentou similaridade na ordem de 98% com o acesso genbank gb|AC131797.3| do cromossomo 1 de camundongo. As bases 397 a 1075 tiveram origem em minicírculos de kDNAs. Esta região apresentou região variável encurtada com aproximadamente 50 pb similar as descritas anteriormente. No ponto de junção entre os genomas observa-se a presença de um segmento com aproximadamente 50 pb (posição 220 a 270) com similaridade ao elemento *Alu*, seguido de um microssatélite com 22 repetições CA e o início da primeira repetição da região variável/região conservada de minicírculo de kDNA.

A seqüência B7, analisada com o auxílio do programa Signal Scan, mostrou a presença de alguns consensos regulatórios da expressão gênica na região humana (Elemento AP1, Sítio AP3, Sítio AP1 invertido, seqüência TATA, elemento APOB) e outros na região de kDNA (sítio CAAT, Sítio AP3).

Confirmou-se a junção do kDNA com o DNA hospedeiro na célula A11 intacta através da amplificação por PCR a partir de iniciadores da região humana e de minicírculo, conforme observado na **Figura 31a**. Este resultado foi confirmado posteriormente por *Southern blot* com sondas da região humana e kDNA (**Figura 31 b**). De interesse, observou-se que a amplificação da região híbrida a partir

## RESULTADOS

dos iniciadores de minicírculo e do DNA humano ocorreu apenas na última das quatro partidas de cultivo da linhagem subclonal A11.

## Clone B7 (1075 pb)

```

1      GAATTCTCTG TGGCATAGTT CCAACTTCG ATGGCTTACC CTGTTACTCA GCAACATCCT
61     AGGACTGTCC ATCCTGCTTG AAAAATAAGG AAGTTGGCCA AAGTTATGGT TCAGAGGGTA
121    ACATACTTGT GGAACAGCAT GAGGGACCTC AGTTGAATC CCCAGCGACC CTGTAAAAGT
181    CAGTTGTGAC TGTACTACAA GTATCATGCT ATAACTCCAG TTCTGGGAGG CAGAGACAGG
241    TGGGTCCCTG GAGTTTCAAA GTCAGTCATC CTATTTCAAT AGATAGTTTT ATGTTCAGGG
301    AAAGGGACTG TCTCAAAATC GAGGAAGATA CACGCACAAC TCTGGTATAC ACACACACAC
361    ACACACACAC ACACACACAC ACACACTCAC ACACAGTTTT CASCACCTCC ATTTACCATA
421    AAACACCACA ACTATCACCA AACTCTCTAT ATTACACCAA CCCCAATCGA ACCCCACCTC
481    CCGTAAACAA CCCCCACTT TCGGCCAAAT AATGTACGGG GGAGATGCAT GAATTTTCCG
541    GCCAAATCT GAACGCCCTC CCAAATCAA AATTCTGCCA AGTTTTCAGC ACCTCATTT
601    ACCATAAAA CACCACAACT ATCACCAAAAC TCTCTATTAC ACCAACCCCA ATCGAACCCC
661    CACCCTCCCG TAAACAACCC CCCACTTTCG GCCAAATAAT GTACGGGGGA GATGCATGAA
721    GTTTTGCCGC GAAAATCTGA ACGCCCTCCC AAAATCAAAA TTCTGCCAGT TTTCAGCACC
781    TCCATTTGAC CATAAAACC CACAAAACTA TCACCAAACT CTCTATATTA CACCAACCCC
841    AATGCCCCAA TGCCCAATTC GTAACCCCAT CCTCCCGGTG AAACAACCCC CACTTTCGGC
901    CAAATAAGTT ACGGGGGAGA GCAGGAATTT TCCGTCCCAA AATCTGGAAT GCCCCTCCA
961    AAAATCAAAA TTCTGCCGAA TTTTTTCAGC ACCTTCCATT TTACCATAAA ACACCACAAC
1021  TTATCACCAA ACTTCTTCTA TATTACACCA ACCCAATCG AACCAAGCCG AATTC

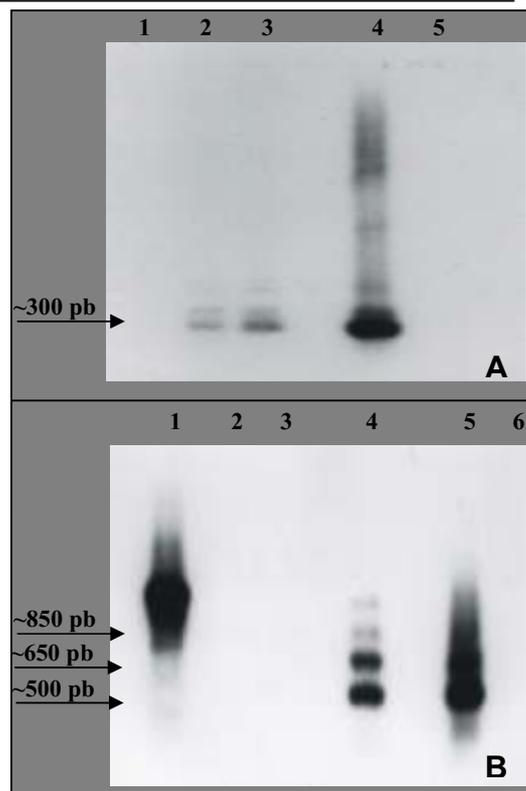
```

Sítio AP1 invertido     
 CAAT box     
 TATA box     
 Sítio AP3  
 Elemento APOB     
 Elemento AP1

**Figura 30.** Seqüência completa do clone B7 (excluído os adaptadores), analisada quanto à identidade com seqüências depositadas em banco de dados, e consensos regulatórios. Caracteres verde, região humana com 98% de identidade à região do cromossomo 1 murino genbank gb|AC131797.3|; em negrito, seqüência com identidade de 85% ao elemento *Alu*, acessos THC131610 e THC210708; sublinhado, repetição do tipo CA; negrito itálico, intercessão. Caracteres vermelhos, região conservada de minicírculo de kDNA (identidade de 95% em relação aos acessos gbIM18814I; gbIM19188I; gbIM19187I). Caracteres azuis, região variável de minicírculo. Retângulo Azul - sítio CAAT, Amarelo - Elemento AP1, Cinza - Sítio AP3, Rosa - Sítio AP1 invertido, Vermelho - seqüência TATA Verde: elemento APOB; Elementos AP1 protegem CpG de metilação GGGCGG E CCCGCC.

## RESULTADOS

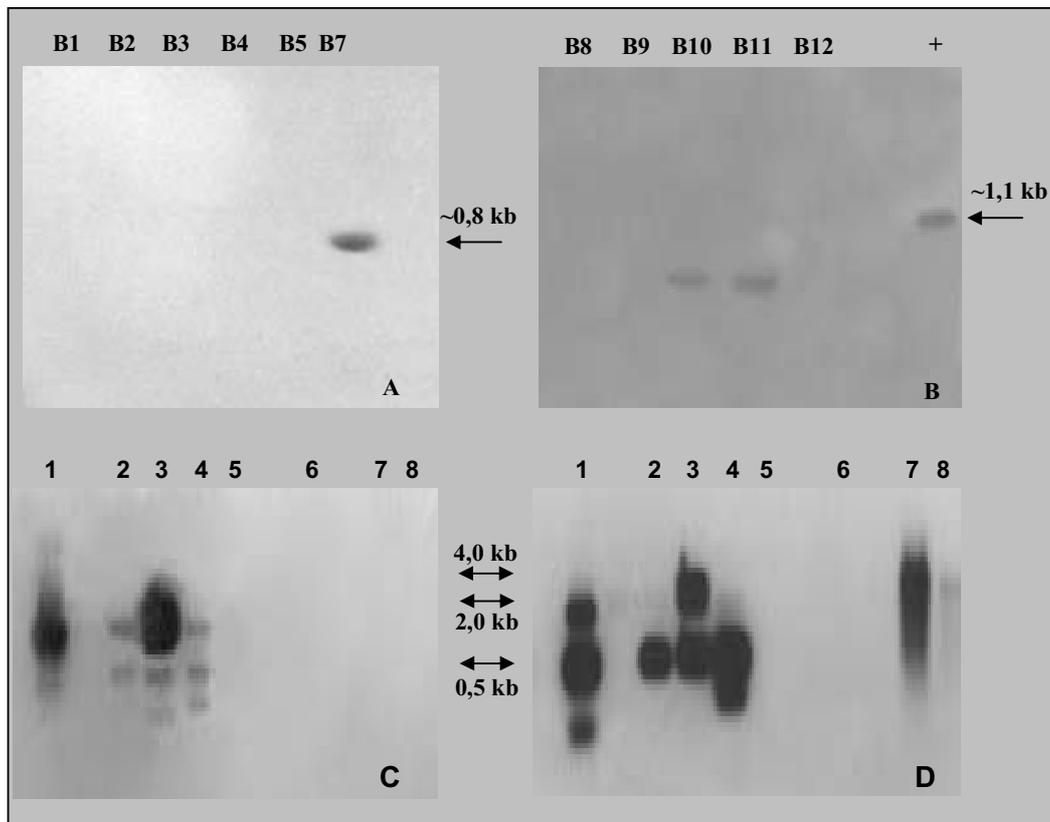
**Figura 31.** Confirmação da origem híbrida humano/*T. cruzi* do clone B7 através de amplificações por PCR do DNA de *T. cruzi*, macrófago humano normal, Linhagem subclonal A11 seguido da confirmação da especificidade da amplificação por hibridação por *Southern blot* com sonda interna à amplificação, de acordo com estratégia experimental mostrada na Figura 5. A) Amplificação da região humana com os iniciadores IS e sat2 observam-se o sinal positivo de hibridação com a sonda humana 396 no produto proveniente do macrófago normal (2) e do A11 (3), e ausência do sinal no DNA de *T. cruzi* (1), o controle positivo da amplificação e hibridação foi o clone B7 (4), controle negativo da amplificação (5). B) Amplificação da região híbrida com os iniciadores IS e SK36; nota-se a positividade de hibridação com a sonda humana 396 somente no A11 intacto (4); e ausência de hibridação no *T. cruzi* (2) e no macrófago normal (3); controle positivo de hibridação (1) e de amplificação (5), controle negativo da amplificação (6).



#### 4.5. Confirmação da presença da região B7 no genoma da linhagem subclonal de macrófago A11 intacto

Como o tamanho do clone B7 não estava compatível com o esperado da clonagem da banda 7 (em torno de 800 pb), a região humana do clone foi isolada para ser utilizada na hibridação das bandas capturadas. O resultado apresentado na **Figura 33a** mostrou a presença de sinal positivo de hibridação na banda 7 e inesperadamente nas bandas 10 e 11 (**Figura 33b**). Estas bandas originaram unicamente clones com minicírculos de kDNA, com regiões variáveis de 50 pb, com seqüência semelhante à região de kDNA do clone B7.

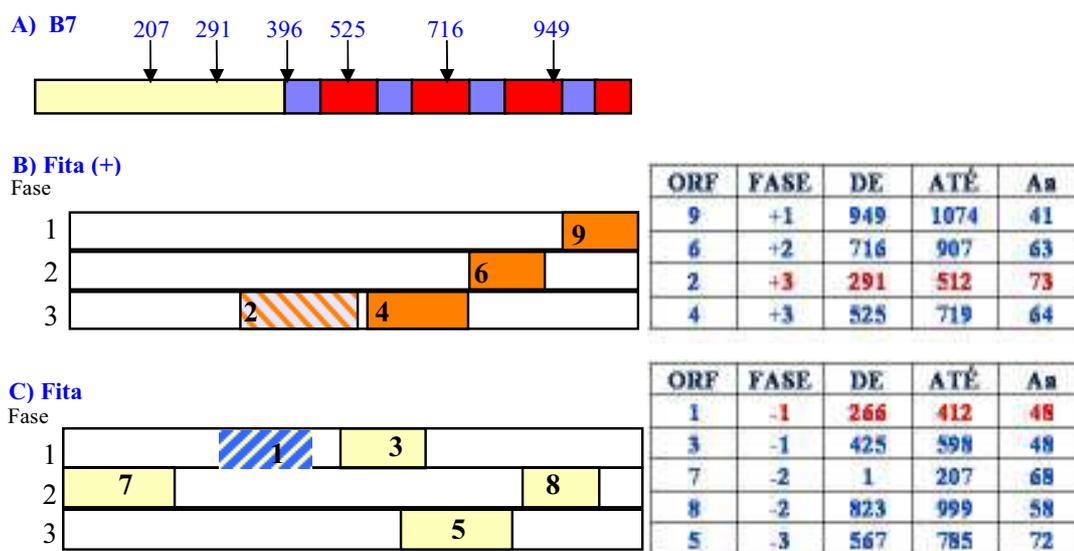
De interesse, a captura de kDNA a partir de tecido cardíaco de coelho chagásico digerido com *EcoR* I através do mesmo procedimento experimental empregado para capturar as integrações de A11 *EcoR* I resultou em produtos com sinal positivo de hibridação por *Southern blot*, tanto com a sonda 122, como com a sonda da região humana isolada do B7 (**Figura 33c e d**). Enquanto que a captura da região de integração correspondente a posição 7 kb do DNA A11 digerido com *Cla* I resultou em sinal positivo para kDNA e negativo para a sonda humana (**Figura 33c e d**).



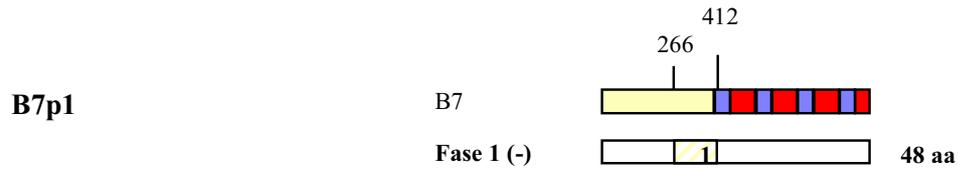
**Figura 32.** Segmentos de kDNA capturados dos genomas de macrófago A11 e do tecido cardíaco de coelho chagásico (Nadjar Nitz – dados não publicados), após amplificação por PCR a partir dos adaptadores e hibridação por *Southern blot* com a sonda da região humana (sonda 296) do clone B7 (A, B, C) e com a sonda 122 da região conservada de minicírculo (D) A) Padrão de hibridação com a sonda 296 dos segmentos capturados e purificados em acrilamida do A11-*EcoR* I, (Figura 25) bandas 1 a 5 (B1 a B5) e 7 (B7), observa-se a presença do sinal positivo somente na banda 7 (B7) e B) padrão de hibridação das bandas 8 a 12 (B8 a B12) com as sonda 296 da mesma captura purificada da acrilamida (Figura 25), nota-se o sinal positivo de hibridação nas bandas 9 (B9) e 10 (B10) e no controle positivo de hibridação B7 (+). C) Padrão de hibridação com a sonda 296 dos segmentos de kDNA capturados a partir do genoma de coelho chagásico digerido com *EcoR* I (1 a 5) e do kDNA capturado da região de integração presente na banda 7 kb do DNA do A11 digerido com a enzima *Cla* I (7 e 8), onde (1) corresponde à captura eluída na solução 2X SSC, SDS01% 20 min a 65 °C; (2) material capturado na eluição em H<sub>2</sub>O (1 hora a 65°C), (3) obtido da eluição em H<sub>2</sub>O (durante a noite a 65°C); (4) e em formamida (1 h/ 65 °C), (7) DNA de A11 recuperado da eluição com H<sub>2</sub>O; e (8) com 0,1X SSC e 0,1% SDS. Observa-se complementaridade com a sonda humana somente nas bandas recuperadas do tecido de coelho, após lavagem das membranas na estrigência máxima de 0,1 SSC e 0,1 % SDS à 65 °C por 20 min. Linha 6: controle (-) de amplificação. D) Mesma membrana hibridizada com sonda a 122 observa-se sinal positivo de hibridação tanto nos segmentos capturados do coelho como capturados do A11- *Cla* I.

#### 4.6. Análise das Fases Abertas de Leituras (ORFs) do clone B7

A análise da sequência do clone B7 mostrou a presença de sete possíveis ORFs completas e de duas incompletas faltando o código de terminação. A **Figura 33** apresenta de forma esquemática a origem, posição relativa no clone B7 e o número de resíduos de aminoácidos das proteínas hipotéticas codificadas pelas nove ORFs. De interesse, observa-se que duas estão localizadas na região de interseção dos DNAs humano/*T. cruzi*: ORF1 - fita (-) fase 1 e ORF2 - fita (+) fase 3 e codificariam proteínas com 48 aa (B7p1) e 73 aa (B7p2) respectivamente. A pesquisa de homologia em banco de dados do sistema Blastp mostrou alto grau de significância (Score = 46%, e “E” =  $2e-5$ ) entre a B7p2 e a região do sítio ativo do fator de sinalização nuclear (NLS-binding protein) da família spot-1 de camundongo (acesso bbsI 170532) e também com um segmento da proteína óxido nítrico sintase induzida de rato (acesso pir I 155615, Score = 43%, E=  $2e-04$ ). Os resultados mais significativos das demais fases de leitura foram agrupados na **Figura 34**.



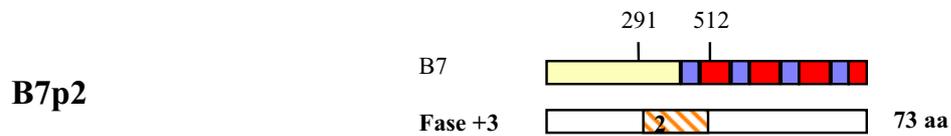
**Figura 33.** Posicionamento e tamanho das diferentes fases abertas de leitura encontradas no clone B7 (ORFs). A) Esquema do clone B7 identificando as regiões conservada e variável do minicírculo de kDNA e a humana, respectivamente, pelos retângulos vermelhos, azul e amarelo; a numeração mostra, em pares de bases, a posição do início das ORFs encontradas nas fitas positiva (B) e negativa (C) do clone. B) Fases de leitura das ORFs presentes na fita (+) do clone B7, identificando a posição da base nitrogenada que dá início e fim da ORF, bem como o número de resíduos de aminoácido (Aa) da cadeia polipeptídica. C) Fases de leitura das ORFs presentes na fita (-) do clone B7, identificando a posição da base nitrogenada que dá início e fim da ORF, bem como o número de resíduos de aminoácido (Aa) da cadeia polipeptídica.



a-1) - gi I 1840087 - 39 kDa antigen [Leishmania donovani]  
 (Score (bits) = 42; E (value) = 5e -04; positives = 22/36 - 60%; 322aa)

C 3 - VLKTVCEVCVCVCVCVCVYTRVVRVSSSILRQSL - 38  
 S - VL VC CVCVCVCVCVCV V +S+ R S  
 P - 188 - VLARVVCVCVCVCVCVCVCVCVWVCASAYRRTCAS - 223

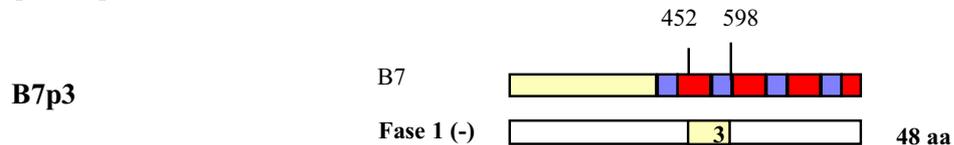
a-2) - gi I 554015 - Mouse CBA/J Ig heavy chain VI region pseudogene, 5' end  
 (Score (bits) = 35; E (value) = 0,063 - 50 aa)



a) - bbs I 170532 - Nuclar localization signal (NLS) binding protein  
 (Score (bits) = 46 ; E value = 2e -5 - positives = 32/64 - 49% ; 140 aa )

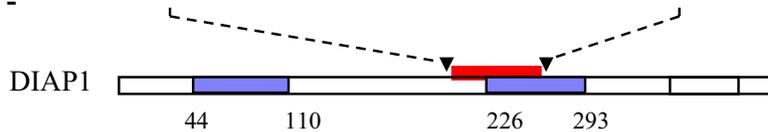
7 60  
 C CLKIEEDTRTTLVYTHHTHTHTHTSHTVFSSTSIY-----HKTPQLSPNSLYYTNPNR  
 S - C+ I T T +THHTHTHTHTHT+HT TS+ K L P +L +P +  
 P - CIHIHTHTHTH-THTHTHTHTHTHTHTHTHTPTSLLPARSQAGLLCQKGDLSLGPKALARASPRQ  
 59 121

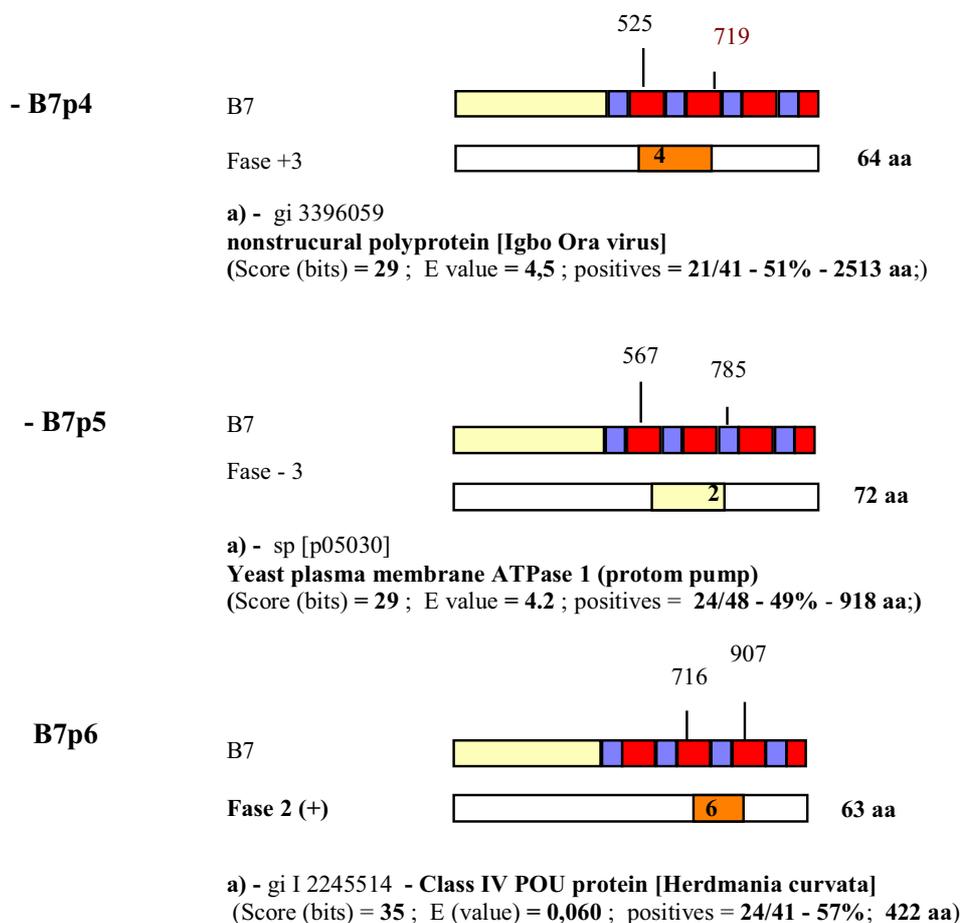
(Spot-1, a novel NLS-binding protein that interacts with p53 through domain encoded by pCAn repeats. - ELKIND et al.,-1995)



a) - sp I Q24306I - Apoptosis 1 inhibitor  
 (Score (bits) = 29 ; E (value) = 2,8 ; positives = 18/32 - 55% ; 438 aa)

C 14 - R A F R F W P E N S C I S P V H Y L A E S G G L F T G G G V R L - 45  
 S - R F W P N P H L A E + G + T G G R +  
 P - 213 - R T F E A W P R N L K Q K P - H Q L A E A G F F Y T G V G D R V - 261





**C** - 14 - SKFCQFSAPPFDHKTPQNYHQ~~TL~~YITPTMP~~QC~~PIRNPILP - 54  
**S** - S + +APP HP Q++H ++ + P+P+P P+ +P  
**P** - 101 - S~~SY~~YPMAAPP~~PH~~HM~~AP~~QSHH~~AS~~VPM~~AP~~S~~P~~V~~PP~~PPV~~YG~~TMPP - 141

**Figura 34.** Pesquisa de similaridade entre os supostos peptídeos codificados pelo segmento B7 com seqüências depositadas em banco de dados do Sistema Blastp (www.ncbi.nlm.gov). a) acesso recuperado do banco de dados; C – região do peptídeo codificado pelo B7 que apresentou similaridade com a proteína do banco de dados; S – resíduos de aminoácido comuns (letra) ou com concordância de carga/hidrofobicidade; P – região da proteína recuperada do banco de dados que apresentou similaridade com o segmento protéico codificado pelo B7. Letras azuis: dissimilaridades entre as seqüências mostradas. A numeração apresentada na parte superior dos desenhos esquemáticos indica a posição, em pares de bases, da ORF no clone B7, o número mostrado na região colorida do retângulo inferior do esquema indica o número e a posição da ORF (Figura 33) no B7, as cores no retângulo superior dos esquemas mostram a localização das regiões humana (amarelo), variável de minicírculo de kDNA (azul) e a região conservada de minicírculo de kDNA (vermelho). aa – resíduos de aminoácidos.

#### 4.7. RT PCR e Northern Blot

Com a finalidade de verificar a existência na linhagem subclonal de A11 de produtos provenientes da expressão do segmento B7, duas metodologias foram empregadas: 1) pesquisa através de RT-PCR com iniciadores do poli-A em conjunto com os iniciadores da região humana e de kDNA, e 2) através de *Northern blot* utilizando-se fragmentos do clone como sonda. Em ambos os casos, não se identificaram, na partida de mRNA analisada, produtos de expressão que pudessem ser atribuídos ao B7.

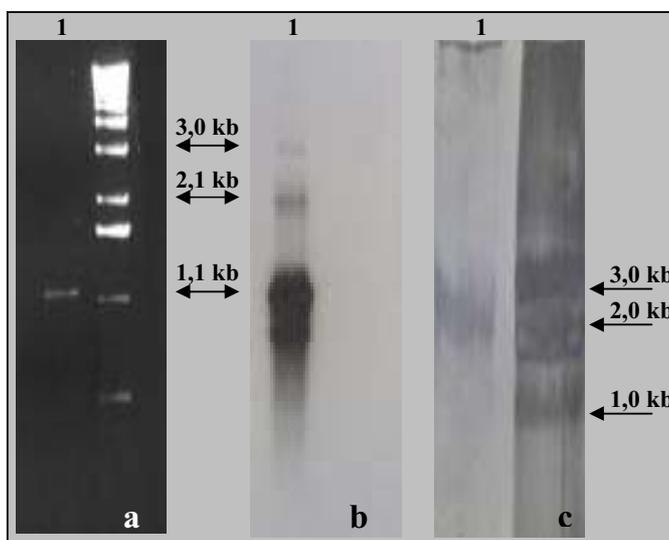
### 5. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS PONTOS DE INTEGRAÇÃO E REGIÃO KDNA DO CLONE B7 E G10.

#### 5.1. Padrão de migração do clone B7 em gel de agarose e acrilamida não desnaturante sugestivas de conformação não B.

As **Figuras 35a e b** apresentam o padrão típico de migração e hibridação com a sonda de 122 pb do inserto B7 quando isolado e purificado do plasmídio. Além do sinal de hibridação na altura esperada pode-se observar duas bandas adicionais nas posições aproximadas de 2 e 3 kb (**Figura 35b**).

Não se observou mudanças no padrão de hibridação da banda B7 mesmo após o isolamento da banda 1,1 kb do gel, reisolamento e digestão com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Not I*, que cortam no adaptador e no sítio múltiplo de clonagem do vetor. O resultado descarta a possibilidade de tratar-se da presença de resíduos do vetor e sugere a existência de interações moleculares entre as cadeias de DNA do tipo não B. O retardamento na migração do segmento B7 de 1,1 kb verificado na eletroforese em gel de acrilamida não desnaturante a 4 °C confirmam a presença de estruturas não B. Nesse experimento o fragmento posicionou-se na faixa de peso molecular entre 2 e 3 kb (**Figura 35c**).

**Figura 35.** Retardamento na mobilidade eletroforética observada no segmento B7, após ser isolado e purificado do plasmídio, indicando a presença de conformação não B. a- Padrão de migração eletroforética do clone B7 (Linha 1) visualização em gel de agarose após isolamento do plasmídio. b - Hibridação por *Southern blot* com sonda de 122 pb do mesmo gel mostrado na figura 36a. Observa-se sinal de hibridação na posição de 1,1 kb (tamanho real do segmento), e nas posições de 3,0 kb e 2,1 kb; c) padrão obtido da eletroforese em gel de acrilamida não desnaturante a 4 °C. Nota-se o retardamento na migração do segmento de 1,1 kb para a faixa de 2 a 3 kb.



### 5.1. Análise estrutural “in silico” dos pontos de integração e região kDNA do clone B7 e G10.

Todos os segmentos envolvidos nos eventos de integração apresentaram diversas regiões com tensão superior a 6 graus/10.5 bases nitrogenadas próximas ao ponto de inserção (**Figuras 36, 37, 38**) que proporcionaram modificações na estrutura tipo B predita por Watson e Crick (1953).

Os microssatélites CA das regiões hospedeiras presentes nos clones AC131797.3 e B7 geraram uma conformação de baixa tensão com estrutura semelhante às do tipo B, seguida de uma súbita mudança no padrão na porção terminal do microssatélite (**Figura 36a,b e c**).

O G10 mostra a região genômica hospedeira NT077531.3 interrompida por um elemento LINE-1 similar ao AC00461 contendo uma porção de minicírculo de kDNA com características semelhantes ao encontrado no B7.

A comparação do ponto de corte antes e após a integração revelou nítida redução na tensão após a entrada do material genético exógeno em todos os eventos de recombinação analisados (**Figura 37 e 39**). Apesar de localmente existir a tendência na diminuição da tensão no ponto de entrada, as integrações introduziram aumento na tensão geral da região, pois tanto o minicírculo quanto o LINE-1 mostraram-se ricos em segmentos com alta propensão para formação de curvaturas (**Figuras 36, 37 e 39**).

Os segmentos que promoveram os pontos de maior tensão no clone B7 foram apresentados na tabela III. A análise dos segmentos da região do minicírculo revelou que as tensões não acompanham a distribuição repetitiva da seqüência primária.

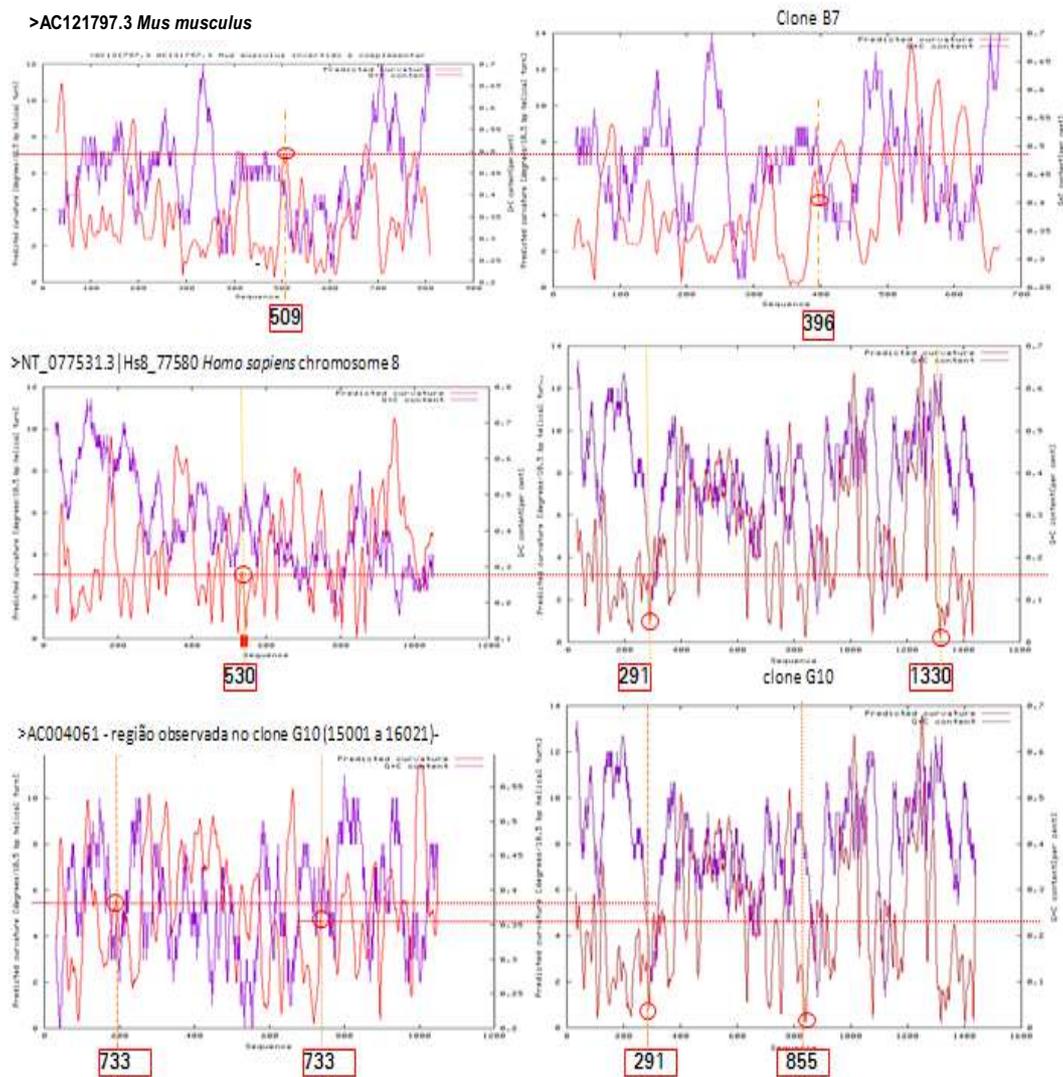
As imagens geradas dos pontos de integração antes e após os eventos insercionais indicaram um possível padrão na distribuição das tensões (**Figuras 36, 37 e 38**). Esta situação é mais evidente na análise das regiões de integração do clone G10 (**Figura 37b e 38**), sugerindo que a distribuição peculiar estaria associada aos eventos de integração/recombinação.







## RESULTADOS



**Figura 39.** Distribuição da bendabilidade das regiões de integração. Observa-se a redução de tensão em todos os pontos onde houve a entrada de material genético exógeno. A) Região B7 antes e pós integração do kDNA; B) Região cofator do fator de transcrição para RNAPolIII antes e após a entrada do segmento L1-kDNA; C) Região de integração do kDNA no LINE 1, antes e após a integração.

**DISCUSSÃO**

As primeiras evidências da integração do DNA *T. cruzi* na célula hospedeira mamífera vieram dos trabalhos de Teixeira et al. (1994). Nesse estudo, os autores mostraram alterações na estrutura dos cromossomos de macrófagos peritoneais de camundongos chagásicos, fato que poderia estar relacionado às manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas. A implicação biológica motivou os trabalhos subsequentes que culminaram na imortalização de macrófagos humanos contendo seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, mesmo após a erradicação do parasita. As primeiras evidências de que estas moléculas estariam integradas no genoma hospedeiro foram obtidas por Argañaraz (1996), que apresentou dois segmentos de DNA amplificados por PCR da célula transfectadas, com características sugestivas de uma região híbrida minicírculo/mamífero. Os clones com estrutura semelhante denominados genericamente de grupo A, e outros provenientes de diferentes estratégias, foram objeto de estudo do presente trabalho.

Os clones do grupo A caracterizaram-se por mostrarem nas extremidades, o iniciador de minicírculo e pequenos segmentos correspondentes ao final da região conservada, ligados a uma região com desproporção entre purinas e pirimidinas entre as fitas de DNA, que segundo análise em banco de dados parece ser uma característica de região variável de minicírculo. Nestes clones observou-se também a presença de um fragmento com identidade de 70 a 90 % com o elemento repetitivo LINE-1. Em três destes clones seguiu-se a esta região uma seqüência do tipo microssatélite III humano. A hibridação do DNA humano normal e do *T. cruzi* com sondas preparadas a partir do isolamento das regiões hospedeiras e de kDNA destes clones (**Figura 8**) permitiu concluir que os clones desta família representam uma quimera formada pela integração de pelo menos 2 minicírculos de kDNA dentro ou próximo a fragmentos do elemento LINE-1, com possível participação de regiões microssatélite, comum aos dois genomas, no processo de integração. Esta suposição estaria embasada na observação de outros fenômenos de recombinação envolvendo principalmente partículas virais, onde as regiões de identidade entre os dois genomas seriam o alvo para a atuação de enzimas específicas que realizariam a integração, enquanto que as regiões satélites, freqüentemente observadas próximas a sítios recombinativos, favoreceriam o fenômeno a exemplo das seqüências *Chi*, que em bactérias estimula a recombinação e integração de bacteriófagos (LEVINSON; GUTMAN, 1987; WAHLS et al., 1990; BRYDA et al., 1992; HENDERSON; PETES, 1992; WEBER; WONG, 1993; PITTMAN; SCHIMENTI, 1998; LEWIN, 2004; WOJCIECHOWSKA et al., 2005). Nota-se que as repetições encontradas no

microsatélites dos clones A, C, e D do grupo A (**Figura 7**) (“TGGA”), lembram a seqüência *Chi*, (GCTGGTGG) e a seqüência preferencial de recombinação do complexo de histocompatibilidade principal denominada de sítio de recombinação MT (“AGGC”) (PITTMAN; SCHIMENTI, 1998).

A etapa subsequente dos trabalhos teve como objetivo amplificar porções maiores da região de integração a partir de oligonucleotídios desenhados para anelar no LINE-1 e no kDNA. Os iniciadores de LINE-1 foram obtidos a partir das informações das seqüências dos clones do grupo A (**Figura 7**). Apesar da positividade do produto amplificado quando submetido à hibridação com sondas de kDNA (**Figura 9**), os clones recuperados da transformação da bactéria hospedeira INV $\alpha$ F’ apresentaram, somente, segmentos de DNA hospedeiro. A estratégia experimental foi repetida com as amostras de DNAs isoladas de sangue de pacientes chagásicos, gentilmente cedidas por Socorro Braga. Da mesma forma que anteriormente, houve a amplificação de um produto que apresentou hibridação com sonda da região conservada de kDNA. Entretanto, após a clonagem, os segmentos de DNA que foram recuperados dos plasmídios apresentaram um tamanho menor ao esperado e com seqüências de bases sem correspondência a minicírculos de *T. cruzi* e LINE-1.

Diante desses resultados que sugeriam instabilidade do fragmento clonado no vetor, optou-se por recuperar o minicírculo de kDNA integrado no genoma hospedeiro a partir de um banco genômico enriquecido da região híbrida clonado no vetor  $\lambda$ gt10 e tendo como hospedeira a bactéria XL1blueMRF’. Acreditava-se que o sistema de clonagem poderia estabilizar os segmentos maiores e com tendência a formação de estruturas reconhecidas pelo mecanismo de recombinação sítio específico. Entretanto observou-se, mais uma vez, a instabilidade das regiões de integração. Na primeira etapa de seleção do banco construído com a banda 2,4 kb de C4- *EcoR* I, foram selecionados 20 placas de lise com sinal positivo para kDNA em 100.000 placas de lise verificadas. Entretanto, as tentativas de purificar os fagos portadores da região de integração falharam em consequência do desaparecimento da positividade durante os processos de isolamento do fago. Concomitante, observou-se um aumento significativo no número de fagos sem inserto a cada ciclo de amplificação, resultado esperado caso estivesse havendo rearranjo na região clonada com perda do inserto. Com a finalidade de verificar se realmente os fagos selecionados portavam a região de integração, tanto o banco genômico quanto as placas de lise selecionadas foram amplificadas com iniciadores do vetor e

hibridadas com a região conservada de minicírculo de kDNA. O enfraquecimento no sinal de hibridação reforçou a idéia de instabilidade genética da região híbrida.

Já da clonagem da região enriquecida 3,2 kb do A11 – *EcoR* I, no mesmo vetor, nenhum fago foi selecionado após sondagem de mais de 600.000 placas de lise, apesar da PCR do banco apresentar amplificação e hibridação positiva com iniciadores e sonda de kDNA.

A instabilidade ou não representatividade de insertos em bancos genômicos é um problema comum quando as hospedeiras possuem ativos os genes responsáveis pela recombinação, ou quando os segmentos clonados apresentam incompatibilidade no padrão de metilação em relação ao padrão próprio, reconhecido pela célula hospedeira (LEWIN, 2004). No primeiro caso, a recombinação pode ocorrer entre insertos ou entre os insertos e o genoma hospedeiro, resultando em segmentos rearranjados. No segundo caso, as endonucleases responsáveis pelo mecanismo de salvaguarda do DNA, reconhecem como incorreto o padrão de metilação no DNA exógeno levando a destruição do segmento, gerando a sua não representatividade no banco genômico (LEWIN, 2004). Muitas linhagens de bactérias hospedeiras foram desenvolvidas com o objetivo de acomodar segmentos de DNA exógenos. Dentre elas, as mais utilizadas são *E. coli* DH5 $\alpha$  e DH5 $\alpha$ MCR (Gibco-BRL), INV $\alpha$ F' (Invitrogen), XL1Blue, XL1BlueMRF' e XL1Gold1 (Stratagene), e Sure Cells (Stratagene). As linhagens INV $\alpha$ F', DH5 $\alpha$ , e XL1Blue são recomendadas para acomodar segmentos vindos de outras bactérias, ou obtidos da amplificação por PCR. Estas linhagens apresentam mutações no principal gene responsável pela recombinação, o *recA*, e nos genes [*hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)], importantes no mecanismo que ocasiona a fragmentação do DNA por falta de metilação.

Com a finalidade de manter estáveis segmentos genômicos metilados nas posições 5'.Cm6A G..3' (ou 5'..Gm6AC..3'), padrão comumente encontrado em procariotos, e 5' - ..Gm5CGC..- 3'; e 5' - ..Gm5C..- 3', freqüentes em mamíferos, foram desenvolvidas as hospedeiras DH5 $\alpha$ MCR (Gibco-BRL), derivada da linhagem DH5 $\alpha$ , e a XL1BlueMRF' (Stratagene), derivada da XL1Blue, ambas apresentando a adição das mutações *mcrA*, $\Delta$ (*mrr*- *hsdRMS*- *mcrBC*-). A linhagem XL1Gold1 resultou da introdução, na linhagem XL1BlueMRF', das mutações que permitem a fácil transformação e estabilidade de plasmídios de levedura, normalmente com alto peso molecular. Já a Sure cells apresenta fundo genético diferente das demais (vide

material e métodos), no que se refere ao sistema de recombinação e reparo do DNA. Existindo ainda, outras linhagens, disponíveis comercialmente, com padrão de mutações apropriado para cada situação de clonagem.

A escolha da hospedeira XL1BlueMRF' para a clonagem da região de integração foi embasada no fato da bactéria ser permissiva à infecção viral pelo  $\lambda$ gt10 e manter estável tanto fagos como plasmídios e segmentos genômicos metilados. Entretanto, diante dos resultados sugestivos de instabilidade genética dos segmentos de interesse, foram levantadas dúvidas quanto ao genótipo *recA* da bactéria utilizada, já que reversões espontâneas da mutação no gene *recA* reverterem a bactéria para o fenótipo selvagem  $RecA^+$  (SAMBROOK, 1989). Deste modo, fez-se a confirmação do fenótipo mutante  $RecA^-$  da hospedeira, pela incapacidade da bactéria crescer após ter sido exposta a radiação ultravioleta. Este resultado indicou que outros mecanismos de recombinação, independentes da enzima RecA poderiam estar atuando na recombinação dos segmentos.

As causas mais freqüentes da instabilidade, tanto em bactérias como em leveduras, estão associadas à presença de estruturas repetitivas, tais como satélites, repetições diretas, invertidas ou do tipo palindrômicas, bem como regiões ricas em CG, que podem levar a formação de estruturas anormais no DNA e que, por sua vez, seriam reconhecidas e eliminadas pelos mecanismos dependentes e independentes da enzima RecA (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN, et al., 1985 e 1986; BALBINDER et al., 1989; TRINH; SINDEN, 1993; WYMAN et al., 1985 e 1986, em BERNANRDI, 1995; BI; LIU, 1996; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; LOBACHEV et al., 1998). Repetições como as descritas são freqüentes nos minicírculos de kDNA.

Os resultados obtidos dos segmentos híbridos contendo LINE-1 sugeriram a existência de uma estrutura complexa resultante da integração, o que poderia favorecer a recombinação do inserto clonado. Observa-se nestes segmentos a presença de duas seqüências de minicírculos truncadas, invertidas e complementares em relação à região conservada, intercaladas também por dois tipos de estruturas repetitivas, LINE-1 e Satélites. Outro fato a ser ressaltado, é do próprio minicírculo apresentar repetições diretas em sua organização, o que poderia levar, igualmente, a uma combinação instável. Mesmo em hospedeiro deficientes para enzima RecA repetições diretas podem mediar rearranjos eficientemente por mecanismos independentes desta enzima (BI; LIU, 1996).

Nas situações onde se observa instabilidade do segmento de DNA clonado, a recomendação mais freqüente é a troca da linhagem hospedeira, ou do vetor de clonagem (LEACH; STAHL, 1983, WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997, KOUPRINA et al., 2003; LEEM et al., 2004; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004, LAN; MUGUIRA, 2005).

Diante da impossibilidade de recuperar a região de integração nas hospedeiras testadas, realizou-se, então, uma consulta ao centro de referência do Genetic Stock Center da Universidade Yale – EUA, sendo sugerida a utilização da linhagem CES201. Esta linhagem, além de apresentar a deleção do *recA*, possuía, também, mutações nos genes dos mecanismos alternativos de recombinação/repairo, *recB*, *recC*, que estabiliza seqüências com repetições diretas, da mutação *sbcB15*, que favorecem a estabilidade de insertos com repetições invertidas clonadas em fago e no gene que promove a restrição de DNAs não metilados *hsdR*. Estas mutações associadas são potencialmente capazes de estabilizar tanto as repetições diretas como as invertidas. Contudo a presença dos genes *McrA*, *Mrr*, *McrBC* poderia dificultar a clonagem se a região de integração contivesse, também, seqüências metiladas, do tipo 5'..Gm5C..3', freqüentemente encontradas nas ilhas de CpG e elementos *Alu*.

Repetiu-se, portanto, a construção do banco genômico enriquecido com DNAs provenientes da banda 2,1 kb de C4 e com a 3,2 kb de A11 na linhagem CES201. Aproximadamente 600.000 placas de lise proveniente de cada um dos DNAs foram analisadas com a sonda de minicírculo, sem que fossem selecionados clones positivos.

A ausência do inserto no banco poderia ser justificada pela presença de sítios metilados na região de integração, ou pela formação de uma estrutura conformacional que induziria a recombinação por vias alternativas não cobertas pelas mutações da bactéria hospedeira CES201.

Decidiu-se, então, testar a hospedeira C600hf, recomendada para clonagens em fago  $\lambda$ gt10, que apresenta o genótipo selvagem para as enzimas envolvidas na recombinação e repairo, bem como para o sistema de restrição de DNAs exógenos, segundo recomendação do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, eventualmente, insertos instáveis em bactérias deficientes para *RecA* podem ser mantidos com sucesso nessa linhagem. Igualmente, nenhum clone positivo foi selecionado.

Clonagens difíceis foram relatadas como as do caso descrito por Strader e Howell (1997). Esses autores mostram a instabilidade do gene di-hidrofolato redutase, um homotetrâmero, quando clonado em Sure Cells e JM 107, bactérias com mutações nas vias alternativas de recombinação e reparo. A estabilidade só foi conseguida quando a seqüência foi mantida nas células STBL2, cujo genótipo corresponde ao da XL1BlueMRF' e a da DH5 $\alpha$ MCR, sem a mutação *DeoR* (mutação que promove a síntese constitutiva de deoxiribose).

Decidiu-se, então, pela troca de vetor, sendo a clonagem da banda 2,4 kb de C4-*EcoR* I realizada no plasmídeo pbluescript, tendo como bactéria hospedeira a XL1BlueMRF'. A combinação foi escolhida pelo fato de ter-se recuperado clones positivos para minicírculos a partir do banco de C4 -  $\lambda$ gt10 cultivados nessa hospedeira. Na clonagem da banda de 3,2kb A11-*EcoR* I, optou-se pelo vetor PCR 2.1 e bactéria DH5 $\alpha$ MCR.

Não se obteve colônias positivas dos 3.000 transformantes analisados da clonagem A11. Já da clonagem de C4, foram selecionados 7 construções positivas para kDNA entre 300 transformantes analisados. Os insertos apresentaram tamanho em torno de 400 a 600 pb e sinais de rearranjo, com perda de um dos sítios de clonagem *EcoR* I e parte do vetor. O seqüenciamento revelou a presença de repetições diretas de região conservada de minicírculo com aproximadamente 130 pb cada, intercaladas por repetições diretas de 50 pb (**Figura 14a**). Clones, cedidos por Nadjar Nitz para seqüenciamento e análise, obtidos por estratégia semelhante aplicada a banda de 2,1 kb de DNA de tecido cardíaco de coelho digerido com *EcoR* I mostraram seqüências de kDNA contendo as mesmas 50 pb intercalando as regiões conservadas (**Figura 14d**). Estas regiões foram posteriormente isoladas e identificadas como parte da região variável do minicírculo de kDNA.

Testou-se, então a transformação do banco de A11 e C4 na hospedeira Sure cells (Stratagene). Esta linhagem, *RecA*<sup>+</sup>, acumula mutações em genes envolvidos na recombinação e reparo diferentes dos testados anteriormente. Apresenta deficiência no gene *sbcC*, que estabiliza seqüências repetidas invertidas em plasmídios, além das mutações nos mecanismo de restrição de DNA metilados e não metilados. Foram analisadas aproximadamente 600 colônias tanto para A11 como C4, todas com resultado negativo de hibridação com sonda de kDNA. Tentou-se a clonagem da banda com 7 kb vindas da digestão do clone A11 com a enzima *Cla* I, também sem resultado.

Diante deste quadro, concluiu-se que a região de integração poderia apresentar mais de um tipo de estrutura que não seria estabilizada pelas hospedeiras testadas.

Apesar da importância da recombinação no aumento da variabilidade genética, o mecanismo completo que contribui para os rearranjos genômicos ainda está longe de ser totalmente esclarecido (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; em MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997; KOUPRINA et al., 2003; LEEM et al., 2004; LEWIN, 2004; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004; LAN E MUGUIRA, 2005). Sabe-se que vários genes não diretamente relacionados à recombinação podem interferir na frequência do fenômeno, por exemplo, mutações nos genes responsáveis pela estrutura do DNA elevam significativamente a recombinação entre repetições (PRADO et al., 1997), mutações na proteína p53, que participa do processo apoptótico, elevam a frequência na recombinação homóloga e entre seqüências repetitivas em células eucarióticas (MEKEEL et al., 1997; BERTRAND et al., 1997, HONMA et al., 1997). Fatores envolvidos na transcrição também podem atuar na estabilização de seqüências repetidas no genoma como verificado em *S. cerevisiae* (PRADO et al., 1997).

A maior parte do conhecimento referente à recombinação vem dos estudos com bactérias. Trata de um mecanismo conservado ao longo da evolução. Gradualmente, as enzimas e complexos enzimáticos inicialmente identificados nos unicelulares vão sendo encontrados nos organismos mais complexos (LEWIN, 2004). Por exemplo, a enzima RecA bacteriana na levedura corresponde ao produto do gene *RAD51* e uma proteína análoga foi identificada em células hospedeiras (MORITA et al., 1993). Rearranjos de estruturas repetidas também foram descritas em leveduras. Tran e colaboradores (1997) e Lobachev e colaboradores (1998) mostraram a influência entre as distâncias e tamanho das repetições invertidas no estímulo à deleção. Os autores ressaltaram a importância das estruturas secundárias no fenômeno e reforçaram a semelhanças dos mecanismos eucarióticos com os identificados nas bactérias. Deste modo, a troca do sistema de clonagem bacteriano para o de levedura poderia não resultar na estabilidade desejada. Assim, optou-se, mais uma vez, pela mudança na estratégia de clonagem.

Ao invés de se tentar estabilizar as repetições de minicírculos presentes na região de integração clonada, resolveu-se reduzir o número de repetições no inserto vindo da integração e reclonar a região.

Amplificou-se, então, banco genômico C4 construído em  $\lambda$ gt10 com os iniciadores da região conservada e o do fago, como mostrado na **Figura 3**, o que resultou em produtos positivos com sonda de kDNA quando hibridizados em *Southern blot*. A clonagem das amplificações no vetor PCR2.1 tendo como hospedeira a bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  resultou em colônias também com sinais positivos. Entretanto, após a expansão dos clones para extração do plasmídeo, observou-se perda da positividade, apesar da hospedeira ser apropriada para receber produtos de PCR ( $hsdR17(r_k^-, m_k^+)$ ), e de ser mutante para a principal enzima responsável pela recombinação (*recA*). Este resultado sugeriu, mais uma vez, possível rearranjo dos insertos. Alguns clones mostraram indícios de rearranjo do plasmídeo, e outros a amplificação do iniciador do minicírculo seguido por uma região sem correspondência com a região conservada, ou ao vetor da clonagem. Mas a falta de seqüências características que pudessem ser atribuídas às regiões do minicírculo de kDNA, não permitiu comprovar a especificidade das amplificações (**Figura 15**).

Outra estratégia empregada, a de PCR inversa *EcoR* I das células C6, gerou amplificações positivas para região conservada de kDNA na faixa de 1,4 kb, com produtos de clonagem também positivos com sonda de kDNA, entretanto o maior inserto recuperado desta clonagem foi de aproximadamente 660 pb. Dois clones foram seqüenciados e mostraram somente kDNA com regiões conservadas encurtadas (**Figura 14 b e c**), como visto, anteriormente, nos clones obtidos da linhagem subclonal de macrófago C4 e de coelho (**Figura 14a e d**). A presença das regiões conservadas nos clones sugeriu que a instabilidade poderia decorrer da combinação entre as estruturas hospedeiras com as do minicírculo e não propriamente das repetições diretas observadas do kDNA.

A impossibilidade de recuperar porções maiores da região de integração, pelas técnicas convencionais foi solucionada pelo desenvolvimento da “Técnica de Captura”, apresentada neste trabalho de tese. O método foi elaborado aproveitando os princípios da cromatografia de afinidade e o *Southern blot*. A sonda imobilizada em uma membrana de “nylon” é hibridada com a mistura de DNAs, sendo selecionadas as seqüências específicas ligadas à sonda. Esta técnica mostrou-se bastante eficiente tanto na recuperação de pequenos segmentos de DNA, como para fragmentos maiores com até 7 kb.

Em essência, o método se assemelha ao das partículas paramagnéticas comercializado pela DINAL®, utilizado para capturar pequenos DNAs. Ambos hibridizam a sonda com o DNA alvo com a

finalidade de purificação. Só que a técnica de captura, além de permitir um controle maior na especificidade do material eluído, é mais simples, dispensando as etapas de biotinylação, e hibridação com as partículas ligadas a estreptoavidina, representando uma melhoria de processo.

A sensibilidade do método permitiu a captura de fragmentos de genes cópia única a partir de 5 ng de DNA genômico total de *T. cruzi* (**Figura 19**). Pelas técnicas convencionais seriam necessários em torno de 5 µg (mil vezes mais material) para a realização do mesmo isolamento (SAMBROOK, 1989).

Esta metodologia mostrou-se eficiente para recuperar regiões de kDNA integrado, e foi utilizada na obtenção de integrações, tanto de clones celulares, como de tecidos de coelho.

As seqüências capturadas da banda 3,2 kb de A11-*EcoR* I e amplificadas com os iniciadores do adaptador apresentaram sinais positivos para sonda de kDNA. Em gel de agarose, observam-se sinais de hibridação na altura próxima a 3 kb (**Figura 21**), mas curiosamente, a maior banda em gel de acrilamida desnaturante apresentou tamanho de 1,3 kb (**Figura 23**).

Os esforços em recuperar a banda no tamanho de 3,2 kb, não lograram êxito por três metodologias testadas: isolamento e reamplificação da região de peso molecular de 3 kb; amplificação com DMSO e com *Tth*-polimerase. A primeira estratégia partiu da premissa de que a banda de 3 kb estaria presente, mas em quantidade insuficiente para permitir boa resolução. Na segunda metodologia, o uso de DMSO na mistura de reação poderia evitar o reanelamento inadequado das fitas (Winship, 1989) em caso de estruturas repetitivas. E na terceira, a utilização da enzima *Tth* polimerase, que amplifica com alta eficiência segmentos com até 40 kb (Perkin-Elmer), poderia favorecer a obtenção do DNA nas situações onde existe formação de estruturas complexas. Diante desses resultados, duas possibilidades foram aventadas: 1) ou a banda, de fato, existiria, entretanto a presença de estruturas secundárias não eliminadas pelas técnicas testadas impediria a progressão satisfatória da PCR, gerando produtos menores (**Figura 41**); 2) ou a banda de 3,2 kb, em gel de agarose, seria resultante de interações moleculares da região de integração, fazendo com que a migração ocorresse em uma posição não correspondente ao seu tamanho real. Alguns aspectos experimentais reforçam a primeira hipótese, segmentos de DNAs capturados que foram isolados do gel de acrilamida desnaturante, sistematicamente, geraram segmentos menores quando amplificadas por PCR com os iniciadores do adaptador. A presença de bandas menores nestas ampliações não poderia ser explicada pela presença de

bandas contaminantes menores que estivessem comigrando com a banda principal, já que este tipo de gel impede interações moleculares que levam a comigração (SAMBROOK et al., 1996). Fenômeno semelhante também foi observado na amplificação do clone obtido da captura da banda 3,2 kb de A11 denominado B7. Quando o inserto clonado foi utilizado como molde na amplificação, não se observam bandas menores. Entretanto, quando a amplificação é realizada a partir do segmento isolado do vetor, o padrão obtido repete o resultado das bandas isoladas da acrilamida. Estruturas secundárias na fita de DNA, suficientemente estáveis nas condições da PCR, poderiam ocasionar este tipo de resultado. Neste caso, a estrutura impediria a progressão da síntese da fita complementar ao DNA molde, sendo o fragmento amplificado liberado na etapa de desnaturação. O fragmento liberado precocemente poderia servir como iniciador se a estrutura bloqueadora estivesse localizada na região repetitiva. Neste caso o produto amplificado apresentaria tamanho menor e com o iniciador nas duas extremidades, como mostrado na **Figura 41**.

Mesmo que tal fenômeno possa estar ocorrendo em relação à amplificação da banda genômica de 3,2 kb A11-*EcoR* I, isso não descarta a segunda hipótese que aventa a possibilidade de uma migração eletroforética anormal da região de integração. A evidência experimental que reforça esta idéia foi obtida do padrão eletroforético do segmento B7. Este segmento possui tamanho determinado pelo seqüenciamento de aproximadamente 1,1 kb. Em gel de agarose, além da banda no tamanho esperado, aparecem outras três menores e menos intensas nas posições de 0,7, 2 e 3 kb. Os fragmentos são visíveis no gel mesmo após tratamento enzimático para liberar possíveis flancos plasmidiais. E podem ser notados mesmo após o reisolamento da banda 1,1 kb da agarose (**Figura 36a e b**).

De um modo geral, a composição de bases do DNA e temperatura da corrida não influenciam na migração deste tipo de molécula (THOMAS; DAVIS, 1975 – em SAMBROOK, 1989), porém, a conformação das hélices do DNA podem afetar significativamente na mobilidade eletroforética, tanto em géis de agarose quanto em acrilamida (Thorne, 1966, 1967 em SAMBROOK, 1989; GOUGH; LILLEY, 1985; DIEKMANN; LILLEY, 1987; DIEKMANN; WANG, 1985; ISRAELEWSKI, 1983, MILOT et al., 1994; ORTIZ-LOMBARDÍA et al., 1998; WELLS, 2007). DNAs catenados, circularizado ou superenovelados formam bandas em posições que não correspondem ao tamanho dos fragmentos linearizados (Thorne, 1966, 1967 em SAMBROOK, 1989). Fragmentos linearizados podem apresentar migrações anormais nos dois tipos de géis quando repetições monótonas do tipo satélite estão presentes, como mostrado por Israelweski (1983).

Este autor ressalta a participação de seqüências repetitivas ricas em AT na alteração do padrão eletroforético e apresenta géis onde um único segmento resultou na formação de múltiplas bandas com menor intensidade, além da banda principal no tamanho esperado. Situação semelhante à descrita foi observada na eletroforese em gel de agarose do segmento B7 purificado. Diekmann e Wang, (1985) mostraram que minicírculos de kDNA isolados de *Leishmania tarentolae* também apresentam peculiaridades de migração. Segundo os autores, as repetições de 3 a 6 da base “A” encontradas a cada 11 bases levariam a modificações conformacionais gerando curvaturas na molécula, que poderiam ser notadas pela mobilidade eletroforética. Evidências mostram que a desproporção entre purinas/pirimidinas nas fitas do DNA podem ser responsáveis por interações intramoleculares estáveis diferentes das previstas por Watson e Crick (ORTIZ-LOMBARDÍA et al., 1998). Mohammadi et al., 1997, mostraram a participação de regiões ricas em homopurinas ou homopirimidinas na formação de estruturas do tipo triplex. A desproporção entre estas bases e repetições monótonas também foram encontradas nas fitas dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, segundo resultado apresentado neste trabalho da análise das regiões conservadas dos minicírculos de depositados em banco de dados ([www.embl-ebi.ac.uk/parasites/kDNA](http://www.embl-ebi.ac.uk/parasites/kDNA)). Esta desproporção é acentuada nas regiões variáveis e está presente, também, nos segmentos de minicírculos observados nas integrações. Em gel de acrilamida não desnaturante a 4 °C é possível distinguir a mobilidade eletroforética de segmentos com estruturas alteradas nas hélices dos DNAs daqueles com igual número de bases na conformação normal “B” (MILOT et al., 1994). Nestas condições, o segmento B7 e a banda capturada da integração B1, com 1,3 kb, sofreram retardamento de migração, indicando a presença de alterações conformacionais nas hélices destes DNAs (**Figura 36c**).

O seqüenciamento das bases do clone B7 mostrou a presença da região repetitiva de kDNA similar as observadas em outros segmentos e uma região hospedeira com aproximadamente 396 pb, onde se verificou a presença de um microsatélite do tipo (CA)<sub>23</sub>. Estudos realizados por Naylor e Clark (1990) mostraram que repetições do tipo d(GT)<sub>n</sub>.d(CA)<sub>n</sub> podem assumir conformação do tipo Z-DNA, e formar interações moleculares cruciformes. Segundo Gough e Lilley (1985) e Dickmann e Lilley (1987) estruturas cruciformes, inclusive junções de Holliday, apresentam mudanças na mobilidade eletroforética em géis de agarose e acrilamida. A presença do microsatélite no A11-*Eco*R I, poderia promover a formação de estruturas não B

que poderiam contribuir para o retardamento da migração e um possível truncamento na amplificação por PCR.

Segundo a literatura, todos os casos relatados de regiões com instabilidade genética continham segmentos com regiões do tipo não B, sugerindo que a conformação do DNA seria um aspecto preponderante no processo de recombinação (BACOLLA et al., 2004; LAN; MUGUIRA, 2005; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; GRINDLEY et al., 2006; WANG et al., 2006; WOJCIECHOWSKA et al., 2006; DU et al., 2007; WELLS, 2007, DU et al., 2007; WANG; VASQUEZ, 2004, 2006 e 2007; MARRI et al., 2007). Acredita-se que as interações entre repetições do tipo diretas e invertidas, e invertidas e complementares, distribuição de bases púricas e pirimídicas na fita propícias à formação de estruturas tipo Z, dobramentos e curvaturas, entre outras alterações estruturais, poderiam formar um código tridimensional que seria reconhecido pelas enzimas envolvidas na recombinação (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; TRINH; SINDEN, 1993, STRADER; HOWELL, 1997; KOUPRINA et al., 2003; MARCADIER; PEARSON et al., 2003; DERE et al., 2004; BACOLLA et al., 2004; LEEM et al., 2004; WOJCIECHOWSKA et al., 2005; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004, LAN E MUGUIRA, 2005, WOJCIECHOWSKA et al., 2006)

Padrões anormais de migração de DNAs foram correlacionados por Milot e colaboradores (1994) a sítios preferenciais de integração de retrovírus. Wahls e colaboradores (1990) sugerem que microssatélites poderiam servir como sítios específicos de clivagem no DNA, promovendo a recombinação. Pittman e Schimenti (1998) mostraram uma clara associação de microssatélites e de elementos repetitivos nos processos de integração e recombinação. No segmento B7 foram encontradas na região hospedeira ambas as estruturas, o microssatélite (CA) e um fragmento de elemento *Alu*. No mesmo clone, observou-se também, na suposta junção entre o minicírculo de kDNA e o genoma hospedeiro (**Figura 31**), a presença de um sítio para topoisomerase I de eucarioto 5' - (A/T)(G/C)(A/T)T↓ - 3' (BEEN et al., 1984; JAXEL et al., 1991). Consensos para topoisomerase I são freqüentes nos flancos 5'-fosfato dos sítios de integração de DNAs (BULLOCK et al., 1985; BEEN et al., 1984; MCFARLANE; WILSON, 1996). Esse sítio também pode ser observado nas regiões de transição genômicas do clone G10. O domínio catalítico desta enzima, que se assemelha aos da integrase HP1 e recombinase *Cre*, entre outras, realiza o relaxamento das fitas do DNA, transesterificação sítio específica, transferência das fitas do DNA e religação, na recombinação homóloga

desigual (CHENG et al., 1998). A presença desse consenso na junção dos dois genomas sugere que mecanismos envolvendo a participação da topoisomerase I poderiam ser responsáveis pela integração do minicírculo de kDNA no genoma hospedeiro.

A análise estrutural das curvaturas e dobramentos dos segmentos G10 e B7 indicaram a presença de uma região com tensão característica próxima aos locais de recombinação. Estas estruturais do tipo não B estariam presentes nos segmentos genômicos que precederam a integração, o que poderia ser um indicativo da existência de uma possível palavra estrutural associada à interação. Após a inserção do material genético, verificou-se a ocorrência de modificações na distribuição das forças na região da palavra estrutural, com diminuição na tensão no ponto da inserção. Essa peculiaridade foi notada em todas as transições genômicas presentes no B7 e G10, sugerindo que a recombinação favoreceria a redução local da tensão. Com a finalidade de verificar esta hipótese, todos os segmentos de kDNA integrados no genoma e depositados no genbank foram analisados quanto a estrutura. Esta avaliação revelou profundos rearranjos em todos os acessos analisados e remoção de todos os pontos de tensão da molécula de minicírculo, permanecendo basicamente múltiplos das regiões SK36 ou SK35. Portanto, é possível que as regiões kDNA e LINE-1 observadas nos segmentos B7 e G10 representem produtos intermediários e não estáveis na linhagem celular, já que ainda apresentaram elevada a tensão global. Esta hipótese é corroborada pelos resultados apresentados na Figura 4 da publicação em anexo, onde se verificou rearranjos no material após três anos do evento de integração inicial.

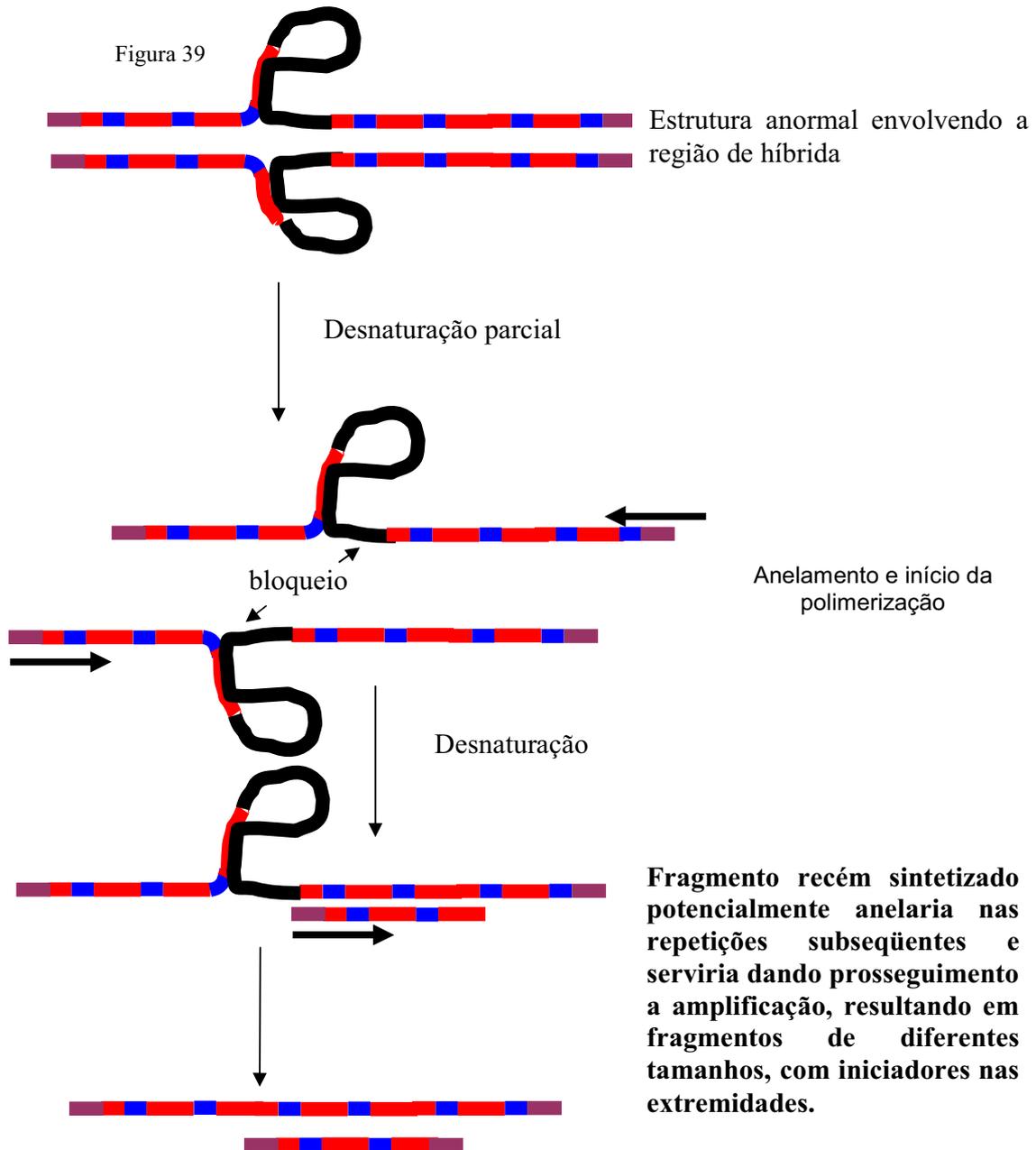
A força que gera a curvatura no DNA é a resultante da soma vetorial das contribuições individuais das torções das bases nitrogenadas na seqüência (GABRIELIAN et al., 1996; GABRIELIAN; PONGOR, 1996; VLAHOVICEK; PONGOR, 2000). Apesar de serem definidas pela seqüência primária do DNA, haveria variações nos sítios de maior tensão, mesmo numa estrutura repetitiva como a do minicírculo de kDNA, conforme mostrado na Tabela III.

A propensão para a recombinação correlaciona-se com o padrão de distribuição das proteínas estruturais (LEWIN, 2004). Curvaturas na molécula de DNA poderiam promover modificações na afinidade de ligação das proteínas estruturais/regulatórias e tornar a região mais acessível às proteínas envolvidas na

recombinação. Flutuação na exposição das regiões repetitivas do kDNA integrado, poderia indicar que haveria uma ordem nos eventos de recombinação.

A amplificação com os iniciadores do adaptador do DNA capturado da banda 7 kb da linhagem subclonal A11-*Cla* I, diferentemente da amplificação a partir da banda capturada 3,2 kb A11-*EcoR* I, resultou no aparecimento da banda no tamanho esperado. Contudo, somente as bandas entre 0,8 a 4 kb apresentaram sinais positivos na hibridação por Southern blot, com sonda de kDNA. O material amplificado sem a digestão prévia com a enzima *Taq* I não apresentou sinal de hibridação com a sonda da região hospedeira, que compreende o microsatélite (CA) do clone B7, sugerindo uma possível não amplificação ou não captura deste flanco a partir desta digestão. Já o DNA capturado com sonda de minicírculo de kDNA a partir do tecido cardíaco de coelho digerido com *EcoR* I, cedido para análise por Nadjar Nitz, mostrou hibridação positiva com a região hospedeira isolada do B7 (**Figura 33d**). Este resultado sugere a presença de sítios preferenciais de integração do minicírculo no genoma hospedeiro.

A instabilidade genética da região híbrida *T. cruzi*/Mamífero na bactéria hospedeira foi demonstrada pela clonagem das bandas isoladas da captura do A11-*EcoR* I, em plasmídeo PCR2.1. A primeira evidência sugestiva de instabilidade veio do número reduzido de colônias recuperadas, quando a mesma quantidade de plasmídeo ligado era utilizada na transformação. Segmentos maiores que 650 pb resultaram em poucos ou nenhuns transformantes. Já os menores que 650 pb, apresentaram uma eficiência na ordem de 50% em relação ao número de colônias obtidas dos controles de transformação (plasmídeo vazio religado). Entretanto, o tamanho inserto dos insertos e as análises dos seqüenciamentos confirmaram o rearranjo. Todos os insertos obtidos da transformação das bandas entre 700 a 1300 pb, que apresentaram positividade com sonda de kDNA, mostraram tamanhos diferentes do esperado, em geral na faixa de 600 pb. Em algumas clonagens não houve recuperação dos segmentos contendo minicírculos de kDNA, enquanto que em outras surgiu uma combinação entre clones positivos e negativos de tamanho díspares ao esperado. A análise das seqüências recuperadas revelou a presença do iniciadores do adaptador em ambas às extremidades em todos os clones analisados.



**Figura 40.** Estrutura hipotética do DNA capturado: amplificação por PCR resultando em fragmentos menores do que o esperado, e com iniciador nas extremidades.

Os clones positivos para kDNA apresentaram perda de bases no sítio *EcoR* I do adaptador localizado preferencialmente no lado próximo ao sítio M13 Reverse do vetor. Anomalia mais sugestiva, foram apresentadas pelos clones 7E, negativo para kDNA, e o B7, selecionados da clonagem da banda 7 com aproximadamente 700 pb. O clone 7E mostrou tamanho em torno de 700 pb, duplicação do sítio de clonagem, e a inserção de algumas bases supostamente do próprio vetor no lado próximo ao sítio M13 Reverse, antes do início do inserto. Já o clone B7 apresentou tamanho de 1075 pb, mutação do tipo duplicação envolvendo duas repetições de “região conservada/variável” de minicírculo, ocorrida possivelmente nas repetições próximas ao flanco do DNA hospedeiro como sugeriu a análise de identidade.

A banda 12, positiva para a sonda de kDNA, resultou em clones com seqüências positivas e negativas. Este resultado sugere uma possível contaminação da banda com segmentos de DNA não específicos, mas pode também ser um indício de instabilidade. Dentre os clones positivos em *Southern blot* com sonda de região conservada de kDNA selecionados para seqüenciamento, o único que não apresentou seqüências características da região conservada foi o originado da banda 12, com tamanho aproximado de 500 pb, denominado 12A. A seqüência do clone 12A mostrou a presença de vários segmentos com semelhança a regiões conservadas de minicírculos de kDNA, o que pode ter direcionado a captura e justificar o sinal positivo em *Southern blot*.

Os clones provenientes da região integração recuperados pelas diferentes estratégias apresentaram como peculiaridade a presença de várias regiões repetitivas diretas, invertidas e invertidas/ complementares. Estas regiões permitem a formação de grampos e alças, que podem ser eventualmente estabilizadas pelas interações intramoleculares ocasionadas pela desproporção entre purinas e pirimidinas nas fitas do DNA (ORTIZ-LOMBARDÍA et al., 1998). Estas estruturas quando reconhecidas pelas enzimas que realizam o reparo do DNA, estimulam a recombinação sítio específica ocasionando rearranjos nas moléculas clonadas (LEACH; STAHL, 1983; WYMAN et al., 1985 e 1986; TRINH; SINDEN, 1993; MEIMA et al., 1997; STRADER; HOWELL, 1997).

A grande maioria dos minicírculos de *T. cruzi* apresenta tamanho entre 1,4 – 1,5 kb, com 4 regiões conservadas, com aproximadamente 120 pb, intercaladas por regiões variáveis em torno de 230 - 250 pb (revisto em SIMPSON, 1997). Todos os clones provenientes da captura bandas 7, 8, 10 e 11 de A11, que

apresentaram em sua estrutura minicírculos de kDNA, mostraram as regiões conservadas com tamanho esperado. Contrariamente, o mesmo não aconteceu com as regiões variáveis, que apresentaram seqüências com apenas 50 pb. O encurtamento das regiões variáveis foge, portanto, ao padrão considerado normal, o que poderia significar uma nova família de minicírculos, serem resultantes do processo de integração, ou da recombinação na bactéria hospedeira. Esta mesma seqüência de 50 pb também fora recuperada das linhagens clonais de macrófagos das linhagens clonais C4 e C6, de coração e baço de coelhos cronicamente infectados.

A comparação das seqüências de DNA destes minicírculos mostra que os segmentos apresentam poucas divergências, em torno de 20% - 25%, sugerindo a existência de famílias de minicírculos que se integrariam preferencialmente no genoma hospedeiro. Outro clone que também apresentou regiões variáveis encurtadas foi o 2C6, proveniente da PCR inversa da linhagem subclonal 6. Este clone apresentou região variável com tamanho de 80 pb com seqüência diversa aos clones da família 50 pb.

As regiões variáveis obtidas das integrações não apresenta similaridade com as regiões variáveis obtida de *T. cruzi* e nem com seqüências de kDNA de outros tripanosomatídeos depositadas em banco de dados abrangidos pelo BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Apenas com regiões de integração.

Algumas evidências experimentais apresentadas no trabalho sugerem que o encurtamento da região variável foi preexistente a clonagem na bactéria e este encurtamento teria se dado durante ou após o evento de integração. Amplificação do DNA A11 do estoque intacto, obtido da quarta partida de cultivo, com os iniciadores IS da região hospedeira do clone B7 e SK36, da região conservada mostrou bandas compatíveis com o tamanho esperado se as regiões variáveis apresentassem tamanho de 50 pb (**Figura 32b**), portanto as regiões encurtadas já estariam presentes nesta linhagem clonal de macrófago antes da captura e clonagem na bactéria.

Para tentar elucidar se o minicírculo que originou a integração já apresentaria o encurtamento das regiões variáveis antes da inserção no genoma, fez-se a construção e a triagem de bancos de kDNA em fago  $\lambda$ gt10 e plasmídio pBluescript. As tentativas de se recuperar minicírculo não lograram êxito, sugerindo que a molécula de kDNA apresentaria estruturas que induziriam a instabilidade genética do vetor. O resultado pode ser corroborado pelo número de seqüências completas de minicírculo depositadas nos bancos de dados atualmente. Estima-se que existam perto de 300 classes diferentes de minicírculo em *T. cruzi*, (RIOU; YOT,

1977, STURM, 1989; revisto em SIMPSON, 1997). Em janeiro de 1999 um levantamento das seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* depositadas no banco de dados genbank revelou a presença de quarenta seqüências. A análise destes depósitos mostrou que quase a totalidade compreendia fragmentos de minicírculos truncados. Somente seis continham regiões conservadas e variáveis completas e apenas dois minicírculos inteiros. A reanálise dos bancos realizada em janeiro de 2005, mostrou o acréscimo de 46 novos fragmentos. Destes, quarenta eram segmentos rearranjados de minicírculos vindos de regiões de integração e seis de *T. cruzi*. A mesma análise realizada em janeiro de 2008 mostrou que não houve acréscimo de seqüências de minicírculos completas.

Empregando-se a região de 50 pb da região variável observada no clone B7 como sonda imobilizada, foi possível recuperar pela técnica de captura uma banda única com tamanho de 600 pb a partir de uma mistura de minicírculos totais digeridos com a enzima *EcoR* I ligados ao adaptador correspondente. A clonagem desta banda não resultou em transformantes estáveis na bactéria DH5 $\alpha$ . No entanto algumas considerações puderam ser feitas em relação ao tamanho da banda capturada em relação ao tamanho esperado de um minicírculo de kDNA. Nota-se que soma dos tamanhos das 4 regiões conservadas com os das 4 regiões variáveis encurtadas seria de aproximadamente 680 pb enquanto que a banda capturada apresentou tamanho de 600. Esta diferença de tamanho estaria compatível com a hipótese de existência de uma família de minicírculos no *T. cruzi* que tivesse região conservada de tamanho encurtado. Entretanto, a presença de uma banda única poderia ser resultado de uma digestão dupla minicírculo em pontos e equidistante. Neste caso o tamanho aproximado desta molécula seria de 1,2 kb e as regiões variáveis apresentariam tamanho aproximado de 200 pb, o que estaria de acordo com o padrão esperado para minicírculo de *T. cruzi*.

A elucidação do tamanho da região variável veio do experimento onde se amplificou o segmento a partir do material capturado do *T. cruzi* com a sonda 50 pb seguida da hibridação com sondas da região conservada. Para tanto foram desenhado iniciadores das extremidades da região variável de 50 pb partindo da premissa que o encurtamento dessa região teria ocorrido com a perda da região central. A amplificação resultou em um segmento com aproximadamente 200 pb (**Figura 29a**), sem presença de região conservada (**Figura 29b**), sugerindo que o encurtamento teria ocorrido durante, ou após, a integração do minicírculo no genoma hospedeiro. Portanto a banda de 600 pb recuperada na captura seria o resultado da digestão de um minicírculo com aproximadamente 1,2 kb com sítios de cortes *EcoR* I equidistantes. Com a finalidade de

obter a seqüência completa da região variável o produto da amplificação foi clonado e 5 recombinantes seqüenciados. Todos apresentaram região variável com tamanho encurtado, sugerindo que esta região por si só seria recombinogênica.

Indícios sugerem que a integração dos segmentos de minicírculo visualizados no clone B7 teria ocorrido em uma região não traduzida do genoma hospedeiro. Repetições do tipo CA são relativamente freqüentes no DNA mamífero, em humanos ocorre na proporção de 1 para cada 30 kb. Estão distribuídas principalmente nas regiões 5' fosfato e 3'-OH não traduzidas dos genes, e nos íntrons (revisão em Hearne et al., 1992), sendo raramente encontradas nas regiões traduzidas (Elkind et al.1995). A presença de várias seqüências terminadoras da tradução, nas três fases de leitura da região hospedeira, também reforça a idéia da integração ter ocorrido em uma região não traduzida. Porém, a elevada concentração das bases C e G, e o segmento do tipo *Alu* encontrados no clone, poderia significar que o fenômeno teria ocorrido próximo a uma região traduzida, já que estas características são freqüentes nas bandas R, que por sua vez, compreendem a maior parte da região transcrita do genoma (CHRISTMANN et al.,1991, CRAIG; BICKMORE, 1994; FERRARO et al.,1993; KORENBERG; RIKOWISKI, 1988; ROYLE et al.,1988; BERNARDI, 1993).

Com a finalidade de buscar indícios que pudessem ser atribuídos a uma região promotora, o segmento mamífero do clone B7 foi analisado com auxílio do programa Promoter Scan II. A mesma análise foi feita para o segmento inteiro, de sorte a verificar se a região de kDNA poderia atuar como um promotor naquela região. Este aplicativo busca as seqüências consenso TATA e CAT (Py<sub>2</sub>CAPy<sub>5</sub>) nas posições comumente encontradas nos promotores mamíferos. Quando a premissa é atendida o programa calcula o grau de similaridade com diferentes promotores, e identifica a presença de possíveis sítios regulatórios. Foram encontrados alguns consensos TATA bacteriano e CAT ao longo do segmento B7 porém, em posições incomuns para uma região promotora. Segundo esta análise, tanto a região hospedeira como a de minicírculo não comporiam um promotor típico, contudo, em decorrência da grande divergência existente entre as regiões promotoras eucariotas, o não atendimento das premissas não descarta por completo a possibilidade de o segmento funcionar como promotor *in vivo* (LEWIN, 2004). Observa-se, entretanto, que o minicírculo de kDNA apresenta em sua estrutura algumas seqüências moduladoras da expressão gênica, identificadas através do programa Signal Scan. O significado biológico dessas seqüências irá depender do contexto do sítio de integração no genoma. Em geral, seqüências regulatórias da transcrição são comuns em promotores, ou

próximas a eles, mas podem estar localizadas em locais distantes do ponto onde estaria ocorrendo transcrição na fita de DNA, e mesmo assim, exercer influência na expressão gênica, conforme as curvaturas assumidas pela molécula e proteínas associadas (LEWIN, 2004). Dentre as encontradas no minicírculo integrado, destaca-se a ativadora de transcrição: CCAAT Box. Estas seqüências ativadoras são reconhecidas pela proteína NF-Y (também conhecida por CBF), e são encontradas ao longo de diferentes regiões gênicas.

A manifestação da forma crônica da Doença de Chagas ocorre, em geral, quando o paciente já se encontra na idade adulta, adentrando a meia idade. Neste período observam-se modificações graduais nos padrões de produção de certos hormônios em consequência do processo natural de envelhecimento. Conhecendo-se as seqüências afetadas por esta modificação hormonal, associado ao conhecimento dos locais de integração dos minicírculos de kDNA no genoma, seria possível diagnosticar a possibilidade de manifestação da fase crônica cardíaca da doença no paciente, e desenvolver métodos que permitissem a não evolução dos sintomas, ou mesmo cura, através da terapia gênica.

**CONCLUSÕES**

- 1) Os clones do grupo A são quimeras de DNA humano/kDNA.
- 2) Os segmentos de DNA híbridos humano/kDNA hospedeiro provenientes das linhagens subclonais A11, C4 e C6 apresentam instabilidade genética quando clonados nos vetores: PCRII, PCR2.1, pBluescript,  $\lambda$ gt10, nas diferentes combinações de linhagens bacterianas hospedeiras DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  MCR, XL1-blue, XL1-blue MRF', CES 201, Sure Cells, Inv $\alpha$  F' e C600.
- 3) O método de captura permitiu recuperar de forma eficiente segmentos de kDNA presentes nas linhagens subclonais.
- 4) O clone B7 apresenta instabilidade genética parcial no vetor PCR 2.1 em DH5 $\alpha$ .
- 5) Existem seqüências regulatórias presentes no minicírculo de kDNA integrado potencialmente capazes de modificar a expressão gênica da célula hospedeira.
- 6) Os minicírculos isolados das linhagens subclonais apresentaram regiões variáveis encurtadas em relação ao padrão descrito por Sturm e Simpson (1990).
- 7) O encurtamento ocorreu durante ou após a integração dos minicírculos no genoma.
- 8) Existe recorrência nas famílias de minicírculos que se integram no genoma.
- 9) Os minicírculos que se integram preferencialmente são instáveis quando clonados nos vetores PCR 2.1 e  $\lambda$ gt10 e hospedeiras XL1-blue MRF' e CES 201.
- 10) Existe recorrência nos sítios de integração.
- 11) Existem combinações de tensão que propiciam dobramentos na molécula de DNA em regiões próximas ao sítio de integração sugerindo a existência de palavras estruturais.
- 12) A integração reduz a tensão local nos pontos de integração do minicírculo de kDNA no genoma hospedeiro.

## BIBLIOGRAFIA

- ALDER, B. K., E HAJDUK, S. L. Guide RNA requirement for editing-site-specific endonucleolytic cleavage of preedited mRNA by mitochondrial ribonucleoprotein particles in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 5377 – 5385, 1997.
- ALDER, B. K.;HAJDUK, S. L. Mechanisms and origins of RNA editing. **Current Opinion Genetics and Development**, v. 4, p. 316 – 322, 1994.
- ARGAÑARAZ, E. R. **Integração de sequências de minicírculo de kdna de trypanosoma cruzi em elemento II no genoma da célula hospedeira**. Tese de doutorado. Imunologia e Genética Aplicadas, Faculdade de Ciências da Saúde , Universidade de Brasília , 1996
- ARKHIPOVA, I.; MESELSON, M. Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 97, p. 14473–14477, 2000.
- ATIAS, A. Enfermidad de Chagas digestiva en Chile. **Bol. Chileno de Parasitol**, v. 24, p. 70 -74. 1969
- ÁVILA, H.; SIMPSON, L. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs from *Trypanosoma cruzi*. **RNA**, v.1, p. 939 – 947, 1997.
- AZAD, R. K.; LAWRENCE, J. G. Use of Artificial Genomes in Assessing Methods for Atypical **Gene Detection**. **PLoS Computational Biology**, v.1 (6), p. e56, 2005.
- BABUSHOK, D. V.; KAZAZIAN, H. H. Progress in Understanding the Biology of the Human Mutagen LINE-1. **Human Mutation**. v 0: 1-13, 2007.
- BABUSHOK, D. V.; OSTERTAG, E. M.; COURTNEY, C. E.; CHOI, J. M.; KAZAZIAN, H. H. Jr. L1 integration in a transgenic mouse model **Genome Research**, v. 16, p. 240-250, 2006.
- BACOLLA, A.; JAWORSKI, A.; LARSON, J. E.; JAKUPCIAK, J. P.; CHUZHANOVA, N.; ABEYSINGHE, S. S.; O'CONNELL, C. D.; COOPER, D. N.; WELLS, R. D. Breakpoints of gross deletions coincide with non-B DNA conformations **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v.101, p. 14162–14167, 2004.
- BALBINDER, E.; MAC VEAN, C.; WILLIAMS, R. E. Overlapping direct repeats stimulate deletions in socially designer derivatives of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, **214**: 233 – 252.,1989.
- BARRETO, M. P. Epidemiologia. In **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**; Eds.: Brener, Z e Andrade, Z. A. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 89 – 159, 1979.
- BARRIO, A.; MORA, M. C.; RAMOS, F.; MORENO, S., SAMSON, R.; BASOMBRÍO ,M. A. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77(4), p. 636-639, 2007.
- BEEN, M. D.; BURGESS, R. R.; AND CHAMPOUX, J. J. Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. **Nucleic Acids Research**, v.12(7), p. 3097 – 3114. 1984.
- BELFORT, M; E PERLMAN, P. S. Mechanism of intron mobility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270(51), p. 30237 – 30240,1995.
- BELGNAOUI, S. M.; GOSDEN, R. G.; SEMMES, O. J.; HAOUDI, A. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 6, p.13, 2006.
- BELLE, E. M. S., EYRE-WALKER, A. A test of whether selection maintains isochores using sites polymorphic for *Alu* and II element insertions. **Genetics**, v. 160, p. 815–817, 2002.
- BELTZ, L.A.; SZTEIN, M. B.; KIERZENBAUM, F. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes: inhibition of IL-2 receptor expression. **Journal of immunology**, v.141, p. 289 – 294, 1988.

- BENITO, M. I; E WALBOT, V. Characterization of the maize *mutator* transposable element MURA transposase as a DNA binding protein. **Molecular and Cell. Biology**, v.17 (9), p.5165 – 5175, 1997.
- BENNE, R.; VAN DEN BURG, J.; BRAKENHOFF, J. P. J.; SLOOF, P.; VAN BOOM, J. H. E TROMP, M. C. Major transcript of the frameshifted *cox III* gene from *Trypanosoma* mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in DNA. **Cell**, v. 46, p. 819 – 826, 1986.
- BERNARDI, G. The human genome: organization and evolutionary history, **Annu. Rev. Genetics**, 29: 445 – 476, 1995.
- BERTRAND, P.; ROUILLARD, D.; BOULET A.; LEVALOIS, C.; SOUSSI, T.; LOPEZ, B.S. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. **Oncogene**, v.14(9), p.1117 – 1122, 1997.
- BESTOR, T. H.; TYCKO, B. Creation of genomic methylation patterns. **Nature Genetics**, v. 12, p. 636 – 367, 1996.
- Bi, X.;Liu, F. A replicational Model for DNA recombination between direct repeats. **Journal of Molecular Biology**, v.256, p.849 – 858. 1996
- BIEMONT, C; VIEIRA, C. **What transposable elements tell us about genome organization and evolution: the case of Drosophila.** *Cytogenet Genome Res.* V 110 (1-4): 25-34, 2003.
- BLINOV, V. M.; RESENCHUK, S.M.; UVAROV, D. L.; CHIRKOVA, G. B.; DENISOV, S. I.; AND KISSELEV, L. L. *Alu* elements in human genome: invariant secondary structure of Left and Right monomers. **Mol. Biol.** v. 32 (1), p. 70-77, 1998.
- BLUM, B.; BAKALARA, N.; SIMPSON, L. A model for RNA editing kinetoplastid mitochondria “Guide”RNA molecular transcribed from maxicircle DNA provided the edited information. **Cell**, v. 60, p. 189 – 198, 1990.
- BOE, L; TOLKER-NIELSEN, T. Plasmid stability: comments on the dimer catastrophe hypothesis. **Mol. Microbil.**, v. 23(2), p. 247 – 253, 1997.
- BOWATER, R. P.; WELLS, R. D. The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. **Progress in Nucleic Acids Research Molecular Biology**, v. 66, p.159–202, 2001.
- BRANDARIZ, S.; SCHIJMAN, A.; VIGLIANO, C.; ARTEMAN, P.; VIOTTI, R.; BELDJOR, C.; LEVIN, M. - Detection of parasite DNA in Chagas’ heart disease. **Lancet**, v.346 (18), p.1370 – 1371, 1995.
- BRYDA, E. C.; DEPARI, J. A.; SANT’ ANGELO, D. B.; MURPHY, D. B.; PASSMORE, H. C. Multiple sites of crossing over within the Eb recombinational hotspot in the mouse. **Mammalian Genome**, v. 2: 123 – 129, 1992.
- BULLOCK, P.; CHAMPOUX, J. J.; BOTCHAN, M. Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. **Science**, 230: 954 – 958, 1985.
- BURWINKEL B.; KILIMANN, M. Unequal homologous recombination between Line – 1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease. **J. Mol. Biol.**, v. 277, p. 513 – 517, 1998.
- BUZDIN, A. A; GOGVADZE, E; KOVALSKAYA, E; VOLCHKOV, P; USTYUGOVA, S; ILLARIONOVA, A; FUSHAN, A; VINOGRADOVA; T; SVERDLOV, E. **The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through in vivo RNA recombination.** *Nuclei Acid Research.* V 31 (15): 4385-4390, 2003.
- BUZDIN, A. A; GOGVADZE, E; LEBRUN, M. H. **Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification.** *FEBS.* V 581: 2877-2882, 2007.
- CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I.; MORALES, C.; NANTES R. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 56 (3), p. 329 – 334, 1997.

- CASSE, N.; BUI, QT; NICOLAS, V; RENAULT, S; BIGOT, Y; LAURIER, M. **Species sympatry and horizontal transfers of *Mariner* transposons in marine crustacean genomes.** *Molecular Phylogenetics and Evolution.* V 40: 609-619, 2006.
- CAVALIER-SMITH, T. Intron phylogeny: a new hypothesis. **Trends in Genetics** v. 7(5), p. 145 – 148, 1991.
- CHEN, J. M; FÉREC, C; COOPER, D. N. **LINE-1 Endonuclease-Dependent Retrotranspositional Events Causing Human Genetic Disease: Mutation Detection Bias and Multiple Mechanisms of Target Gene Disruption.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* V 2006: 1-9, 2006.
- CHENG, C; KUSSIE, P.; PAVLETICH, N.; SHUMAN, S. Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. **Cell**, **92**: 841 – 850. 1998
- CHOI I-G; KIM, S-H. Global extent of horizontal gene transfer. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 104 (11), p. 4489–4494, 2007.
- CHOI, J; PARK, J; JEON, J; CHI, MH; GOH, J; YOO, SY; PARK, J; JUNG, K; KIM, H; PARK, SY; RHO, HS; KIM, S; KIM, BR; HAN, SS; KANG, S; LEE, YH. **Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*.** *Molecular Microbiology.* V 66 (2): 371-382, 2007.
- CHRISTMANN, A.; LAGODA, P.J.L.; ZANG, KD. Non-radioactive in situ hybridization pattern of the M13 minisatellite sequences on human metaphase chromosomes. **Hum. Genet.**, v. 86, p.487 – 490, 1991.
- CICARELLI, R. M. B. LOPES, D. Characterization of a protein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes that cleaves non-immune IgG bound through its Fab fragment. **Journal of Immunology.** v.142, p.1685 – 1690, 1989.
- CONSTANTINO, A.; DAVIES, A. A.; WEST, S. C. Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. **Cell**, v. 104, p. 259–268, 2001.
- CORDAUX, R.; LEE, J.; DINOSO, L.; BATZER, M.A. Recently integrated *Alu* retrotransposons are essentially neutral residents of the human genome. **Gene**, v. 373, p. 138–144, 2006.
- COST, G. J.; FENG, Q.; JACQUIER, A.; BOEKE, J. D. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. **EMBO Journal**, v. 21, p. 5899–5910, 2002.
- COST, G. J.; GOLDING, A.; SCHLISSEL, M. S.; BOEKE, J. D. Target DNA chromatinization modulates nicking by L1 endonuclease. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 573–577, 2001.
- COURA, J. R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H. P. F. Morbidade da Doença de Chagas. I estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78:3, p.363-372, 1983.
- CRAIG, J. M.; BICKMORE, W. A. The distribution of CpG island in mammalian chromosomes. **Nat. Genet.**, v.7, p. 376 – 381, 1994.
- CRUZ-REYES, J.; SOLLNER-WEBB. Trypanosome U-deletion RNA editing involves guide RNA directed endonuclease cleavage, terminal U exonuclease, e RNA activities. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 93, p. 8901 – 8906, 1996.
- CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B. MESSIAS, I.; STOLF, NOEDIR, BELLOTTI, G.; PATARROYO, M. E.; PILLEGGI, F.; KALIL J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of cardiac myosin-specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 92, p. 3541 – 3545, 1995.
- DAVIS, C. C.; WURDACK, K. J. **Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales.** *Science.* V 305 (5684): 676-678, 2004.
- DE PAULA, E.V; GONCALES,N.S.L; XUEREF, S.; ADDAS-CARVALHO, M.; GILLI S. C.O.; ANGERAMI, R. N.; GONCALES, F. L Jr. Prevalence of transfusion-transmitted Chagas disease among multitransfused patients in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, 8:5 (www.biomedcentral.com/1471-2334/8/5), 2008.

- DEININGER, P. L.; BATSER, M. A.; HUTCHISON, III C. A.; EDGEL, M. H. Mastar genes in mammalian repetitive DNA amplification. **TIG**, v. 8(9), p. 307 – 311, 1992
- DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. **Alu Repeats and Human Disease**. *Molecular Genetics and Metabolism*. V 67: 183-193, 1999.
- DEININGER, P. L.; MORAN, J. V.; BATZER, M. A.; KAZAZIAN H. H. JR. Mobile elements and mammalian genome evolution. **Current Opinion in Genetic e Development**, v. 13, p. 651, 2003.
- DERE, R.; NAPIERALA M.; RANUM, L. P. W.; WELLS, R. D. Hairpin Structure-forming Propensity of the (CTG-CAGG) Tetranucleotide Repeats Contributes to the Genetic Instability Associated with Myotonic Dystrophy Type 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279 (40), p. 41715–41726, 2004.
- DEWANNIEUX, M., ESNAULT, C., HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked *Alu* sequences. **Nature Genetics**, v. 35, p. 41–48, 2003.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas Disease Control in Latin América – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 97(5), p. 603-612, 2002.
- DIEKMANN, S.; LILLEY, D. M. J. The anomalous gel migration of stable cruciform: temperature and salt dependence, and some comparisons with curved DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 14: 5765 – 5774. 1987
- DIEKMANN, S.; WANG, J. C. On the sequence determinants and flexibility of the kinetoplast DNA fragment with abnormal gel electrophoretic mobilities. **Journal of Molecular Biology** v. 186 p. 1 – 11. 1985
- DOAK, T. G.; WITHERSPOON, D. J.; DOERDER, F. P.; WILLIAMS, K.; HERRICK. G. Conserved features of TBE1 transposons in ciliated protozoa. **Genetica**, v. 101, p. 75 – 86, 1997.
- DOMBROSKI, B. A.; SCOTT, A. F.; KAZAZIAN JR., H. H. Two additional potential retrotransposons isolated from human L1 subfamily that contain an active retrotransposable element. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 90, p. 6513 – 6517, 1993.
- DU, Q.; LIVSHITS, A.; KWIASTEK, A.; JAYARAM, M.; VOLOGODSKII, A. Protein-induced Local DNA Bends Regulate Global Topology of Recombination Products **Journal of Molecular Biology**, v. 368, p. 170–182, 2007.
- EYRE-WALKER, A. Recombination and mammalian genome evolution. **Proc. R. Soc. London Ser. B252**: p. 237 – 243, 1993.
- FANNING, T. G.; SINGER, M. F. Line 1: A mammalian transposable element. **Biochem Biophys. Acta**, v. 910, p. 203 – 212, 1987.
- FARKASH, E. A.; KAO, G. D.; HORMAN, S. R. AND PRAK, E. T. L. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. **Nucleic Acids Research**, v. 34 (4), p. 1196–1204, 2006.a
- FARKASH, E. A.; PRAK, E. T. L. DNA Damage and L1 Retrotransposition. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2006, Pages 1–8. 2006b
- FAWCETT, J. A.; KAWAHARA, T.; WATANABE H.; YASUI Y. A SINE Family Widely Distributed in the Plant Kingdom and its Evolutionary History **Plant Molecular Biology** v. 61 (3), p. 505-514, 2006.
- FEAGIN, J. E.; ABRAHAM, J. M.; STUART, K. Extensive editing of the citocromo c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 53, p. 413 – 422, 1988.
- FENG, Q.; MORAN, J. V.; KAZAZIAN, H. H. Jr.; BOEKE, J. D. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. **Cell**, v. 87, p. 905–916, 1996.
- FERRARO, M.; PREDAZZI, V.; PRANTERA G. In human chromosomes telomeric regions are enriched in CpG relative to R-bands. **Chromosoma**, v. 102, p. 712 – 717, 1993.
- FINNEGAN, D. J. Retrovirus transposable elements- which come first? **Nature**, v. 302, p. 105 – 106, 1983.
- FLAHERTY J. T. Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. **The American Journal of Medicine**, v. 91 (sup 3C), p. 79 - 85. 1991

- FRANÇA, L. A.; ROCHA, A.; BARBOSA, A. J. A.; LOPES, E. R. Chagas disease: mononuclear cell infiltration but no trypanosomes in the coronary sinus and cardiac veins of chronic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 432, 1997.
- GABRIELIAN, A.; PONGOR, S. Correlation of intrinsic DNA curvature with DNA property periodicity. **FEBS Letters**, v. 393, p. 65 - 68, 1996.
- GABRIELIAN, A.; SIMONCSITS, S.; PONGOR S. Distribution of bending propensity in DNA sequences. **FEBS Letters**, v. 393, p. 124 -130, 1996.
- GARCIA, E. S. E AZAMBUJA, P. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today**, v.79, p. 240 – 244, 1991.
- GILBERT, N.; LABUDA, D. CORE-SINES: eukaryotic short interspersed retroposing elements with common sequence motifs. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 96 (6), p. 2869, 1999.
- GILBERT, N.; LUTZ, S.; MORRISH, T. A.; MORAN, J. V. Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. **Molecular Cell Biology**, v. 25, p. 7780–7795, 2005.
- GILBERT, N.; LUTZ-PRIGGE, S.; MORAN, J. V. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. **Cell**, v. 110, p. 315–325, 2002.
- GOGARTEN, J. P.; TOWNSEND, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3 (9), p. 679-687, 2005.
- GOGARTEN, J.P.; DOOLITTLE, W. F.; LAWRENCE, J. G. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. **Molecular Biology Evolution**, v. 19 (12), p.2226-2238, 2002.
- GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R, PENA, S. D. J, GALVÃO, L. M. C. CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of the Polimerase Chain Reaction for detection in human blood. **Experimental Parasitology**, v. 88 (1), p. 28-33, 1998.
- 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, p. 1677-1685; 2001.
- GOODIER, J. L.; OSTERTAG, E. M.; ENGLEKA K. A.; SELEME, A. S.; KAZAZIAN, H.H. Jr. A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition. **Human Molecular Genetics**, v. 13, No. 10, 2004.
- GOUGH G. W.; LILLEY, D. M. J. DNA bending induced by cruciform formation. **Nature**, v. 313, p.154 – 156. 1985
- GRAFF, J. R.; HERMAN, J. G.; MYÖHÄNEN, S.; BAYLIN S. B. E VERTINO, P. M. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272(35), p. 22322 – 22329, 1997.
- GRAHAM, T e BOISSINOT, S. **The Genomic Distribution of L1 Elements: The Role of Insertion Bias and Natural Selection**. Journal of Biomedicine and Biotechnology. v. 2006: 1-5, 2006.
- GRINDLEY, N. D. F, WHITESON, K. L.; RICE, P. A. Mechanisms of site-specific recombination **Annual Review Biochemistry**, v. 75, p. 567 – 605, 2006.
- GROVER, D.; MAJUMDER, P.P.C, B.R.; BRAHMACHARI, S.K.; MUKERJI, M. Nonrandom distribution of *Alu* elements in genes of various functional categories: insight from analysis of human chromosomes 21 and 22. **Molecular Biological Evolution**, v. 20, p. 1420–1424, 2003.
- GROVER, D.; MUKERJI, M.; BHATNAGAR, P.; KANNAN, K.; BRAHMACHARI, S. K. *Alu* repeat analysis in the complete human genome: trends and variations with respect to genomic composition. **Bioinformatics**, v. 20, p. 813–817, 2004.
- GU, W.; DAVID, A.; RAY, D. A.; WALKER, J. A.; BARNES, E. W.; GENTLES, A. J. ; SAMOLLOU, P. B.; JURKA, J.; BATZER, M. A.; POLLOCK, D. D. SINES, evolution and genome structure in the opossum. **GENE**, v. 35795; No of Pages 13 – in press. [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene) . 2007

- GUEVARA, J. F., BLANDÓN, R., JOHNSON, C. M.; SOUZA, O.; LEANDRO, I. Aspectos clínicos anatomo-patológicos y terapêuticos de la enfermedad de Chagas em Panamá. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.30 (sup.2), p. 200 – 211, 1977.
- HACKENBERG, M.; BERNAOLA-GALVAN, P.; CARPENA, P.; OLIVER, J. L. The biased distribution of *Alus* in human isochores might be driven by recombination. **Journal of Molecular and Evolution**, v. 60, p. 365–377, 2005.
- HACKER J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review Microbiology*, v. 54, p. 641-679, 2000.
- HAGAN, C. E.; WARREN, G. J. Lethality of palindromic DNA and its use in selection of recombinant plasmids. **Gene**, v. 19, p. 147–151, 1982.
- HAJDUK, S.L.; HARRIS, M. E.; POLLARD, V. W. - RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **The FAESB Journal**, v. 7, p. 54 – 63, 1993.
- HAN, K.; KONKEL, M. K.; XING, J.; WANG, H.; LEE, J.; MEYER, T. J.; HUANG, C. T.; SANDIFER, E.; HEBERT, K.; BARNES, E. W.; HUBLEY, R.; MILLER, W.; ARIAN F. A. ULLMER, S.B.; BATZER M. A. Mobile DNA in Old World Monkeys: A Glimpse Through the Rhesus Macaque Genome. **Science**, v. 316, p. 238 - 240, 2007.
- HAN, K.; SEN, S. K.; WANG, J.; CALLINAN P. A.; LEE J.; CORDAUX R.; LIANG, P.; BATZER M. A. Genomic rearrangements by LINE-1 insertion-mediated deletion in the human and chimpanzee lineages. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 4040-4052, 2005.
- HENDERSON, S. T. PETES, T. D. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**, v.12, p. 2749 – 2757, 1992.
- HICKEY, D. A. Evolutionary dynamics of transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. **Genetica**, v. 86, p. 69 –274, 1992.
- HIGUCHI, M. L.; REIZ, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of na increase in CD8+T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human chagasic myocarditis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.56 (5), p.485 – 489, 1997.
- HOHJOH, H.; SINGER, M. F. Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. **EMBO Journal**, v. 15, p. 630–639, 1996.
- HOHJOH, H.; SINGER, M. J. Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. **EMBO Journal**, v. 16 (19), p.6034 – 6043, 1997.
- HONMA, M.; ZHANG, L. S.; HAYASHI, M.; TAKESHITA, K.; NAKAGAWA, Y.; TANAKA, N.; SOFUNI, T.; Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, p.4774 – 478, 1997.
- HULME, A. E.; BOGERD, H. P.; CULLEN, B. R.; MORAN, J. V. Selective inhibition of *Ahu* retrotransposition by APOBEC3G. **Gene**, v. 390, p. 199–205, 2007.
- HWU, H. R.; ROBERTS,J. W.; DAVIDSON, E. H.;BRITTEN, R. J. Insertion and/ or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 83, p.3875 – 3879, 1986.
- ICHIYANAGI, K.; OKADA. N. Genomic alterations upon integration of zebrafish L1 elements revealed by the TANT method. **Gene**, v. 383, p. 108–116, 2006.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, 21 OCTOBER, 2004.
- ISRAELWESKI, M. Structure and function of na AT-rich, interspersed repetitive sequence from *Chironomus thummi*: solenoidal DNA, 142 bp palindrome-frame and homologies with the sequence for site-specific recombination of bacterial transposons. **Nucleic Acids Research**, v. 20: 6985-6996. 1983

- JAXEL, C., CAPRANICO, G., KERRIGAN, D.; KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Effect of local DNA sequence in topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p. 20418 – 20423, 1991.
- JONES, E.; COLLEY, D.; TOSTES, S. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesion in human cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.48 (3),p. 348 - 357. 1993
- JUNQUEIRA, ACV; DEGRAVE, W; BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations.** *Trends in Parasitology*. V 21(6): 270-272, 2005.
- JURKA, J. Evolutionary impact of human *Alu* repetitive elements. **Current Opinion Genetics and Development**, v. 14, 603–608, 2004.
- KABLE, M. L.; SEIWERT, S. D.; HEIDMANN, S.; AND STUART, K. RNA editing: a mechanism for gRNA-specific uridylyate insertion into precursor mRNA; **Science** 273: 1189 – 1195, 1996.
- KALIL, J. CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in Chagas Disease Cardiopathy: Fulfilling the Criteria at Last? **Parasitology Today**, v. (12), p. 10, 1996.
- KAMATH-LOEB, A. S.; LOEB, L. A.; JOHANSSON, E.; BURGERS, P. M.; FRY, M. Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)<sub>n</sub> trinucleotide repeat sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 16439–16446, 2001.
- KANG, H. K.; COX, D. W. Tandem repeats 3 of the IGHA genes in the human immunoglobulin heavy chain gene cluster. **Genomics**, v. 35, p. 189–195, 1996.
- KASS, D. H.; BATZER, M. A.; DEININGR, P. LGene conversion as a secondary mechanism of short interspersed element (SINE) evolution. **Molecular Cell Biology**, v. 15(1), p. 19 - 25. 1995.
- KATINKA M. D.; BOURGAIN, F. M. Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DNA molecules injected into the macronucleus of Paramecium primaurelia. **EMBO Journal**, v. 11(2), p. 725 – 732, 1992.
- KATZ, L. A., Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1893–1900, 2002.
- KAUSHIK, M.; BANSAL, A.; SAXENA, S.; KUKRETI, S. Possibility of an Antiparallel (Tetramer) Quadruplex Exhibited by the Double Repeat of the Human Telomere. **Biochemistry**, V. 46, p. 7119-7131, 2007.
- KAZAZIAN H. H. JR.;MORAN, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. **Nature Genetics**, v. 19, p. 19 – 24, 1998.
- KAZAZIAN, H. H. JR.; WONG, C.; YOUSOUFIAN, H.; SCOTT, A. F.; PHILLIPS, D. G.; ANTONARAKIS, S. E. Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. **Nature**, v. 332, p. 164 – 166, 1988.
- KAZAZIAN, H.H. JR. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v. 12, 303 (5665), p. 1626-1632, 2004.
- KIM, T-M.; HONG, S.-J.; RHYU M.-G.. Periodic Explosive Expansion of Human Retroelements Associated with the Evolution of the Hominoid Primate, **Journal Korean Med Science** v. 19, p. 177-85, 2004.
- KIRKPATRICK D. T; PETES, T. D. Repair of DNA loops involves DNA-mismatch and nucleotide-excision repair proteins. **Nature**, v. 387, p. 929 – 931, 1997.
- KIYAMA, W. Y.; KIYAMA, K. An Intrachromosomal Repeating Unit Based on DNA Bending. **Molecular and Cellular Biology**, Oct., p. 5664–5673, 1996.
- KIYAMA, W. Y.; SUZUKI, K. ; KIYAMA, K. DNA Bend Sites in the Human b-Globin Locus: Evidence for a Basic and Universal Structural Component of Genomic DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16 (7), p. 922–930, 1999.

- KMIEC, E. B.; ANGELIDES, K. J.; HOLLOWAN, W. K. Left-handed DNA and the synaptic pairing reaction promoted by *ustilago rec1* protein. **Cell**, v. 40, p. 139 – 145, 1985.
- KOBORI, J. A.; STRAUSS, C. A.; MINARD, K.; HOOD, L. Molecular analysis of hotspot recombination in the murine histocompatibility complex. **Science**, v. 234, p. 173 – 179, 1986.
- KOKOSKA, R. J.; STEFANOVIC, L.; TRAN, H. T. T.; RESNICK, M. A.; GORNENIN, D. A.; PETES, T. D. Destabilization of yeast micro- and minisatellite DNA sequences by mutation affecting a nuclease involved in okazaki fragment processing (*rad27*) and DNA polymerase  $\delta$  (*pol3-t*). **Molecular and cellular biology**, v. 18 (5), p. 2779 – 2788, 1998.
- KOLOSHA, V. O.; MARTIN, S. L. In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 94, p. 10155–10160, 1997.
- KORENBERG, J. RIKOWSKI, M. Human molecular organization: *Alu*, Lines and molecular structure of metaphase chromosome bands. **Cell**, v. 53, p. 391 – 400, 1988.
- KOUPRINA, N.; LEEM, S. H.; SOLOMON, G.; LY, A.; KORIABINE, M.; OTSTOT, J.; PAK, E.; DUTRA, A.; ZHAO, S.; BARRETT, J. C.; LARIONOV, V. Segments missing from the draft human genome sequence can be isolated by transformation-associated recombination cloning in yeast. **EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION EMBO reports**, v. 4 (3), p. 257- 262, 2003.
- KURLAND, C. G.; CANBACK, B.; BERG O G. Horizontal gene transfer: A critical view. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 100 no. 17: .p. 9658–9662, 2003.
- KUROSE, K.; HATA, K.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter on a possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system. **Nucleic Acids Research**, v. 23(18), p. 3704 – 3709, 1995.
- LAMBOWITZ, A. M. Infectious introns. **Cell**, v. 56, p. 323 – 326, 1989.
- LAN, M. S; MUGUIRA, M. An effective alternate cloning strategy for unstable mouse genomic sequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 641–644, 2005.
- LANDER, E.S. ET AL. (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM). Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, 409, 860–921. 2001
- LANKINEN, M. H.; VILPO, L. M.; VILPO, J. A. UV- and  $\gamma$ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 352(1-2) p. 31–38. 1996.
- LAURIA-PIRES, L., BOGLIOLO, A. R. AND TEIXEIRA, A. R. L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas Disease patients - II Isoenzyme and RFLP characterizations. **Experimental Parasitology**, v. 82, p. 182 – 190, 1996.
- LAWRENCE J. G.; HENDRICKSON, H. Lateral gene transfer: When will adolescence end? **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 739–749. 2003
- LEACH, R. F.; STAHL, F. W. Viability of  $\lambda$  phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases. **Nature**, v. 305, p. 448 – 451, 1983.
- LEE, J; CORDEUX, R; HAN, K; WANG, J; HEDGES, DJ; LIANG, P; BATZER, MA. **Different evolutionary fates of recently integrated human and chimpanzee LINE-1 retrotransposons**. *Gene*. V 10.1016: 1-10, 2007.
- LEE, S. T.; LIU, H. Y.; LEE, S. P.; TARN, C. Selection for arseniate resistance causes reversible changes in minicircle composition and kinetoplast organization in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 587 – 596, 1994.
- LEE, S. T.; TARN, C. CHANG, K. P. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominances during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 187 – 204, 1993.

- LEE, S. T.; TARN, C. WANG, C. Y. Characterization of sequence changes in kinetoplast DNA maxicircles of drug resistant *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, p. 196 – 208, 1992a.
- LEE, S. Y.; LEE, S. T.; CHANG, R. P. Transkinetoplastidy A novel phenome non involving bulk alteration of mitochondrion-kinetoplast DNA of trypanosomatid protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 39, p. 190 – 196, 1992b.
- LEEM, S-H.; KOUPRINA, K.; GRIMWOOD, J.; KIM, J-K; MULLOKANDOV, M.; YOON, Y-H.; CHAE, J-Y.; MORGAN, J.; LUCAS, S.; RICHARDSON, P.; DETTER, C.; GLAVINA, T.; RUBIN, E.; BARRETT J. C.; LARIONOV V. Closing the Gaps on Human Chromosome 19 Revealed Genes With a High Density of Repetitive Tandemly Arrayed Elements. **Genome Research**, v. 14, p. 239-246; 2004
- LEVINSON, G.; GUTAMN, G. A. Slipped-strad mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.203 – 221, 1987.
- LEWIN B. **Genes VIII**. Prentice Hall, 2004. 1056p.
- LINIAL, M.; SHLOMA, J. The Sequence-directed Bent Structure in Kinetoplast DNA Is Recognized by an Enzyme from *Crithidia fasciculata*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262 (31), Issue of November 5, p. 15194 -15201,1987.
- LOBACHEV, K. S.; SHOR, B. M.; TRAN, H. T.; TAYLOR, W.; KEEN, J. D.; RESNICK, M. R.; GORDENIN, D. A. Factor affecting inverted repeat stimulation of recombination and deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 148, p.1507 – 1524, 1998.
- LOCKSLEY, R. M. Exploitation of immune and other defence mechanisms by parasites: an overview. **Parasitology**. v.115 (Suppl), p. S5-7, 1997.
- LUAN, D. D.; KORMAN, M. H.; JAKUBCZAK, J. L.; EICKBUSH, T. H. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. **Cell**, 72, 595–605, 1993.
- LUI,-J-F, Cytogenetic study of pure breed and hybrid wild boar (*Sus scrofa scrofa*) in Southeast and South Brazil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 3(1), p. 43-48, 2000.
- LUKES, J; HASHIMI, H; ZYKOVA, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates**. *Curr Genet*. V 48: 277-299, 2005.
- MACLEOD, D.; LOVELL-BADGE, R.; JONES, S.; JACKSON, I. A promoter trap in embrionic stem (ES) cells selects for integration of DNA into CPG islands. **Nucleic Acids Research**, v. 19 (1), p. 1 – 17, 1991.
- MALIK, H. S.; EICKBUSH; T. H. Retrotransposable elements R1 and R2 in the rDNA units of *Drosophila mercatorum*: abnormal abdomen revisited. **Genetics**, v. 151, p. 653–665, 1999.
- MARCADIER, J. L.; PEARSON, C. E. Fidelity of Primate Cell Repair of a Double-strand Break within a (CTG).(CAG) Tract. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, No. 36, p. 33848–33856, 2003.
- MARRI, P. R.; HAO, W.; GOLDING, G. B. The role of laterally transferred genes in adaptive evolution. **BioMed Central Evolutionary Biology**, v. 7(Suppl 1): S8, p. 1-14, 2007.
- MARTIN, S. L.; BUSHMAN, F. D. Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. **Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 467–475, 2001.
- MARTIN, S. L.; CRUCEANU, M.; BRANCIFORTE, D.; WAI-LUN, LI P.; KWOK, S. C.; HODGES, R. S.; WILLIAMS, M. C. LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, p. 549–561. 2005.
- MARTIN, SL. **The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition**. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. V 2006: 1-6, 2006.
- MATHIAS, S. L.; SCOTT, A. F.; KAZAZIAN, H. H. Jr.; BOEKE, J. D.; GABRIEL, A. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. **Science**, v. 254, 1808–1810, 1991.
- MCFARLANE MORAG; WILSON, J. A model for the mechanism of precise integration of microinjected trasgene. **Transgenic Research**, v. 5, p. 171 – 177, 1996.

- MCGLYNN, P.; LLOYD, R. G. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3(11), p. 859–870, 2002.
- MCMURRAY, C. T. Mechanisms of DNA expansion. **Chromosoma**, v. 104, p. 2 – 13, 1995.
- MEIMA, R.; HAIJEMA B. J.; DIJKSTRA, H.; HAAN, G-T.; VENEMA, G.; BRON, S. Role of enzymes of homologous recombination in illegitimate plasmid recombination in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** v. 179(4), p. 1219 – 1229, 1997
- MEKEEL, K. L.; TANG, W.; KACHINC, L. A.; LUO, C. M.; DEFRANK, J. S.; POWELL, S. L. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. **Oncogene**, Apr.17 14(15): 1847 – 1857, 1997.
- MELO, M. R.; POMMER, C. V.; KAVATI, R. Polinizacao artificial da atemoia com diversas fontes de polen comparada com a natural. **Bragantia**, v. 61 (3), p. 231-236, 2002.
- MESERVY, J. M.; SARGENT, R. G.; IYER, R. R.; CHAN, F.; MCKENZIE, G. J.; WELLS, R. D.; WILSON, J. H. Long CTG tracts from the myotonic dystrophy gene induce deletions and rearrangements during recombination at the APRT locus in CHO cells. **Molecular and Cellular Biology**, 23, 3152–3162, 2003.
- MIGHELL, A. J.; MARKHAM, A. F.; ROBONSIN, P. A. *Alu* sequences. **FEBS Letters**, v. 417, p. 1-5, 1997.
- MIJAREZ, M. S. Contribucion al estudio de la patologia de la miocarditi cronica chagastica en Venezuela, morfologia relación anatomoclinica. Recision de 130 autopsias. **Archivos del Hosp. Vargas.**, v.7, p. 117-212. 1965.
- MIKI, Y. Retrotransposal integration of mobile genetics in human disease. **J. Hum. Genet.** v. 43, p. 77-84, 1998.
- MILOT, E.; BELMAAZA, A.; RASSART, E.; AND CHARTRAND, P. Association of a host DNA structure with retroviral integration site in chromosomal DNA. **Virology**, 201: 408 – 412. 1994.
- MINOPRIO, J. L. Transtornos esofagicos en a enfermedad de Chagas. **Prensa medica Argentina**, v. 53, p. 1791 -1797, 1966.
- MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; HONTEBEYRYE-JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Most B cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack of parasite specificity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 28, p. 553 – 56, 1998.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of the TCR T cells. **Immunological Reviews**, v.112, p. 183 – 207, 1989.
- MIRKIN, E. V.; MIRKIN, S. M. Mechanisms of transcription-replication collisions in bacteria **Molecular Cell Biology**, v. 25, p. 888–895, 2005.
- MOCAIO, A. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. **World health statistics quarterly**, v.50, p. 195-198, 1997.
- MODRICH, P. LAHUE, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p.101 – 133, 1996.
- MOHAMMADI, S.; SLAMA-SCHWOK, A.; LÉGER, G.; EL MANOUNI, D.; SHCLHYOLKINA, A.; LERUOX, Y.; TAILANDIER, E. Triple helix formation and homologous strand exchange in pyrene-labeled oligonucleotides. **Biochemistry**, v.36(48), p. 14836 – 14844, 1997.
- MONTEÓN, V. M.; FURUZAWA-CARBALEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; ROSALES-ENCINA, J. L.; REYES, P. A. American Tryposomosis: In situ and Generalized Features of parasitism and inflammation kinetics a murine model. **Experimental parasitology**, v. 83, p. 267 – 274, 1996.
- MORAN, J. V.; HOLMES, S. E.; NASS, T. P.; DEBERARDINIS, R. J.; BOEKE, J. D.; KAZAZIAN, H. H. JR. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. **Cell**, v. 87, p. 917 – 927, 1996.

- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.; MATTEI, D.; ROMANHA, A.; SIMPSON, L. Strains and clones of trypanosoma cruzi can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast dna minicircles. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, 77: 6810-6914, 1980.
- MORITA, T. H., YOSHIMURA, Y.; YAMAMOTO, A.; MURATA, K.; MORI, M.; YAMAMOTO, H.; MATSUSHIRO, A. A mouse homolog of the Escherichia coli recA and Saccharomices cerevisiae RAD51 genes. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 90, p. 6577 – 6580, 1993.
- MOWER, JP; STEFANOVI, S; YOUNG, GJ; PALMER, JD. Gene transfer from parasitic to host plants. **Nature**. v. 432, p.165-166, 2004.
- MOYZIZ, R. K.; TORNEY, D. C.; MEYNE, J.; BUCKINGHAM, J. D.; WU, J. R.; BURKS, C.; SIROTKIN, K. M.; GOAD, W. B. The distribution of interspersed repetitive sequences in the human genome. **Genomics**, 4: 273 – 279. 1989
- MUSOVA, Z; HEDVICAKOVA, P; MOHRMANN, M; TESAROVA, M; KREPELOVA, A; ZEMAN, J; SEDLACEK, Z. **A novel insertion of a rearranged L1 element in exon 44 of the dystrophin gene: Further evidence for possible bias in retroposon integration.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V 347: 145-149, 2006.
- NAYLOR, L. H.; CLARK, E. M. (d(GT)<sub>n</sub>. d(A/C)<sub>n</sub> sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. **Nucleic Acid Research**, v. 8(6), p. 1595 – 1601. 1990
- NEVES, C. S. V. J; YUHARA, E. N. Caracterizacao dos frutos de cultivares de atemoia produzidos no norte do Parana. **Semana de Ciências Agrárias de Londrina**, v. 24(2), p. 311-313, ref 8, 2003.
- O'NEILL, R. J. W.; O'NEILL, M. J. O.; GRAVES, J. A. M. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in a interspecific mammalian hybrid. **Nature**, v. 393, p. 68 – 72, 1998.
- OGIWARA, I.; MIYA, M.; OHSHIMA, K.; OKADA, N. V-SINEs: a new superfamily of vertebrate SINEs that are widespread in vertebrate genomes and retain a strongly conserved segment within each repetitive unit. **Genome Research**, v.12 (2), p. 316 – 324, 2002.
- OKUBO, M; HORINISHI, A; SAITO, M; EBARA, T; ENDO, Y; KAKU, K; MURASE, T; ETO, M. **A novel complex deletion–insertion mutation mediated by Alu repetitive elements leads to lipoprotein lipase deficiency.** *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007, doi:10.1016/j.ymgme.2007.06.018
- OLIVEIRA, L. C. B.; LAFAILLE, M. A. C.; LIMA, G. M. C. A.; ABRAHAMSOHN, I. A. Antigen-Specific IL4 – and IL10 –secreting CD4+ Lymphocytes increase in vivo susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. **Cellular immunology**, v. 170, p. 41-53, 1996.
- OSTERTAG, E.M.; KAZAZIAN, H. H. JR. LINEs in mind. **Nature**, v. 435 p. 16, 2005.
- PARADA, H.; CARRASCO, H. A.; AÑEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathologica study. **International journal of cardiology**, v. 60, p. 49 – 54, 1997.
- PAULL, T. T.; GELLERT, M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. **Genes e Development**, v. 13, p. 1276–1288, 1999.
- PEARSON, C. E.; EDAMURA, K. N.; Cleary, J. D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 6 (10), p.729-42, 2005.
- PETRAY, P.; CASTANOS-VELEZ, E.; GRIMSTEIN, S.; ORN, A.; ROTTENBERG, M.E. Role of nitric oxide in resistance and histopatology during experimental infection with *Trypanosoma a cruzi*. **Immunology letters**, v. 47, p. 121 - 126. 1995
- PETRY, K.; E VAN VOORHIS, W. C. Antigens of Trypanosoma cruzi that mimic mammalian nervous tissue: investigation of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas disease. **Research in Immunology**, v. 142, p. 151-156. 1991

- PILLER, K. J.; DECKER, C.J.; RUSCHE, L. N.; HARRIS, E. M.; HAJDUK, S. L.; SOLLNER-WEBB B.- Editing domains of *Trypanosoma brucei* mitochondrial RNAs identified by secondary structure. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.2916-2924. 1995a
- PILLER, K. J.; DECKER, C.J.; RUSCHE, S. L.; SOLLNER-WEBB B. *Trypanosoma brucei* mitochondrial guide RNA - mRNA chimera-forming activity cofractionates with an editing-domain-specific endonuclease and RNA ligase and is mimicked by heterologous nuclease and RNA ligase. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p. 2925 – 2932. 1995b
- PILLER, K. J.; RUSCHE, S. L.; AND SOLLNER-WEBB B. *Trypanosoma brucei* RNA editing. **The Journal of Biological Chemistry**. v.271: 4613 - 4619. 1996
- PITTMAN, D. L.; SCHIMENTI, C. Recombination in the mammalian germ line. **Current Topics. in Developmental Biology**, v. 37, p.1 - 35, 1998.
- PLATA, F. GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*. Synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma “in vivo”. **Annales de l'Institut Pasteur. Immunology**, v. 138, p. 397 – 408, 1987.
- POPTSOVA, M. S.; GOGARTEN, J. P, The power of phylogenetic approaches to detect horizontally transferred genes. **BioMed Central Evolutionary Biology**, v. 7( 45) p. 1-17. 2007.
- PRADO, F; PRIUAT, J.; AGUILERA, A. Recombination between DNA repeats in yeast hpr1Δ cells is linked to transcription elongation. **EMBO Journal**, v.16, 10, p.2826 – 2835, 1998.
- PYRRHO, A. S.; MORAES, J. L. C.; PEÇANHA, L. M. T.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. **Parasitology research**, v. 84, p. 333 – 337, 1998.
- RASSI, A. - Clínica: fase aguda. In: ***Trypanosoma cruzi e Doença de chagas***. Brener Z. e Andrade, Z. A. Eds. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1979.
- RAVEL, J.; WELLINGTON, E. M. H.; HILL, R. T. Interspecific Transfer of Streptomyces Giant Linear Plasmids in Sterile Amended Soil Microcosms **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, No. 2, p. 529–534, 2000.
- RAZIN, S. V.; IOUDINKOVA, E. S.; TRIFONOV. E.; SCHERRER, K. Non-clonability correlates with genome instability: A case of unique DNA region. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 481–486, 2001.
- RIBEIRO DOS SANTOS, M; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SILVA, J. S.; SAVINO, W. AND MENGEL, J. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, p. 29-39 , 1992.
- RIJKERS, T.; PEETZ, A.; RUTHER, U. Insertional mutagenesis in transgenic mice. **Transgenic research**, v. 3:, p.203 – 15, 1994.
- RIOU, G. F.; YOT, P. Heterogeneity of kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry**, v. 16 (11), p. 2390 – 2396, 1977.
- RIZZO, L. V. CUNHA-NETO, E. TEIXEIRA, A., R. L. **Infection and immunity**, v. 57, p. 2640 – 2644, 1989.
- ROGERS, MB; PATRON, NJ; KEELING, PJ. **Horizontal transfer of a eukaryotic plastid-targeted protein gene to cyanobacteria**. *BMC Biol.* V 5: 26-33, 2007.
- ROSSI, M. Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats: scanning and transmission electron microscopic study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57(3), p.321 – 327, 1997.
- ROYLE, N. J.; CLARKSON, R. E; WONG, Z.; JAFFREYS A. J. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. **Genomics**, v. 3, p. 352 – 360, 1988.
- RUBIN, C. M.; VANDEVOORT, C. A.; TEPLITZ, R. L.; SCHMID, C. W. *Alu* repeat DNAs are differentially methylated in primate germ cells. . **Nucleic Acids Research**, v. 22(23), p. 5121 – 5127, 1994.

- RUJAN, T.; MARTIN, W. How many genes in Arabidopsis come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. **Trends in Genetics** v. 17 (3), p. 131-120, 2001.
- SAMADASHWILY, G. M.; RACA, G.; MIRKIN, S. M. Tricucleotide repeats affect DNA replication in vivo Nature. **Genetics**, v. 17, p. 298–304, 1997.
- SANTOS-BUCH, C. A. TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of experimental Chagas' disease III-rejection of allogeneic heart cells in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 140, p.38 – 54, 1974.
- SARKAR, P. S.; CHANG, H-C.; BOUDI, F. B.; REDDY, S. cgt Repeats Show bimodal amplification in *E. coli*. **Cell**, v. 95 (13), p. 531-540, 1998.
- SASSAMAN, D. M.; DOMBROSKI, B. S.; MORAN, J. V.; KIMBERLAND, M. L.; NASS, T. P.; DEBERARDINIS, R. J.; GABRIEL, A.; SWERGOLD, G. D.; KAZAZIAN, H. H. Jr. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. **Nature Genetics**, v. 16: 37 – 43, 1997.
- SCHROTH, G. P.; HO, P. S. Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 1977–1983, 1995.
- SCOTT, J. A place in the world for RNA editing, **Cell** v. 81 (6), p. 833 – 836, 1995.
- SEIWERT, S. D. RNA editing hints of remarkable diversity in gene expression pathways . **Science**, 274: 1636 – 1637, 1996.
- SEIWERT, S. D; HEIDMANN, S. STUART, K. Direct visualization of uridylyate deletion in vitro suggest a mechanism for kinetoplastid RNA editing. **Cell**, v. 84, p. 831 – 841,1996.
- SELEME, MC; VETTER, MR; CORDAUX, R; BASTONE, L; BATZER, MA; KAZAZIAN, HH. Extensive individual variation in L1 retrotransposition capability contributes to human genetic diversity. **PNAS**. V. 103 (17): 6611-6616, 2006.
- SHAPIRO T.A.;ENGLUND P. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology** 49: 117 – 143., 1995.
- SHIROISHI, T.; KOIDE, T.; YOSHINO, M; SAGAI, T.; MORIWAKI, K. Hotspots of homologous recombination in mouse meiosis. **Advances in biophysics**, v. 31, p. 119 – 132, 1995.
- SIMÕES-BARBOSA A., BARROS A. M., NITZ, N., ARGANARAZ E.R, TEIXEIRA, A. R. L Integration of Trypanosoma cruzi kDNA Minicircle Sequence in the Host Genome May Be Associated with Autoimmune Serum Factors in Chagas Disease Patients. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. . 94, Supl. I: 249-252, 1999
- SIMPSON, L. The genomic organization of guide RNA in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 86: 133-141, 1997.
- SMITH, A. F. A. The origin of interspersed repeats in the human genome. **Current opinion in genetics e development**, v. 6, p. 743 –748, 1996.
- SONG J.; DONG, F.; LILLY J W; STUPAR, R. M.; JIANG J. Instability of bacterial artificial chromosome (BAC) clones containing tandemly repeated DNA Sequences. **Genome**, v. 44: p. 463–469, 2001.
- SOONG, L.; TARLETON, R. L. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, cmc, and c-fos gene expression. **Journal of Immunology**, v.149 (6), p. 2095 – 2102, 1992.
- STEINMETZ, M.; STEPHAN, S.; LINDAHL, F. Gene organization and recombinational hotspots in the murine major histocompatibility complex. **Cell**, v. 44, p. 895 – 904, 1986.
- STEINMETZ, M.; WINOTO, A.; MINARD, K.; HOOD, L. Cluster of genes encoding mouse transplantation antigens. **Cell**, v. 28, p. 489 – 498, 1982.
- STIBITZ, T. B.; KEELING, P. J.; BHATTACHARYA, D. Symbiotic origin of a novel actin gene in the cryptophyte *Pyrenomonas helgolandii*. **Molecular Biology Evolution**, v. 17, p. 1731-1738, 2000.
- STORINO, R.; AUGER, S.; MIGUEL, J. ¿ Cual es la realidad de la enfermedad de Chagas en Argentina y en America? - **Medicina (Buenos Aires)**, v. 57, p. 513 – 516, 1997.

- STRADER, E HOWELL, Stable maintenance of tandem array of four R67 dihydrofolate reductase genes. **Focus**, v.19(2), p.24 – 25, 1997.
- STRAND, M.; EARLY, M. C.; EARLEY, M. C.; CROUSE, G. F.; PETES, T. D. Mutations in the *MSH3* gene preferentially leads to deletion within tracts of simple repetitive DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 92, p. 10418 – 10421, 1995.
- STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R.M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274 – 276, 1993.
- STRAUSS, B. S.; SAGHER, D.; ACHARYA, S. Role of proofreading and mismatch repair in maintaining the stability of nucleotide repeats in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 806 – 813, 1997.
- STURM, N. R.; SIMPSON, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome c oxidase subunit III mRNA. **Cell**, v. 61, p. 879 – 884, 1990.
- SYMER, D. E.; CONNELLY, C.; SZAK, S. T.; CAPUTO, E. M.; COST, G. J.; PARMIGIANI, G.; BOEKE, J. D. Human I1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. **Cell**, v. 110, p. 327–338, 2002.
- TAKAHARA, T. ; OHSUMI, T.; KUROMITSU, J.; SHIBATA, K.; SASAKI, N.; OKASAKI, Y.; SHIBATA, H.; SATO, S.; YOSHIKI, A.; KUSAKABE, M.; MURAMATSU, M.; UEKI, M.; OKUDA, K.; HAYASHIZAKI, Y. Dysfunction of the *Orleans* reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of na active L1 sequence into the skipped exon. **Human molecular genetics**, v. 5(7), p. 989 – 993, 1996.
- TARLETON, R. L.; ZHANG, L.; DOWNS, M. O. “Autoimmune rejection” of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 94, p. 3932 – 3937, 1997.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current opinion in genetics e development**, v. 4; p. 832 – 837, 1994.
- TEIXEIRA A. R. L.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE FILHO, J. MACEDO, V. Chagas' disease; a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.32 (2), p. 258 – 272, 1983.
- TEIXEIRA AR, CUNHA NETO E, RIZZO LV, SILVA R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. **J Infect Dis**. 1990 Dec;162(6):1420.
- TEIXEIRA AR, LACAVA Z, SANTANA JM, 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(1), p.55-8, 1991.
- TEIXEIRA AR, SANTANA JM. Chagas' disease. Immunotoxin inhibition of *Trypanosoma cruzi* release from infected host cells in vitro. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 63(2), p. 248-52, 1990.
- TEIXEIRA AR, SANTANA JM. *Trypanosoma cruzi*: endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40(2), p.165-70, 1989.
- TEIXEIRA, A. R. L.; ARGANARAZ, E. R.; FREITAS JR, L. H.; LACAVA, Z. G. M.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. Possible Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation Research**, 305: 197 - 209. 1994
- TEIXEIRA, A. R. L.; ARGANARAZ, E. R.; FREITAS JR, L. H.; LACAVA, Z. G. M.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. Possible Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation Research**, v. 305, p. 197 – 209, 1994.
- TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' Disease. **The Journal of clinical investigation**, v.62, p.1132 – 1141, 1978a

- TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, G.; MACÊDO, V.; PRATA, A. *Trypanosoma cruzi* –sensitive T-lymphocyte mediated CR release from human heart cells in Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27(6), p. 1097 – 1107, 1978b.
- TEIXEIRA, ARL.; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V 101 (5): 463-491, 2006.
- THERTULIEN, R.; SIMPSON-HAIDARIS, P. J.;HAIDARIS, C. G. Intracellular localization of a *Trypanozoma cruzi* kDNA minicircle transcript using RNA:RNA in situ hybridization. **J. Euk.** v. 41 (4), p. 402-407, 1994.
- THERTULIEN, R.;AHIDARIS, C. G. Evidence that the entire length of a kinetoplast DNA minicircle is transcribed in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular microbiology**, v. 5, p. 207 – 215, 1991.
- THOMPSON, J. R.; PACOCHA, S.; PHARINO, C.; KLEPAC-CERAJ, V.; HUNT, D. E.; BENOIT, J.; SARMA-RUPAVTARM, R.; DISTEL, D. L.; POLZ, M. F. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. **Science**, v. 307 (5713), p.1311-1313, 2005.
- TIBAYRENC. M., KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Tichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v.87, p. 2414-2418, 1990.
- TRINH, T. Q; SINDEN, R. R. The influence of primary and secondary DNA structure in deletion and duplication between direct repeats in *Escherichia coli*. **Genetics**, v.134, p. 409 – 422, 1993.
- VAGO, A. R., MACEDO, A.M.; OLIVERIDA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; SIMPSON, A. J. G.; TOSTES, S.; PENA, S. D. J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am. J. Pathol.** 149: 2153-2159,1996a.
- VAGO, A. R., MACEDO, A.M.;ADAD, S. J.; REIS, D. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosma cruzi* DNA in esophageal tissues of patitents with chronic Chaga's disease. **Lancet**, v. 348, p. 891 – 892, 1996b.
- VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; ADAD, S. J.; D'AVILA REIS, D.; SILVA, G. C. CÔRREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas'disease. **Lancet**, v. 348, p. 891 – 892, 1997.
- VARMUS, M. Retroviruses. **Science**, v. 240, p. 1427 – 1435, 1988.
- VESPA, G.N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in conrol of *Trypanosoma cruzi* -induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and immunity**, v. 62, p. 5177 – 5182, 1994.
- VICKERMAN, D.; PRESTON, T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. **In: Biology of the kinetoplastidae** (Lumsdem, W. H. R. and Evans, D. A.) Vols. 35-130. Academic Press, New York . 1976.
- VLAHOVICEK K, KAJAN L, PONGOR S. DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;31(13):3686-7, 2003.
- VLAHOVICEK, K.; PONGOR, S. Model.it: building three dimensional DNA models from sequence data. **Bioinformatics Applications Note**, v. 16 no. 11, p. 1044–1045, 2000.
- WAHLS, W. P.; WALLACE, L. J.; MOORE, P. D. Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. **Cell**. v. 60(1), p. 95-103, 1990.
- WALLACE, M. R.; ANDERSEN, L. B.; SAULINO, A. M.; GREGORY, P. E.; GLOVER, T. W; COLLINS, F. S. A de novo *Alu* insertion results in neurofibromatosis type 1. **Nature**, v. 353, p. 864 – 866, 1991.
- WANG, G.; CHRISTENSEN, L. A.; VASQUEZ, K. M. Z-DNA-forming sequences generate large-scale deletions in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v.103, p. 2677–2682, 2006.

- WANG, G.; VASQUEZ, K. M. Z-dna, an active element in the genome. **Frontiers in bioscience**. v. 1 (12), p.4424-38, 2007.
- WANG, G.; VASQUEZ, K. M. Naturally occurring H-DNA-forming sequences are mutagenic in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 101, p. 13448–13453, 2004.
- WANG, G.; VASQUEZ, K. M. Non-B DNA structure-induced genetic instability. **Mutation Research**. v. 598, p.103–119, 2006.
- WATSON JD, CRICK FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**. Apr 25;v. 171(4356), p. 737-8, 1953.
- WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human molecular genetics**, v 2, p. 1123 – 1128, 1993.
- WEISS, R. A.; TEICH, N.; VARMUS, H.; E COFFIN, J. (eds) (1985) – Molecular biology of Tumor Viruses: RNA tumor virus. Vol. 1,2 Cold. Spring Harbor Laboratory. Cold. Spring Harbor, N. Y.
- WELLS R. D. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. **TRENDS in Biochemical Sciences** , v. 32 no.6, p. 271-278, 2007.
- WELLS, R. D.; ASHIZAWA, T. **Genetic Instabilities and Neurological Diseases**, 2nd Ed., Elsevier-Academic Press, San Diego, CA, 2006.
- WINCKER, P.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M.F.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; YAKSIC, N.; AZNAR, C.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE, M.; NOIREAU, F.; MOREL, C. M.; BRENIERE, S. F. PCR – based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in na active transmission area: comparason with conventional serological and parasitological diagnosis. **Parasitology**, v. 114, p. 367-373, 1997.
- WOJCIECHOWSKA, M.; BACOLLA, A.; LARSON, J. E.; WELLS, R. D. The Myotonic Dystrophy Type 1 Triplet Repeat Sequence Induces Gross Deletions and Inversions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 941–952, 2005.
- WOJCIECHOWSKA, M.; NAPIERALA, M.; LARSON, J. E. WELLS. R. D.. Non-B DNA Conformations Formed by Long Repeating Tracts of Myotonic Dystrophy Type 1, Myotonic Dystrophy Type 2, and Friedreich's Ataxia Genes, Not the Sequences per se, Promote Mutagenesis in Flanking Regions **The Journal of Biological Chemistry**, v.. 281 (34), p. 24531–24543, 2006.
- WOODCOCK, D. M.; WILLIAMSON, M. R.; DOHERTY, J. P. A sensitive RNase protection assay to detect transcripts from potentially functional human endogenous L1 retrotransposons. **Biochem. Biophys. Research Communications**, v. 222, p. 460 – 465, 1996.
- WYMAN, A. R.; WERTMAN, K. F.; BARKER, D.; HELMS, C.; PETRI, W. H. Factors wich equalize the representation of genome segments in recombinant libraries. **Gene**, v. 49, p. 263 – 271, 1986.
- WYMAN, A. R.; WOLFE, L. B.; BOTSTEIN, D. Propagation of some human DNA sequences in vector requires mutant *Escherichia coli* host. **Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)**, v. 82, p. 2880 – 2884,
- XING, J.; WANG, H.; BELANCIO, V. P.; CORDAUX, R.; DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.** v. 103, p. 17608-17613, 2006.
- YASUI, Y.; NASUDA, S.; MATSUOKA, Y.; KAWAHARA, T. The Au family, a novel short interspersed element (SINE) from *Aegilops umbellulata*. **Theoretical and Applied Genetics (TAG)**, v. 102: 463–470, 2001.
- YOLDER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet.** v. 13, p. 335 – 340, 1997
- ZHANGA C-T; REN ZHANG, R. An isochore map of the human genome based on the Z curve method. **Gene**, v. 317, p. 127–135, 2003.
- ZINGLER, N.; WILLHOEFT, U.; BROSE, H. P.; SCHODER, V.; JAHNS, T.; HANSCHMANN, K. M.; MORRISH, T. A.; LOWER, J.; SCHUMANN, G. G. Analysis of 50 junctions of human LINE-1 and *Alu*

retrotransposons suggests an alternative model for 50-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. **Genome Research**, v. 15, p. 780–789, 2005.

ZUCMAN-ROSSI, J.; BATZER, M. A.; STONEKING, M.; DELATTRE, O.; THOMAS, G. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by *Alu* retroposition and recombination. **Hum. Genet.** v. 99, p. 357 – 363, 1997.

**ANEXO I - ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E MARCAS GENÉTICAS**

°C	=	graus Celsius.
ug	=	micrograma (10 <sup>-6</sup> g).
ng	=	nanograma (10 <sup>-9</sup> g)
μL	=	microlitro (10 <sup>-6</sup> L)
uM	=	micro molar (10 <sup>-6</sup> M)
A	=	adenina
aa(s)	=	aminoácido (s)
b	=	bases (referente ao DNA fita simples)
C	=	timina
DNA	=	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	=	Ácido etilenodiamina tetracético
g	=	9,8 m/s <sup>2</sup> (aceleração da gravidade)
G	=	guanina
kb	=	quilo base (10 <sup>-3</sup> pb ou b)
M	=	molar (n <sup>o</sup> moles/L)
mg	=	miligrama (10 <sup>-3</sup> g)
mL	=	mililitro (10 <sup>-3</sup> L)
mM	=	milimolar (10 <sup>-3</sup> M)
ORF	=	Fase Aberta de Leitura (Open Reading Frame);
pb	=	pares de bases (referente à dupla fita do DNA)
PEG	=	Polietileno glicol
RNA	=	Ácido ribonucléico

rpm	=	rotações por minuto
SDS	=	Sódio Dodecil Sulfato
T	=	timina
TA	=	Temperatura Ambiente
U	=	unidade de atividade enzimática
UV	=	ultravioleta

$\Delta$  (gpt-proA) 62

$\Delta$  = mutação por deleção.

$\lambda^-$  = fago  $\lambda$  ausente

$\Delta(lacZYA-argF)$  = deleção LacZYA; requer arginina para o crescimento

$\Delta(mcrCB^+hsdSMR^-mrr)171$  = deleção no conjunto gênico entre parentese que reconhece e restringe sequências de DNA metiladas/não metiladas (vide significado de cada gene individualmente).

$\phi 80lacZ\Delta M15$  = carrega o lambdóide  $\phi 80$  profago com o gene lacZ com a deleção M15, permitindo a  $\alpha$  complementação da  $\beta$ -galactosidase hospedeira. Permite a seleção de vetores com e sem insertos pela interrupção que contenham a  $\beta$  galactosidase por coloração banca (-)/ azul (+) na presença de x-gal.

$F^-$  = não contém o episoma  $F'$

$argE3(Oc)$  = requer arginina para o crescimento

$deoR$  = mutação em genes regulatórios tornando a síntese de deoxiribose constitutiva desta enzima permite a introdução e propagação de DNAs que não sejam originários da *E. coli*.

$e14^-$  = elemento semelhante a um profago exisável e que carrega a informação para McrA;  $e14^-$  portanto são McrA $^-$ .

$endA1$  = mutação na endonuclease A $^-$  aumenta a qualidade das preparações plasmidiais, mas a presença do gene favorece as preparações de DNAs dupla fita;

$F'$  = contém o episoma  $F'$  plasmídio autocarreador; este episoma carrega as informações para o operon lac e proAB no  $F'$ lac-proA $^+B^+$

*gyrA96* = mutação na enzima girase – confere resistência a ácido nalidíxico.

*hflA* = resulta em alta frequência lisogênica por parte do fago  $\lambda$

*his G4 (Oc)* = requer histidina para o crescimento

*hsdM* = mutação na subunidade M responsável pela metilação e leva ao fenótipo ( $r_k^-$ ,  $m_k^-$ );

*hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) = mutação na endonuclease de restrição do sistema *EcoK EcoB* - restrição

*hsdRMS* - *hsdR* = mutação na endonuclease de restrição do sistema *EcoK EcoB*

*hsdS* = mutação na subunidade S que dá a capacidade de reconhecimento do sítio metilado no DNA das subunidades *HsdR* e *HsdM*; mutação neste sítio leva ao fenótipo ( $r_k^-$ ,  $m_k^-$ )

*lac Y1* = mutação na enzima  $\beta$ -galactose permease da membrana - bloqueia a utilização de lactose

*lac* = ausência do sistema de metabolização da galactose;

*mcrA* = mutação no sistema de restrição – bloqueia a restrição do DNA metilado na seqüência 5'..G<sup>m</sup>CGC..3' ,

*mcrBC* = mutação no sistema de restrição de seqüências metiladas de DNA nas posições 5'..G<sup>5</sup>C<sup>m</sup>..3'.

*mrr-* = mutação no sistema de restrição – bloqueia a restrição do DNA metilado 5'..GA<sup>m</sup>C..3' e 5'..CA<sup>m</sup>G..3'; esta mutação também previne a restrição *McrF* de seqüências metil citosina.

*mtl-1* = mutação no metabolismo do manitol; a ausência da enzima permite a introdução e propagação de DNAs que não sejam originários da *E. coli*

*proAB* = requer prolina para o crescimento

*recA1* = mutação na enzima *RecA* envolvida no processo de reparo/recombinação.

*recB* = mutação na Exonuclease V – (ATPase); importante na recombinação

*recC22* = mutação na Exonuclease V – (ligação ao DNA); importante na recombinação;

*recJ* = mutação na atividade exonucleásica de fita simples – envolvida na via alternativa de recombinação; impede a recombinação entre plasmídios.

*relA1* = mutação que elimina fatores restritivos – regula um número de processos biosintéticos; permite a síntese de RNA independente da síntese protéica

*rfdD1* = requer riboflavina para o crescimento

*sbcB15* = favorecem a estabilidade de insertos com repetições invertidas clonadas em fago.

*supE44* = supressor Amber necessário para o crescimento de mutantes amber

*thi-1* = requer tiamina para o crescimento

Tn10 = transposon com resistência a tetraciclina

Tn5 (Kan<sup>r</sup>) = transposon confere resistência a canamicina.

*umuC* = reduz o efeito mutagênico do reparo propenso a erro.

*uvrC* = mutação na endonuclease do sistema de reparo que leva a sensibilidade a UV

## Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon

Augusto Simões-Barbosa, Enrique R Argañaraz, Ana Maria Barros, Ana de Cássia Rosa, Nivaldo P Alves\*, Patrícia Louvandini, Marian R D'Souza-Ault, Nadjar Nitz, Nancy R Sturm\*\*, Rubens J Nascimento, Antonio RL Teixeira/†

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Caixa Postal 04536, 70919-970 Brasília, DF, Brasil\* Tecnogene Diagnóstico, Brasília, DF, Brasil \*\*Department of Immunology, Microbiology and Molecular Biology, David Geffen School of Medicine, University of California at Los Angeles, US

*The horizontal transfer of Trypanosoma cruzi mitochondrial minicircle DNA to the genomes of naturally infected humans may play an important role in the pathogenesis of Chagas disease. Minicircle integrations within LINE-1 elements create the potential for foreign DNA mobility within the host genome via the machinery associated with this retrotransposon. Here we document integration of minicircle DNA fragments in clonal human macrophage cell lines and their mobilization over time. The movement of an integration event in a clonal transfected cell line was tracked at three months and three years post-infection. The minicircle sequence integrated into a LINE-1 retrotransposon; one such foreign fragment subsequently relocated to another genomic location in association with associated LINE-1 elements. The p15 locus was altered at three years as a direct effect of minicircle/LINE-1 acquisition, resulting in elimination of p15 mRNA. Here we show for the first time a molecular pathology stemming from mobilization of a kDNA/LINE-1 mutation. These genomic changes and detected transcript variations are consistent with our hypothesis that minicircle integration is a causal component of parasite-independent, autoimmune-driven lesions seen in the heart and other target tissues associated with Chagas disease.*

Key words: kinetoplast - horizontal transfer - p15 - mutagenesis - pathogenesis - retrotransposition

Trypanosomes are members of the Order Kinetoplastida and represent a highly diverse and specialized group of eukaryotic organisms. *Trypanosoma cruzi* is transmitted by triatomines (Hemiptera: Reduviidae) to mammals; the infection occurs by invasion of phagocyte cells at the entry site (Teixeira et al. 2006). The infection can be transmitted by blood transfusion or transplacenta from mother to offspring. The migration of *T. cruzi*-infected individuals to North America, Europe, and Asia poses a threat to countries outside the normal range of the parasite, as these individuals are potential blood donors. Chagas disease affects 18 million people in Latin America and is characterized clinically by a spectrum of manifestations often seen several decades after establishment of the initial infection (WHO 2002). Chagas disease is the most lethal endemic human parasitic disease in the Western Hemisphere. It has been estimated that Chagas heart disease kills 100,000 people and accounts for 6 billion dollars worth of disability-adjusted life per year (WHO 1996). There is no vaccine against Chagas disease and its treatment is presently unsatisfactory

(Lauria-Pires et al. 2000). The pathologic lesions found in the heart and digestive system of chronic Chagas patients may not appear for decades after the initial infection, and may not be explained exclusively by active parasite tissue destruction. The minimal rejection unit, consisting of lyses of parasite-free target host cells by the immune system mononuclear cells, is a common denominator of pathology in Chagas disease (Teixeira et al. 2006).

*T. cruzi* is characterized by the presence of a single mitochondrion with topologically interlocked double-stranded maxicircles and minicircles that constitute almost 15% of the cellular DNA, representing the largest amount of extra-nuclear genetic material in any cell (Lukes et al. 2002, Liu et al. 2005, Junqueira et al. 2005). This kinetoplast DNA network is composed of several dozen maxicircles that code for two large ribosomal RNAs and a hydrophobic subset of mitochondrial proteins (Westenberger et al. 2006), along with several thousand minicircles that provide the information for the post-transcriptional process of RNA editing in the form of guide RNAs (Avila & Simpson 1995, Simpson et al. 2004). Each minicircle possesses four 122-bp conserved regions interspersed by four variable regions that contain guide RNA genes, totaling approximately 1400 bps (Sturm et al. 1989).

Our recent studies focused on the integration of *T. cruzi* minicircle fragments into host LINE-1 retrotransposons associated with chagasic-like pathology in the chicken and rabbit models, and in human patients showing heart arrhythmias characteristic of Chagas disease (Nitz et al. 2004). This work extended previous observations suggestive of minicircle integration into the

Financial support: CNPq/PADCT/MCT, Finep/World Bank. The authors have no conflicting financial interests. AS-B, ERA, AMB contributed equally to this work.

\*Corresponding author: steixeir@unb.br

Received 16 March 2006

Accepted 19 September 2006

host genome (Teixeira et al. 1994) with important implications for presentation of the autoimmune aspect of Chagas pathology in humans, resulting in publication in the prestigious journal *Cell*. Questions arose regarding authenticity of the integration site data, leading to a unilateral retraction by the *Cell* Editor (Marcus 2005). No experimental data contradicting the Nitz et al. (2004) paper was presented, nor was the implied contamination of the Chagas patients' DNA samples articulated. The validity of the reported rabbit and chicken model systems was not in question. It is our hope that this ominous Retraction will be rescinded by the *Cell* Editorial Board. We stand by our data, and continue to pursue the logical consequences of the phenomenon described.

The estimated 1,000,000 copies of mobile LINE-1 elements are considered a primary force in vertebrate genome evolution over the last 150 million years (Smit et al. 1995, Ostertag & Kazazian 2001). The LINE-1 transposable elements of the family Ta is approximately 6 kb. Full length, active LINEs are capable of retro-transposing to different sites in the genome. Most LINEs are truncated subsets, and a vast majority of copies shorter than 0.5 kb (Pavlicek et al. 2002a) are present in the human genome in proximity to A+T repeat-rich (G-banding in the chromosomes) regions, constituting preferential exon shuffling sites (Ostertag & Kazazian 2001). Furthermore, LINEs are free-loaders of repeat-rich SINEs (IAPs, HERVs, MIRs, and Alu-like microsatellites) generating local polymorphisms (Pavlicek et al. 2002b). Full-length LINEs have a poorly-characterized internal promoter at their 5'-end open reading frame; ORF-1 encodes a nucleic acid binding p40 protein; ORF-2 encodes a protein with endonuclease, reverse transcriptase, and zinc finger-like motif (Feng et al. 1996). The LINE-1 short 3'-untranslated region ends in a polyadenylated (poly A) tail that is important for reverse transcription; this region carries typical structural characteristics of genomic LINE-1s, such as inversions, deletions, and 5'-end microhomologies to the target DNA sequence (Babushok et al. 2006). Active LINE-1 retrotransposition involves functional elements employing a 'copy and paste' mechanism by which the retransposon proteins assemble with the RNA from which they were translated (Kazazian 2000). Genome analysis has identified an estimated 61 active LINE-1 elements in human cells (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

In view of the demonstrable preference for integration of minicircles within LINE-1 elements (Nitz et al. 2004), we postulated that the foreign insertions could be mobilized within the host genome. The functional impact of host genome alterations could include changes in endogenous gene expression as well as the generation of chimeric host-minicircle gene products, either of which may contribute to chronic Chagas disease. Due to the frequency and complexity of the phenomenon, examination of whole organisms is impractical; thus, we have adapted macrophage cell culture for the infection of *T. cruzi* and subsequent characterization of parasite DNA integration, mobilization and phenotypic effect. Here we describe the acquisition and movement of integrated parasite DNA within the human macrophage genome in culture and document a spe-

cific alteration in gene expression over time. The variable factor of time in this process may explain the decades of delay experienced between initial infection and displays of pathogenesis.

#### MATERIALS AND METHODS

**Macrophage and parasite growth and infection** - The human macrophage (ATCC number: CRL-1593.2) line U937 and the *T. cruzi* were grown respectively as described (Nitz et al. 2004). Trypomastigotes were used to infect macrophages in culture at a ratio of 5:1. At this ratio the phagocytes eradicated the infection within two weeks, as demonstrated by co-culture in liver infusion tryptose medium and by infection of weanling mice.

**Authentication of the macrophage U937 line** - Genotypic characterization of the U937 cell was achieved by analyses of autosomal short tandem repeats (STRs) THO.1 and TPOX, and of AMELY (Amelogenin) *loci*. Genetic profiles were determined by simultaneous polymerase chain reaction (PCR) amplification of STRs and sex linked amelogenin, as described in the ATCC Cell Biology Catalog. The amplification products were separated in a 4% polyacrylamide/8 M urea and were analyzed by silver staining according with standard procedures (Murkerjee & Biswas 2005).

**Primers and probes used** - The primer pair sequences used for authentication of the U937 *Homo sapiens* macrophage DNA samples were as follows:

1) TPOX forward primer 5'-ACTGGCACAGAA CAGGCACTTAGG-3', and reverse primer 5'-GGAGGA ACTGGGAACCACACAGGT-3' (Beckmann & Weber 1992).

2) THO1 forward primer 5'-ATTCAAAGGGTA TCTGGGCTCTGG-3', and reverse primer 5'-GTGGG CTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' (Bell et al. 2000).

3) AMELY forward primer 5'-GACCAGAATATGA GACAGGAACTG-3', and reverse primer 5'-TTGCT AAGTTAAGTGATTGTATAAGCA-3' (Lukka et al. 2005).

The *T. cruzi* kDNA specific primer sets Sk35/36 and Sk34/67 (Sturm et al. 1989), *T. cruzi* nuclear DNA specific Tcz1/2 (Moser et al. 1992) and the kCR probe are cited in previous papers (Nitz et al. 2004). The clones representing PCR products were cloned from template DNA amplifications from post-infection parasite-free macrophages.

1) S34 (5'-ACACCAACCCCAATCGAACC)/ S67 (-GGTTTTGGGAGGGGCGTTCA).

2) S35 (5'-ATAATGTACGGG(T/G)GAGATGC)/ S36 (-GGTTCGATTGGGGTTGGTG).

3) Tcz/1 (5'-CGAGTCCTTGCCACAACGGG)/ Tcz2 (-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTC-3').

4) L1 represents a PCR amplification of clone A (GenBank: AF002199) sequence obtained with antisense primer L1 (51-GCCCAATCAGTATGATATTGG) and the primer SP6 included in the TA vector (Invitrogen). This product was cleaved with *HinfI* yielding a 280 bp DNA stretch that was used as probe.

5) kCR (5'-TTTTGGTTTTGGGAGGGGCGTTCAAATTTGGCCCGAAAATCAATGCAATCCCCGATCAATTTGGCCGAAAATGGGGTTGTTTGATGGA GGTGAGGTTGATTGGGGTTGGTGAAG) represents a constant region of *T. cruzi* Berenice kDNA minicircle showing primers S34, and S67 in both extremities, and the nested S35 antisense primer from bp 65 to 46 (underlines). This kCR sequence was a PCR amplification product from *T. cruzi*-infected macrophage DNA template with primers S34/S67, which was cloned in the TA vector. The probes were <sup>32</sup>P-dATP-labeled using the Random Primer DNA Labeling Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Cloning and sequencing PCR amplifications of the p15 cDNA and gene was achieved with kCR probe specific for minicircles and Va 470 bp probe (GenBank accession number AY589192) specific for p15 gene, and primers: *VSP6/5* 5'-AGC GAG GCA GAG GTT TTT GG 3', *VSP4* 5'-GTT GGC CAC AGC AGG CAAG 3', *VSP3r* 5'-TCA CCT TCT GAA TCC ATC CA-3', *VSP2r* 5'-GCC AGC TGA AGG AAC AGA T 3', 5'-AGG TTT GAT ATG GCT CAG 3'. Combinations of primer pairs *VSP6/5* with *VSP1r* and *VSP4* with *VSP3r* and subsequently with *VSP2r* were used for each amplification reaction aiming at reproducible demonstration of kDNA insertion. The relative minicircle and p15 gene primer locations are shown in Fig. 6. Amplification products were cloned into the PGEM-T (Promega) and commercially sequenced.

**Cloning post-infection macrophages** - This investigation was conducted by inoculation of *T. cruzi* into a monolayer of U937 cells growing in 15 ml tissue culture flask. Clones were obtained from a single post-infection macrophage by end point dilution. Adherent human peritoneal macrophages (10<sup>6</sup>) were used as a feeder-layer disseminated into 96-well plates. The plates were kept in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 95% humidity. Each clone derived from *T. cruzi*-infected cell culture was subsequently expanded in 24 wells plate for DNA extraction. The selection of each cell clone presenting the kDNA integration was done by PCR with specific primers set. The screening showed 52 ± 8% kDNA-positive clones in multiple experiments.

**In situ hybridization** - The spreads of U937 macrophages that had undergone *T. cruzi* infections were obtained after 3 h co-culture in the presence of 20 µl of a 1 M colchicine. The interphase and metaphase chromosomes were collected on glass slides and processed for in situ hybridization (Teixeira et al. 1994). After hybridization with L1 probe the metaphase chromosome spreads were soaked in 0.1 M phosphate buffered solution (PBS, pH 7), containing Triton X-100 to 1% (v/v) final concentration; dehybridization was secured by incubation of the metaphase plate glass slide in the PBS-Triton solution for 1 h at 37°C, after which it was washed thrice in PBS and dipped in a mix of 50% formamide with 2X SSC, at 92°C, for 5 min. Probe removal was confirmed by microscopic exam of the glass slide showing absence of previous fluorescent spots using a Zeiss Axiophot microscope with an HBO-50 ultraviolet light source. Then the glass slide was rehybridized with the biotin-labeled kCR probe (10 ng

µl) overnight in a moist chamber at 42°C. After three washes in 50% formamide in 2X SSC, the spreads were flooded with a 1:250 dilution of rabbit anti-biotin antibody, and incubated for 45 min at 37°C. Again, the slides were washed three times and incubated with a 1:40 dilution of fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG. The meta-phase nuclear elements were counterstained with 1% propidium iodide solution and the slides were analyzed under the microscope with ultraviolet light (Teixeira et al. 1994).

**Nucleic acid analyses** - DNA was extracted from the following sources: 1) uninfected macrophage U937 line; 2) archetype Berenice strain *T. cruzi*; 3) *Homo sapiens* blood mononuclear cells; 4) BALB/c mouse spleen cells. The rationale for choice of the restriction enzyme was the pattern of cuts in the archetype (Thertulien et al. 1994) minicircle sequence: *EcoRI*, single cut; *NsiI* single cut in each out of four conserved regions of a minicircle; *BamHI* and *XhoI* producing digestion at all. PCR was conducted with specific primers for parasite kDNA and nuclear DNA, and for host DNA sequences defined in the text. The protocols for RT-PCR used in the differential display of mRNA used random primers with 1 µg of template RNA (Liang & Pardee 1992).

RNA was purified using TriZOL reagent (Invitrogen), fractionated in agarose gels, and blotted onto charged nylon membranes (ClonTech). Hybridizations were performed as recommended by the manufacturer. The membrane was washed once for 5 min with 1X SSC and 0.1% SDS, twice for 30 min each with 0.2X SSC and 0.1% SDS, and autoradiographed for variable periods of time. cDNA fragments from recombinant plasmid clones were used as probes on RNA blots.

**Detection and cloning of differentially expressed transcripts** - Differential display of mRNA from kDNA-positive and from kDNA-free macrophages was used (Liang & Pardee 1992). DNA-free total RNA was subjected to RT-PCR by combining one- and two-bases anchored primers with random primer sets HT11C/HAP57 and HT11C/HAP60 (GenHunter Corporation). The candidate cDNA bands, identified in triplicate reactions, were eluted from the gels, and their 3' fragments were reamplified and cloned. The differential expression of each transcript was analyzed by hybridization to total cell RNA/or poly A selected RNA rapid amplification of 5' cDNA (5' RACE, Invitrogen) was used to obtain the 5' end of the cDNA.

## RESULTS

**Horizontal transfer of minicircles via living infection in culture** - In order to better follow the integration of minicircles in the human genome and to track subsequent changes in location over time as postulated due to their association with mobile genetic elements, a protocol using cultured macrophages was implemented. Live *T. cruzi* cells were used to infect an immortalized macrophage population, followed by recloning and extended maintenance of the parasite-free lines in cell culture.

The DNA from U937 macrophage cultures infected with *T. cruzi* was subjected to Southern hybridizations with a homologous minicircle conserved region (kCR) probe.

The DNA from the *T. cruzi*-infected cells showed a distinct band pattern that was not present in the *T. cruzi* DNA tested with the kCR probe, thus indicating that the minicircle DNA is in a different configuration in the infected macrophage DNA sample compared to DNA from the kinetoplast. The *T. cruzi*-infected macrophage samples taken on the 7th post-infection day showed different band patterns; in addition to a 360-bp band representing the kinetoplast, larger size bands of 1.2, 1.8, and 2.2 kb were formed with the macrophages DNA, which were not present in the parasite DNA. At the 30th day post-infection the lower band representing the *T. cruzi* kDNA was absent in the host macrophages, demonstrating that living parasites had been eradicated (Fig. 1A). Control experiments showed no hybridization with the protozoan nuclear DNA probe or with a cloned maxicircle gene DNA probe (a gift from David Campbell, UCLA). These results were confirmed by PCR amplification of minicircle sequences present in DNA from *T. cruzi* alone and from macrophages infected with *T. cruzi* using kDNA primer set S34/67. Furthermore, absence of amplification of the 0.2-kb band from the *T. cruzi* nuclear DNA primer set Tcz1/2 (Moser et al. 1992), which is a highly repetitive sequence comprising 9% of total nuclear DNA, and, also, absence of a 0.36-kb band in the Southern blot, both with DNA

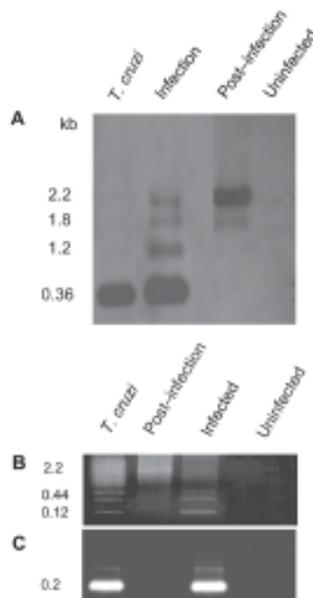


Fig. 1: integration of *Trypanosoma cruzi* minicircles into the genome of macrophages as a consequence of infection. A: Southern hybridization of *NruI* digests of 7-day infection macrophages and of 30-day (post-infection) macrophages with kCR probe on blots of 0.8% agarose gels; B: ethidium bromide staining of minicircle PCR amplification products using primers S34/67. Profiles formed with *T. cruzi* and with 7-day infection macrophage are altered in post-infection macrophages by the absence of 0.12 kb band and its catamers; C: ethidium bromide staining of nDNA PCR amplification products using Tcz1/2. The absence of the 0.36 kb band in the Southern blot and of the 0.2 kb PCR products in the 30th day post-infection macrophage DNA indicates that the *T. cruzi* infection has been eradicated, leaving the integrated minicircles in the host cell genome.

collected on the 30th day post-infection macrophages appeared to correlate with persisting kDNA integration in host cells that eradicated the living infection (Fig. 1B, C).

The absence of the 0.2-kb minicircle-derived band in the Southern blot and the absence of the 0.2-kb parasite nuclear DNA PCR products in the 30th day post-infection macrophage DNA indicate that the *T. cruzi* infection has been eradicated, leaving minicircle sequences with altered mobilities integrated in the host cell genome. Transfer of minicircle sequences from *T. cruzi* into the macrophage genome occurred as a natural consequence of infection.

*Co-localizing minicircle integration with LINE-1 in whole chromosomes* - In order to confirm integration of the kDNA insertion in LINE-1 elements, *in situ* hybridization was carried out utilizing L1 and kCR probes and metaphase plates of macrophages that were infected with *T. cruzi*.

kDNA co-localized in LINE elements of two separate chromosomes, as both probes hybridize to the same region (Fig. 2A, B). Control experiments showed that neither the kCR nor the L1 probes hybridized, respectively, with human nuclear DNA or with *T. cruzi* kDNA in metaphase plates of non-infected macrophage chromosomes (data not shown). Thus, the integration event was maintained within this cell line. It must be noted that the LINE-1 probe would be predicted by interact with thousands of sites within the genome, but that in control cell lines no signal is seen (data not shown). This is a notable feature of LINES, with interspersed direct and inverse SINE repeats generating DNA condensation normally making them inaccessible to probes (Cassavant et al. 2000). In the case of the G10 macrophage cell line, the presence of the kDNA integration prevented this condensation, allowing the detection of a single LINE among the multitude.

The co-localization of minicircle and LINE-1 element sequences provides further evidence for the reported association (Nitz et al. 2004), and portends the coming observations of minicircle mobility as a consequence of that association.

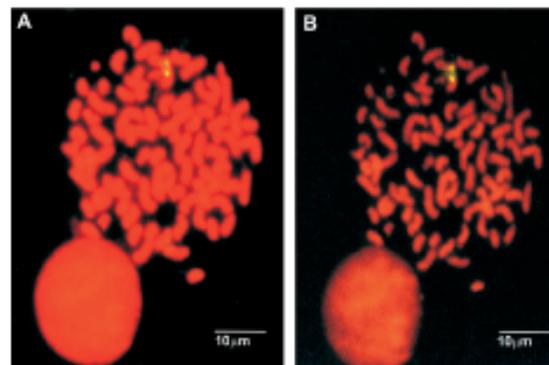


Fig. 2: co-localizing *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences into chromosomes of metaphase plate post-infection macrophage. A: LINE-1 showing fluorescent lights up in two metaphase chromosomes probed with a specific L1 probe (see methods); B: co-localizing kDNA minicircle sequences within LINE-1 with kDNA specific kCR probe.

*Amplification of integrated sequences captures associated host LINE-1 elements* - Macrophage cultures undergoing continuous replication for 3 months after the living *T. cruzi* infection was eradicated were used to obtain DNA at the integration junctions. These samples represented our starting point for the characterization of minicircle mobilization within the host macrophage genome. We sought to characterize the integrations using direct blotting techniques in combination with PCR to define the sites of integration.

PCR amplification products were generated using this post-infection macrophage DNA as template with the kDNA primer set S35/36 (Sturm et al. 1989). No amplification was obtained from template DNA employing parasite-specific nuclear DNA primer pairs, corresponding to ribosomal RNA and a *T. cruzi* spliced leader RNA genes (data not shown). Preliminary attempts to clone a restriction fragment representing 2.2-kb kDNA integration into post-infection macrophages were unsuccessful; cloning in competent cells yielded truncated sequences, usually smaller than 0.5 kb, representing rearranged fragments of kDNA and no flank host DNA. The difficulties observed with TA-vector transformed SURE cells could not be resolved in any other recombinase-free *E. coli* strains tested. The sequencing results from some DH5 $\alpha$  rearranged clones frequently showed the S36 primer in direct and inverse repeats, suggesting that linearized minicircle insertions in the macrophage genome occurred in a direct

repeat or inverse manner, and identifying associated SINEs with frequently rearranged highly-interspersed repeat sequences, thus forming palindromes that creates the substrate for deletion and recombination by the host cell (data not shown). These results and the experience of others (Slightom et al. 1992, Gilbert et al. 2002) were used to design a PCR approach to determine the region(s) of minicircle integration.

We succeeded in capturing the initial integration events using PCR amplification by employing only one specific primer, S36 against a motif in the minicircle conserved region, for amplification. Amplification products were cloned into the PCRII vector and screened with *T. cruzi* kDNA probe, resulting in the sequence of five representative clones (A to E), ranging from 527 to 700 bp. These samples presented the LINE-1 ORF2 segment between outer kDNA regions not showing kink repeat motifs that prevent cloning and sequencing. Each clone contained minicircle and LINE-1 DNA sequences (GenBank numbers AF002199 to AF002203) loaded with SINEs (HERV, MIRs, and Alu-like), suggesting that the minicircle insertions had occurred within these highly repetitive elements. Fig. 3 illustrates the integration of kDNA minicircle sequences in LINE-1 AC134888.2. In four clones (A, C, D, and E) minicircle constant and variable regions were flanked by mammalian Alu sequences followed by LINE-1 DNA. These clones showed a homologous segment to human chromosomes Y, 4, and 13; clones A, C, and E

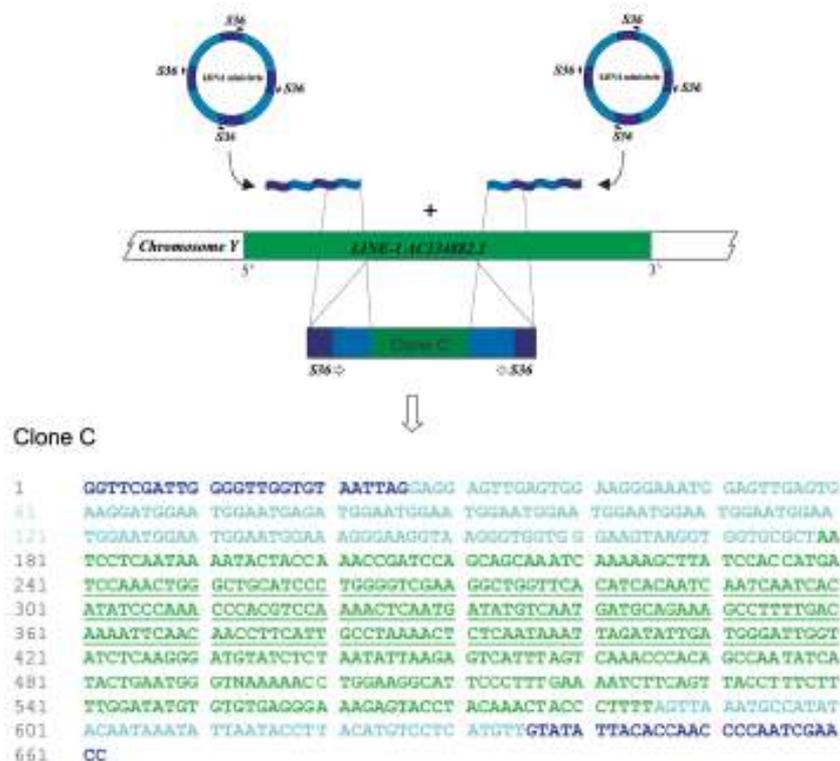


Fig. 3: schematic representation of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences integration in human LINE-1 retrotransposon. Truncated fragments of kDNA minicircles found in the LINE-1 copy at chromosome Y: clone C showing conserved region primer S36 (dark blue) at both ends followed by minicircle variable regions (light blue) and the LINE-1 sequence (green).

showed the S36 primer followed by the sequence AATTAG at the end of the constant region. The B clone contained minicircle sequence at only one end showing the S36 primer followed by the sequence AATATATG. In clones A, C, D, and E the minicircle conserved regions were in tandem inverse orientation consistent with two insertions in opposite orientations. Clone B appears to represent priming of S36 from *T. cruzi*-infected macrophage DNA and may represent outer junction sequences. BLASTn analyses showed LINE-1 in each case, showing average identity of 93% (clones A, D, and E, respectively GBAC147649.2, AC069302.4 and AC096740.3), and of 92% (clones B and C, respectively AL160255.14 and AC134882.2); clones A and C targeted chromosome Y; whereas clones D and E derived from chromosome 4 and clone B inserted in a chromosome 13 LINE-1 copy. BLASTn extended results also revealed that clones A and E include regions with 88% identity with satellite MIR II, and CpG putative island in clone A with 95% identity. On 3 occasions (clones A, C, and D) the juxtaposition of kDNA with LINE-1 sequences were truncated by microsatellite DNA with evident microhomology, suggesting homologous recombination mediated minicircle insertions in LINE-1 within the human host cells.

A natural extension of this analysis is the search for potential chimeric proteins or sites of recombination associated with the integration events. BLASTx searches detected ORF-2 segments in clones A, B, and E, showing similarity with viral endonuclease: human reverse transcriptase (hRT). BLASTx also revealed homologies with ubiquitin like protein (clone B), and with hypothetical chimera human and *T. cruzi* proteins (clones A, C, D, and E). Thus, kDNA insertions were found in five out of five instances within a transposon of the LINE-1 Ta family, revealing a hot spot for minicircle integration.

**Mobilization of the minicircle integration** - To document any movement of the integrated minicircle we cloned post-infection macrophages and maintained them in active culture for an extended period of time. Genomic DNA from these lines was analyzed for shifts in minicircle distribution by Southern hybridization. Changes in minicircle distribution can then be localized for additional effects.

Macrophage clonal line G10 showed positive hybridization with the kCR probe and was kept in continuous culture for three years with an average doubling time of  $16 \pm 2$  h. G10 genomic DNA digested with *EcoRI* or with *XhoI* displayed distinct band patterns at three years post-cloning versus three months (Fig. 4), with pattern alterations consistent with minicircle movement. The 6.4-kb band indicated that the integrated kDNA was mobilized from one site to another with a loss of repetitive elements rather than being dispersed throughout the G10 genome.

This result indicates that our hypothesis was correct, in that integrated foreign sequences can be mobilized within the host genome. The foundation of this prediction is that the minicircle sequence was relocated by virtue of association with active retrotransposons, however direct recombination within the genome could also explain the observation.

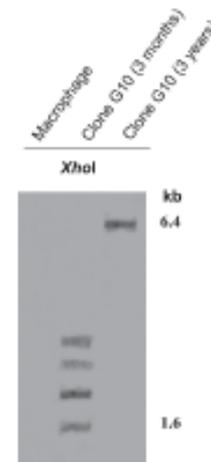


Fig. 4: alterations in localization associated with mobilization of a chimeric minicircle-LINE-1 sequence. *XhoI* digestions of genomic DNA from macrophages were separated in 0.8% agarose gels blotted and kCR probed. Note marked variations in profiles of kDNA positive bands from G10 DNA at three months and three years post-infection.

**Alteration detected in three-year-old culture** - Minicircle transposition within the macrophage genome prompted us to investigate the possibility of genetic changes in the macrophage clone G10. Functional consequences of minicircle integration will be manifest in detectable phenotypes.

A profile of mRNAs from clonal lines maintained for 3 years was compared with that of the kDNA-free control line using differential display (Liang & Pardee 1992). An endogenous mRNA was under-expressed in 3-year-old G10 (Fig. 5A), and identified subsequently from the uninfected sample as a conserved transcript showing identity with *Mus musculus* Sub1 mRNA (GenBank: NM011294) and with *H. sapiens* p15 cDNA encoding an activated RNA polymerase II transcription factor at chromosome locus 5p13.3 (GenBank: BC022339.1). Note that the stretch of LINE-1 mobilizing kDNA inserted in the p15 gene showed identity with *H. sapiens*, and that samples of U-937 macrophage line used in this study were re-authenticated by molecular tests (Lukka et al. 2005, Mukherjee & Biswas 2005); mouse DNA template was used as a negative control in authentication (data not shown). Hybridization of RNA from three-year-old G10 culture with a p15-specific probe confirmed its absence as a stable mRNA species (Fig. 5B), a transcriptional alteration exclusive to the three-year-old G10 cell line. Control hybridization with actin probe confirmed equivalent loading of RNA (Fig. 5C). Southern hybridization of G10 DNA with the p15 probe confirmed that the p15 gene was modified at three years post-infection versus three months post-infection and control DNA (Fig. 5D).

The minicircle movement correlated with a reduction in expression of an endogenous host gene in the clonal cell line. The identification of the gene allowed demon-

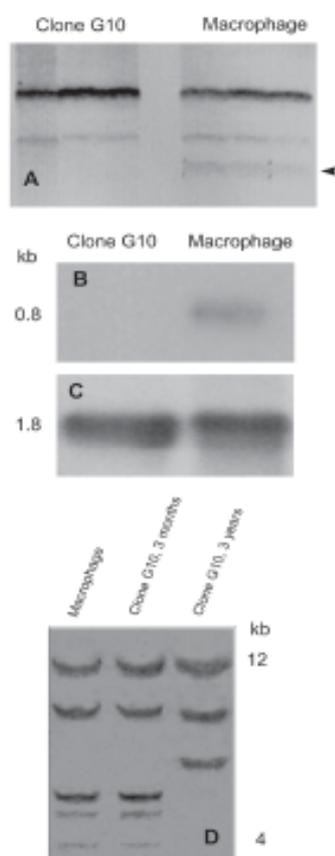


Fig. 5: transcript modification based on minicircle mobilization. A: differential display and mRNA analysis in G10, three years post-infection. Lack of a band is indicated by arrow; B: RNA hybridization of a 0.8-kb mRNA species with p15 cDNA probe; C: the 1.8-kb band represents the  $\beta$ -actin positive control; D: Southern hybridization of *Bam*HI digestion of DNA from control macrophages and the G10 with the p15 cDNA probe in the blot of a 0.8% agarose gel. Notice alteration of band profiles in the 3 years post-infection macrophage sample.

stration that the change can be seen in the DNA profile by Southern analysis; the three-month-sample of the G10 clonal line is identical to the uninfected macrophage profile, implying that the starting sample was unaffected for the expression of this gene. Our next goal was to look for an association of the affected product's gene with minicircle-derived sequence.

**Mutagenesis of a host gene by minicircle transposition** - The straightforward explanation for the p15 effect is a direct interaction with the mobilized minicircle fragment, whereby the foreign sequence has acted as a mutagen or has disrupted the cognate p15 promoter. The rearrangement of the p15 locus and loss of p15 transcript could be unrelated to the movement of minicircle sequence, caused by independent recombination events, secondary effects of the minicircle relocation, or senescence of the cell line.

The genetic link between p15 expression and minicircle integration was determined using PCR with various combinations of minicircle- and p15-specific primers (Fig. 6A), exposing an insertion of LINE-1 and minicircle sequence in chromosome locus 5p13.3 (GenBank accession numbers AY584192 and AY584193), 262-bp downstream from the p15 initiation codon. The chimeric DNA insertion in the G10 macrophage line (Fig. 6A, B) was cloned and found to contain two truncated minicircle conserved and variable regions linked to an active host LINE-1. Databank analysis revealed the truncated LINE-1 to show 99% identity (expect = 0.0) to human chromosome 4 locus 4g21 (GenBank: AC004061.1). However, a limited search showed that the 301–855-bp stretch has 92% identity (expect = 0.0) to the human  $\beta$ -globin frame locus at chromosome 11 (GI: 28380636; NG: 000007.3), indicative of other sequences acquired by the element while in transit. The presence of a premature translation termination codon in the chimeric ORF at an 132 could be the cause of transcript destabilization (Fukuda et al. 2003).

The footprints of the minicircle's travels through the host genome were captured by the associated LINE-1 characteristics. The recovered sequences indicate that the original minicircle integration may have relocated to the p15 location on chromosome 5 by hitchhiking along with a LINE-1 element originating on chromosome 4. The documentation of this event serves as an indicator of what is happening on the broader scales of decades of incubation and the array of cell types present in the host organism.

## DISCUSSION

This work documents a unique but representative genome modification resulting from *T. cruzi* minicircle integration and mobilization of the integrated DNA by the action of an active LINE-1 retrotransposon in a cultured line of human macrophage. In order to confirm the kDNA integration into LINE-1 elements probes for minicircle and LINE-1 sequences in host cell genomes were used. The kDNA insertion in LINE-1 elements was co-localized in the metaphase plate of a post-infection macrophage by *in situ* hybridization. A minicircle fragment linked to the truncated LINE-1 element's most 3'-end poly-A tail inserted in the open reading frame of the p15 gene on chromosome 5, locus 5p13.3; a stretch of sequence homology with a retrotransposon on chromosome 4 indicated the path of this minicircle-loaded element. The presence of a specific  $\beta$ -globin cluster signature within the truncated LINE-1 suggests that the kDNA could have mobilized via chromosome 11 to chromosome 5. Genomic DNA from several macrophage lines was assayed by Southern hybridization, revealing multiple instances of kDNA integration. Minicircle sequence elements were found in five out of five occasions within Alu-like SINE-associated LINE-1 elements.

The LINE-1 transposable elements with high-interspersed repeat sequences were rearranged frequently in the macrophage chromosome, showing local polymorphisms. Such kinked DNA regions have prevented the extension of sequencing towards both arms in order to study nearby genome organization, a common difficulty

840 Mobilization of *T. cruzi* kDNA-mutation • Augusto Simões-Barbosa et al.

(Babushok et al. 2006). Similar unique features have been associated with genome instability and non-clonability (Razin et al. 2001, Venter et al. 2001, Symer et al. 2002, Pavlicek et al. 2002b). These issues were compounded by the integrated minicircles, whose redundant conserved regions are interspersed by variable regions showing Alu-like and microsatellite repeats.

The p15 gene derived from the human macrophage cell line yielded 99% identity (expect =  $2e-143$ ) with *M. musculus* and 85% identity (expect =  $5e-46$ ) with *H. sapiens* at the 5' end, and, respectively 98% and 94% identities at the 3' end (GenBank: BC010967.1 and U12979.1). The LINE-1 mobilizing the minicircle sequence was 99% homologous (expect = 0.0) with *H.*

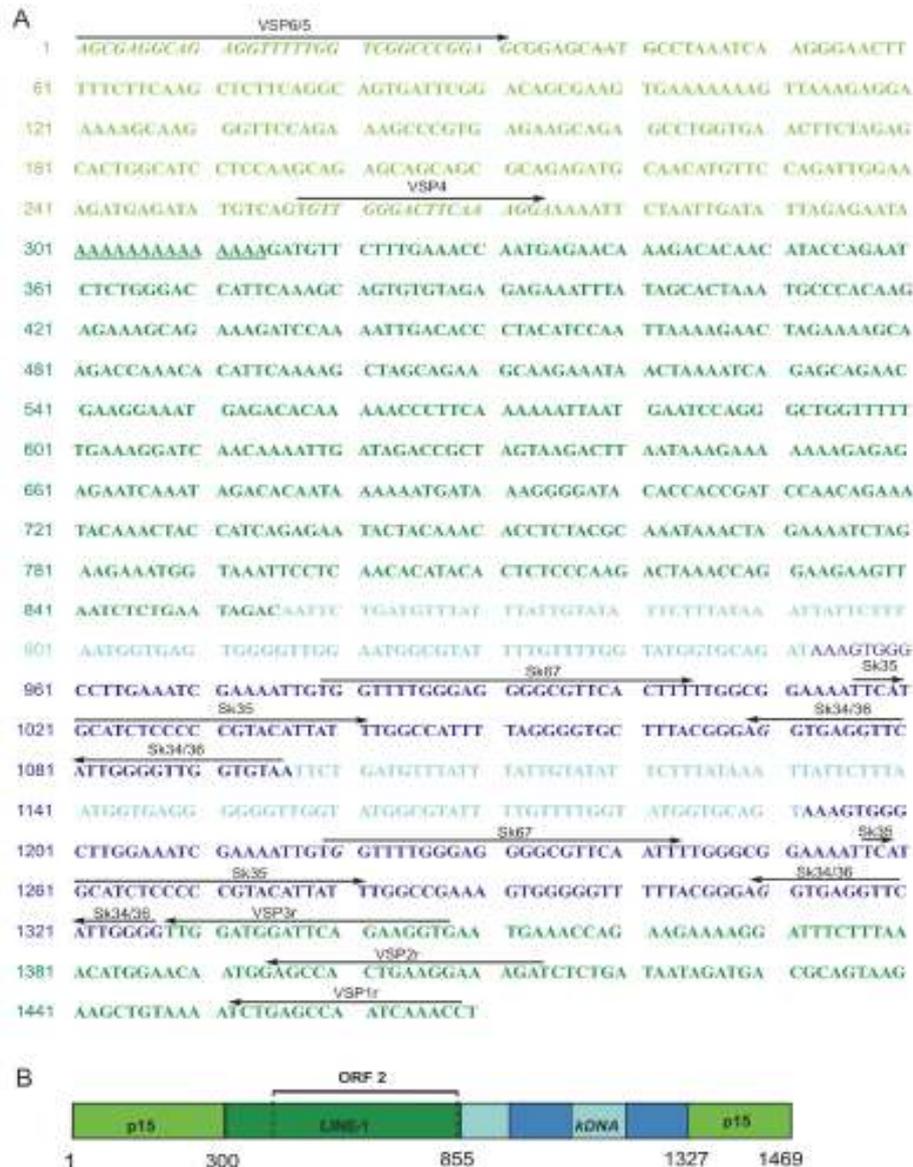


Fig. 6: modification of the p15 gene by the insertion of minicircle kDNA linked to an active LINE-1 at chromosome 5p13.3. A: rupture of the p15 ORF by the insertion of truncated LINE-1 mobilizing a minicircle fragment. Sequence in light green is from the p15 gene, dark green from LINE-1; light blue shows the minicircle variable regions, and dark blue the minicircle conserved region. The p15 ORF (initiation codon bp 39-41) is interrupted at nt 300 by the LINE poly-A tail to bp 855, and extends to the minicircle bp 1327. The p15 gene continues from 1328 bp towards its 3' end. The primers used are indicated by arrows; B: schematic representation of the chimeric minicircle-LINE-1 showing insertion in the ORF of the p15 gene, and ORF2 similar to hRT from nt 410 to 851.

*sapiens*. SNPs and gaps accounting for polymorphisms present in the human macrophage p15 sequences could explain the differences in identity levels, hence the variance of the cloned U937 DNA. Furthermore, the p15 gene copy ruptured by truncated minicircle and LINE-1 could be amplified from G10 DNA template with other gene-specific primers designed from different regions at either end.

It is reasonable to expect that retrotransposons have been subjected randomly to DNA replication associated errors over time, thus accumulating SNPs and other mutations resulting from deletions and rearrangements, particularly in direct and inverted repeat regions at the 3' end of LINEs. In addition, the phenomenon of horizontal gene transfer (HGT) resulting from integration of minicircle sequences into the host cell genome only adds to the DNA instability at their insertion site. The finding of several SNPs and a three base pair deletion in the host cell sequence flanking the under-expressed p15 gene may explain why it shows a higher similarity to *M. musculus* than to *H. sapiens*. This type of sequence variation occurs in instances of HGT and usually requires the recalibration of the molecular clock (Simonson et al. 2005).

Polymorphism at sites of kDNA integration in the host cell has been documented with the identification of several dozen sequences originating from our studies and accessible through GenBank. The human genome is filled (Human Genome Sequencing Consortium 2001) with repeat sequences, including interspersed repeats derived from transposable elements (LINEs carrying SINEs on their backs), and long genomic regions that duplicate in tandem, palindromic or dispersed fashion. These duplicated segments create deletions during recombination (International Human Genome Sequence Consortium 2001). New approaches such as primer walking tail-PCR (Babushok et al. 2006) along with classic techniques such as genomic libraries in cosmid and lambda vectors or even BAC libraries will be pursued to circumvent the recombination problems inherent in characterization of the minicircle integration events; screening host DNA with minicircle probes will select the fragments carrying the chimeric hallmarks. These strategies should circumvent the current problems with PCR amplification and cloning.

Understanding of Chagas disease has been approached through correlations of phylogenetics and pathology (Campbell et al. 2004). Nuclear markers define 6 interrelated groups or discrete typing units (Westenberger et al. 2005), subdividing the 2 major groups of *T. cruzi* (Anonymous 1999); maxicircle markers identify 3 clades (Machado & Ayala 2001). Minicircles, a fluid population due to the functional flexibility of guide RNAs, have yet to reveal useful markers for epidemiology (Junqueira et al. 2005). The interplay between pathogen genotype and the minicircle integration that is a component of *T. cruzi* infection may reveal itself in the frequency of the integration event for particular subgroups or parasite populations. The variables of invasion, establishment within the host cell, and stability will all factor into the success of an individual parasite genotype. The relative composition of the heterogeneous minicircle popula-

tion will also play a critical role in determining the mutagenic capacity of a given parasite.

The acquisition of foreign DNA and its persistence in progeny is a major finding that may result in gene loss or differential regulation. This phenomenon offers a novel strategy for mutagenesis: Ubiquitous host LINE-1 elements provide the basic retrotransposon machinery, while kDNA serves as both a tag and a secondary mutagen, thus defining the birth of another gene transfer tool that is both interspecific (parasite to host) and intraspecific (within the genome). In the case described by macrophage line G10, the p15 transcript appeared to be destabilized; the inhibition of transcriptional elongation by LINE-1 might profoundly affect expression of endogenous human genes (Kadlec et al. 2004, Han et al. 2005). However, an alternative outcome of integration and mobilization is the generation of a novel chimeric protein (Nitz et al. 2004, Inácio et al. 2004).

Similar phenotypic changes resulting from kDNA-driven mutagenesis may trigger the autoimmune rejection of parasite-free target host cells that are the pathologic substrate of the lesions present in the heart and the digestive system of patients that die of Chagas disease (Teixeira et al. 2006). These symptoms present 20 to 30 years after the initial infection; this delay may reflect the time required to accumulation of mutagenic transposition and following autoimmune response. Considering the complexity of the entire host environment, and the approximately 61 active LINE-1 elements in the average human host (International Human Genome Sequencing Consortium 2001), multiple LINE-1/kDNA insertions could accumulate to culminate in the autoimmunity characteristic of Chagas patients in the absence of persistent parasitemia. A study has been initiated for the detection of genome modifications resulting from kDNA integration into LINE-1 that correlate with various manifestations of Chagas disease.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To Jiri Hejnar (the Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic) and David Campbell (UCLA) for helpful discussions and comments on the manuscript.

#### REFERENCES

- Anonymous 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 429-432.
- Avila HA, Simpson L 1995. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *RNA* 1: 939-947.
- Babushok DV, Ostertag EM, Courtney CE, Choi JM, Kazanian Jr HH 2006. L1 integration in a transgenic mouse model. *Genome Res* 16: 240-250.
- Beckmann JS, Webber JL 1992. Survey of human and rat microrssatellites. *Genomics* 12: 627-631.
- Bell B, Nieves P, Abecia E, Martinez-Jarreta B, Hinojal R, Martinez-Cordero A 2000. Population genetics of the STR loci HUMCSFIPO, HUMF13A01, HUMFES/FPS and D12391 in Asturias (Northern Spain). *Forensic Sci Internl* 113: 21-23.

842 Mobilization of *T. cruzi* kDNA-mutation • Augusto Simões-Barbosa et al.

- Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2: 173-183.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4: 549-562.
- Cassavant NC, Scott L, Cantrell MA, Wiggins LE, Baker RJ, Wichman HA 2000. The end of the LINE?: Lack of recent L1 activity in a group of South American rodents. *Genetics* 154: 1809-1817.
- Feng Q, Moran J, Kazazian H, Boeke JD 1996. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87: 905-916.
- Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K 2003. Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 278: 14827-14831.
- Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV 2002. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* 110: 315-325.
- Han JS, Szak ST, Boeke JD 2005. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 429: 270-274.
- Inácio A, Silva AL, Pinto J, Ji Xx, Morgado A, Almeida F, Faustino P, Lavinha J, Liebhauer SA, Romão L 2004. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* 279: 32170-32180.
- International Human Genome Sequencing Consortium 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-927.
- Junqueira AC, Degraive W, Brandão A 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol* 21: 270-272.
- Kadlec J, Izaurralde E, Cusack S 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat Struct Mol Biol* 11: 330-337.
- Kazazian Jr HH 2000. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science* 289: 1152-1156.
- Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira ARL 2000. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 63: 111-118.
- Liang P, Pardee AB 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21: 363-369.
- Lukes J, Guilbride DL, Votycka J, Zikova A, Benne R, Englund PT 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* 1: 495-502.
- Lukka M, Tasa G, Ellonen P, Moilanen K, Vassiljev V, Ulmanen I 2005. Triallelic patterns in STR loci used for paternity analysis: Evidence for a duplication in chromosome 2 containing the TPOX STR locus. *Forensic Sci Internl* (Epub ahead of print).
- Machado CA, Ayala FJ 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7396-7401.
- Mareus E 2005. Retraction controversy. *Cell* 123: 173-175.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482.
- Mukherjee KK, Biswas R 2005. Short tandem repeat (STRs) and sex specific Amelogenin analysis of blood samples from neurosurgical female transfused patients. *J Clin Forensic Med* 12: 10-13.
- Nitz N, Gomes C, Rosa AC, D'Souza-Ault MR, Moreno F, Lauria-Pires L, Nascimento RJ, Teixeira ARL 2004. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas Disease. *Cell* 118: 175-186.
- Ostertag EM, Kazazian HH Jr 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Ann Rev Genet* 35: 501-508.
- Pavlicek A, Paces J, Elleder D, Hejnar J 2002a. Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINES: Their integration, stability, and distribution. *Genome Res* 12: 391-399.
- Pavlicek A, Paces J, Zlka R, Hejnar J 2002b. Length distribution of long interspersed nuclear elements (LINEs) and processed pseudogenes of human endogenous retroviruses: implications for retrotransposition and pseudogene detection. *Gene* 300: 189-194.
- Razin SV, Ioudinkova ES, Trifonov ED, Scherrer K 2001. Non-clonability correlates with genomic instability: A case study of a unique DNA region. *J Mol Biol* 307: 481-486.
- Simonson AB, Servin JA, Skophammer RG, Herbold CW, Rivera MC, Lake JA 2005. Decoding the genomic tree of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6608-6613.
- Simpson AGB, Gill EE, Callahan HA, Litaker RW, Roger AJ 2004. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist* 155: 407-422.
- Slightom JR, Boek JH, Tagle DA, Gumucio DL, Goodman M, Stojanovic N, Jackson J, Miller W, Hardison R 1997. The complete sequence of the galago and rabbit  $\beta$ -globin locus control regions: Extended sequence and functional conservation outside the cores of DNase hypersensitive sites. *Genomics* 39: 90-94.
- Smit AFA, Toth G, Riggs AD, Jurka J 1995. Ancestral mammalian wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J Mol Biol* 246: 401-417.
- Sturm NR, Degraive W, Morel C, Simpson L 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 33: 205-214.
- Symer DE, Connely C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, Boeke JD 2002. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* 110: 327-338.

- Thertulien R, Simpson-Hidaris PG, Hidaris CG 1994. Intracellular localization of a *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle transcript using RNA:RNA in situ hybridization. *J Eukaryotic Microbiol* 41: 402-407.
- Teixeira ARL, Argañaraz ER, Freitas Jr LH, Lacava ZGM, Santana JM, Luna H 1994. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mut Res* 305: 197-209.
- Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 463-491.
- Venter CG, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.
- WHO-World Health Organization 1996. *The Global Burden of Disease*, In C Murray, A Lopez (eds), Geneva, Switzerland. Vol. I, chapter 5, p. 245-293.
- WHO-World Health Organization 2002. Control of Chagas' disease: second report of a WHO Expert Committee. *Wld Hlth Org Tech Rep Ser* 905: 1-109.