

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

**Transferência horizontal de seqüências de minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e
herança vertical das mutações**

Aluna: Mariana Machado Hecht

Orientador: Prof. Dr. Antônio Teixeira

Co-Orientadora: Dr^a. Nadjar Nitz

Brasília – DF

2008

Mariana Machado Hecht

**Transferência horizontal de seqüências de minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e
herança vertical das mutações**

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

Brasília, 2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq/ CAPES

Dedicatória

"Não devemos ter medo dos conflitos. Até os planetas se chocam, e do caos nascem as estrelas. "

Charles Chaplin

Ao Zé, meu amado esposo, por todo carinho e atenção que dedica a mim.
Diariamente, você torna minha vida mais feliz!

Aos meus queridos pais, Claudio e Maria Helena, pelo amor de toda vida!

Às minhas irmãs adoradas, Renata e Isabel, pela convivência de sempre!

A toda minha família – avós, tios e primos, pela união e amizade que sempre fizeram parte de nossas vidas!

Agradecimentos

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez"

Jean Cocteau

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Teixeira, pela dedicação, estímulo e apoio, indispensáveis para realização deste trabalho.

À Dr^a Nadjar Nitz, pela amizade e pelos ensinamentos que foram fundamentais para meu desenvolvimento como pesquisadora.

À amiga Ana Carolina, por dividir todas as experiências vividas neste laboratório, dando grande apoio nos momentos difíceis.

À querida Perla Cristina, que sempre trouxe divertimento para a bancada.

Aos colegas e, especialmente, aos amigos feitos no LMPDC: Clever, Flávias, Teresa, David, Danielle, Izabela, Sebastien, Meire, Adriana, Malu, Marol, Flávio, Ana de Cássia, Roze, Gloria, Jaime, Silene, Carla, Rubens.

Aos estagiários Beto, Bruno, Ronaldo e Liana, pela ajuda nos experimentos.

Aos funcionários do LMPC: Miguel, Márcia, Seu Geraldo e Eliete.

Aos familiares e amigos, por todo carinho e alegrias compartilhados até aqui.

Índice

I. INTRODUÇÃO	8
1. A DOENÇA DE CHAGAS	8
1.1. VIAS DE TRANSMISSÃO	9
1.2. DIAGNÓSTICO	11
1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	13
1.4. O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	14
1.5. O DNA MITOCONDRIAL (kDNA)	16
2. DOENÇA DE CHAGAS E AUTO-IMUNIDADE	18
2.1. A AUTO-IMUNIDADE E O LMPDC	21
3. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	26
3.1. DESCRIÇÃO DOS RETROTRANSPÓSONS	28
3.2. IMPACTOS DA RETROTRANSPosição	30
3.2.1. Tamanho e Variabilidade do genoma	30
3.2.2. <i>Exon shuffling</i> e evolução de proteínas	31
3.2.3. Doenças causadas por elementos transponíveis	32
4. SUSCETIBILIDADE AO DNA EXÓGENO	33
4.1. DNA EXÓGENO E EFEITOS NA POPULAÇÃO	36
II. OBJETIVOS	38
III. MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. AMOSTRAGEM	39
2. EXTRAÇÃO DE DNA	40
2.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS	40
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	41
2.3. EXTRAÇÃO DE kDNA	41
3. IMUNODIAGNÓSTICO	42
3.1. ELISA (<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	43
3.2. HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA	44
3.3. IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA	45
4. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)	46
5. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES FLANQUEADORAS DO kDNA DE <i>T. CRUZI</i> INTEGRADO NO GENOMA HUMANO	48
6. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO DNA GENÔMICO	52
7. CLONAGEM, TRANSFORMAÇÃO EM <i>E. COLI</i> COMPETENTE E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	53
8. <i>SOUTHERN BLOT</i>	54
8.1. <i>SOUTHERN BLOT</i> DOS PRODUTOS DE PCR	54
8.2. <i>SOUTHERN BLOT</i> GENÔMICO	54
8.3. TRANSFERÊNCIA DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS TRANSFORMANTES PARA MEMBRANA DE NYLON	55
9. MARCAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS	56
9.1. PURIFICAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS	56
10. HIBRIDIZAÇÃO	58
11. SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES E ANÁLISE EM BANCO DE DADOS	58

IV. RESULTADOS	60
1. IMUNODIAGNÓSTICO	60
2. DIAGNÓSTICO POR PCR	61
3. ESTUDO DAS FAMÍLIAS	64
4. ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DE MINICÍRCULOS DE kDNA NO GENOMA HUMANO	70
4.1 pSTAIL PCR (<i>PRIMER SPECIFIC THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED</i> – PCR)	71
4.1.1 Características das seqüências flanqueadoras do hospedeiro humano	77
4.1.2 Estrutura das seqüências de minicírculos de kDNA consensos I e II	84
4.2 <i>SOUTHERN BLOT</i> GENÔMICO	88
5. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE POSSÍVEIS NOVAS FASES DE LEITURA ABERTA	90
V. DISCUSSÃO	94
1. ASPECTOS GERAIS	94
2. EMPREGO DE <i>pSTAIL</i> PCR PARA IDENTIFICAR EVENTOS DE TGH E TGV NO GENOMA DE CHAGÁSICOS E SEUS DESCENDENTES	95
3. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DO kDNA DE <i>T. CRUZI</i> PARA O GENOMA HUMANO	96
4. SÍTIOS DE INTEGRAÇÃO DO kDNA NO GENOMA HUMANO	99
4.1 ASSOCIAÇÃO DO kDNA A GENES	102
5. TRANSFERÊNCIA VERTICAL DE MINICÍRCULOS DE kDNA DE <i>T. CRUZI</i>	103
6. MODELO DE INTEGRAÇÃO DOS MINICÍRCULOS DE kDNA DE <i>T. CRUZI</i> NO GENOMA HUMANO	105
7. MUTAÇÃO, RECOMBINAÇÃO, DERIVA GENÉTICA, CRESCIMENTO E MODIFICAÇÃO DO GENOMA: A EVOLUÇÃO DO GENOMA DE CHAGÁSICOS E SEUS DESCENDENTES.	106
8. PERSPECTIVAS	109
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
VII. RESUMO	134
VIII. SUMMARY	136
ANEXO I	138
ANEXO II	139
ANEXO III	149
ANEXO IV	155

I. Introdução

1. A Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, descoberta por Carlos Chagas (Chagas, 1909), é exemplo de trabalho original e de extraordinária inspiração humana. Chagas descreveu com riqueza de detalhes aspectos do agente etiológico e dos hospedeiros invertebrados e vertebrados, as diversas formas clínicas da doença humana e, ainda, a epizootia resultante da infecção de mamíferos pelo *Trypanosoma cruzi*.

Os primórdios dessa cadeia de transmissão do protozoário ainda são pouco conhecidos, talvez pelo difícil acesso ao que teria ocorrido em um passado longínquo, onde as circunstâncias remetem para interações ambientais que associaram parasito-vetor-hospedeiro, possivelmente há cerca de 100 milhões de anos. Certamente, as interações permitiram a preservação das espécies do protozoário patogênico, mediante sua circulação sustentada pelos insetos-vetores e pelos hospedeiros mamíferos. Acredita-se que, naqueles primórdios, uma das conseqüências dessas interações tenha sido o surgimento de patologias nos hospedeiros silvestres do *T. cruzi*. Mais recentemente, há apenas 9 mil anos, aquela patologia alcançou os Ameríndios e, há apenas 500 anos, a doença tornou-se epidêmica nos colonizadores europeus e africanos do Novo Mundo. A Doença de Chagas é conhecida, hoje em dia, como a maior endemia

transmitida por vetores no Mundo Ocidental (revisto em Teixeira e cols, 2006).

Atualmente, existem cerca de 18 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*; estima-se a morte de 33 mil chagásicos por ano no Brasil, e de cerca de 100 mil em toda América Latina (WHO, 2002). Apesar do dispêndio total de 6,5 milhões de dólares no tratamento dessa doença (Dias e cols, 2002), calcula-se que os investimentos que visam o combate de sua transmissão são muito inferiores à perda econômica causada por essa endemia. Mesmo quase cem anos após sua descoberta, ainda não foram desenvolvidos remédios ou vacinas eficientes contra essa doença.

1.1. Vias de transmissão

A principal via de transmissão da Doença de Chagas ocorre por meio de insetos triatomíneos (Abad-Franch & Monteiro, 2005). Os barbeiros, como são conhecidos popularmente, pertencem à família Hemíptera e subfamília *Triatominae*. Já foram descritas mais de 120 espécies, distribuídas em todo o continente americano e também nos continentes africano, asiático e australiano. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre pela contaminação de suas mucosas com as fezes eliminadas pelo inseto-vetor durante o repasto.

Outras rotas de transmissão desta doença são: congênita, também conhecida como transplacentária, oral e transfusional. Esta última é considerada a principal via de transmissão na zona urbana, onde residem

70% da população das Américas (Bonametti e cols, 1998). É interessante destacar que a avaliação de doadores contaminados em bancos de sangue se faz no Brasil desde a década de 80, porém muitos países ainda não contam com este controle, o que contribui para a ampla disseminação da doença além das áreas endêmicas. Nos Estados Unidos, por exemplo, verificou-se que doadores de sangue positivos para *T. cruzi* não estão concentrados apenas nos estados do sul e sudeste, onde se encontra a maioria dos imigrantes, mas, sim, espalhados por todo o país (Leiby e cols, 2002).

A transmissão por via oral também vem adquirindo importante papel na epidemiologia dessa doença. Apesar de ser uma rota habitual de aquisição do *T. cruzi* pelos mamíferos silvestres insetívoros, os relatos em humanos costumavam ser pouco freqüentes. Nos últimos anos, entretanto, esse cenário vem se alterando: em seu trabalho de revisão, Dias (2006) relata 10 episódios de contaminação humana pela ingestão do parasito, inclusive o surto ocorrido em Santa Catarina, em 2005, devido à ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado. Esse tipo de aquisição da infecção pela via oral tem sido observado persistentemente na região amazônica (Pinto e cols, 2004).

1.2. Diagnóstico

O primeiro diagnóstico da Doença de Chagas foi feito no dia 23 de abril de 1909, quando Carlos Chagas identificou, pelo exame microscópico, o parasito no sangue de Berenice, uma menina de três anos de idade.

A partir daí, diferentes testes passaram a ser utilizados no diagnóstico dessa infecção. Entre eles, podemos citar o xenodiagnóstico, que consiste em colocar triatomíneos criados em laboratório, alimentados em aves e, portanto, livres de contaminação com o protozoário flagelado, para sugar o sangue de uma pessoa suspeita de ter a infecção chagásica. Se houver o flagelado no sangue do suspeito, ele se multiplicará no intestino do inseto, podendo ser detectado pelo exame microscópico da excreta do triatomíneo. Seu emprego rotineiro, entretanto, sofre restrições devido ao contato de insetos repulsivos com a pele de pessoas que podem ter reações de hipersensibilidade ou mesmo a não-aceitação do teste pelo pavor à picada. Existe ainda a limitação inerente ao longo tempo requerido para a multiplicação do protozoário no intestino do triatomíneo, podendo ser de até 90 dias (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

O diagnóstico mediante testes sorológicos é bastante utilizado para detecção de anticorpos específicos contra antígenos do *T. cruzi*, oferecendo evidência indireta de sua presença no corpo do chagásico. Os testes mais usados são a hemaglutinação indireta, a imunofluorescência indireta e ELISA, representando diferentes maneiras de identificar o anticorpo que interage com o parasito, facilitando o diagnóstico indireto do portador da infecção chagásica. Sabendo-se que existem resultados duvidosos ou

falsos positivos devido à reação cruzada com antígenos de outros microorganismos (Vexenat e cols, 1993; Gadelha e cols, 2003), é necessário que o resultado seja interpretado com cautela. Ou seja, o exame positivo significa apenas evidência indireta da infecção, mediante identificação de um fator imune que reconhece antígenos do agente da Doença de Chagas. Em vista disso, procura-se considerar que o teste é positivo quando houver resultado concordante em dois exames sorológicos que identificam anticorpos anti-*T. cruzi* (WHO, 2002).

Na tentativa de resolver esta questão de possíveis inespecificidades do diagnóstico sorológico, emprega-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) como diagnóstico laboratorial complementar. As peculiaridades da PCR, particularmente sua alta sensibilidade, trazem algumas implicações na interpretação dos resultados, requerendo uma dose maior de cautela e muito mais investigação sobre o significado de resultados positivos, como nos testes feitos rotineiramente com base em seqüências aneladoras (primers) oriundas do DNA mitocondrial do *T. cruzi* (revisto em Teixeira e cols, 2006). Esta questão será melhor esclarecida quando falarmos da integração do kDNA no genoma das células hospedeiras.

Em decorrência dessas dificuldades, diferentes pares de seqüências aneladoras têm sido testados para se avaliar o real significado do diagnóstico da infecção ativa (Nitz e cols, 2004*; Virreira e cols, 2003; Gomes e cols, 1998). Por exemplo, o significado das diferenças de diagnóstico encontradas na comparação de resultados de exames

sorológicos e de PCR com primers de DNA nuclear e mitocondrial (kDNA) do parasita precisa ser esclarecido. A esse respeito, Andersson (2004) comprovou a precisão da PCR em seus experimentos: de 39 soros analisados, o ELISA conseguiu identificar 21 pacientes infectados, enquanto a PCR detectou 33 casos positivos. Assim, o real significado dessas diferenças na interpretação do caso humano é algo que ainda precisa mais investigação.

* O trabalho de Nitz e cols, 2004 foi cancelado unilateralmente pela Editora- Chefe da Cell (Cancelamento, 2005; Marcus, 2005). Os resultados daquele trabalho estão confirmados e discutidos nesta Tese.

1.3. Manifestações Clínicas

Para facilitar a compreensão das manifestações clínicas associadas à Doença de Chagas, costuma-se agrupar seus sintomas em três fases: aguda, indeterminada e crônica.

A primeira fase é usualmente assintomática, passando despercebida na grande maioria dos pacientes. Em alguns casos, o indivíduo infectado apresenta febre, mal-estar e mialgia. De acordo com a porta de entrada do parasito, pode ocorrer um inchaço nos olhos (sinal de Romanã) ou lesão cutânea (Chagoma) endurecida, típica hipersensibilidade tardia aos antígenos do protozoário (revisto em Teixeira e cols, 2006; Prata, 2001).

A fase indeterminada sucede à fase aguda e pode ser definida como um silêncio prolongado de várias décadas (30 ± 7.5 anos). Ao longo da fase indeterminada, o chagásico não tem manifestações clínicas reconhecidas: os indivíduos apresentam evidências sorológicas e parasitológicas da infecção, mas permanecem assintomáticos e não apresentam anormalidades no coração ou trato digestório (Andrade, 1999).

Estima-se que 25% das pessoas infectadas desenvolvem a fase crônica (Bustamante e cols, 2003). Em 94,5% dos casos, a doença se manifesta pelo comprometimento da função cardíaca. Essa é a manifestação de maior gravidade, pois 38,5% dos casos morrem subitamente e 56% desenvolvem insuficiência cardíaca. A cardiomiopatia chagásica está associada com a alta letalidade na fase crônica da Doença de Chagas. Em 5,5% dos casos, observa-se a presença de desordens gastrintestinais (megaesôfago e megacólon) que afetam o chagásico e se associam com a sua morte, geralmente depois dos 45 anos de idade (Teixeira e cols, 2006).

1.4. O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. É caracterizado pela presença de um flagelo e de uma única mitocôndria tubular, na qual está localizado o cinetoplasto, um DNA de estrutura peculiar, também chamado de kDNA.

Existem duas populações de *T. cruzi* bem definidas, o que nos permite classificá-los como *T. cruzi* I ou II. O primeiro é encontrado predominantemente em triatomíneos e mamíferos silvestres, enquanto o segundo é usualmente encontrado em humanos (Devera e cols, 2003).

O ciclo de vida deste parasito é bastante complexo, alternando entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (Figura 1). Resumidamente, formas epimastigotas não infectantes sofrem um processo de diferenciação no intestino médio e no reto do triatomíneo vetor, produzindo, assim, as formas tripomastigotas metacíclicas capazes de infectar mamíferos. As tripomastigotas são eliminadas nas fezes dos insetos e, ao entrar em contato com a mucosa do hospedeiro, convertem-se em amastigotas replicativas que residem no citoplasma da célula hospedeira. Caso um barbeiro venha a se alimentar deste hospedeiro infectado, ele irá ingerir o protozoário presente no sangue, reiniciando o ciclo (Burleigh, 2004).

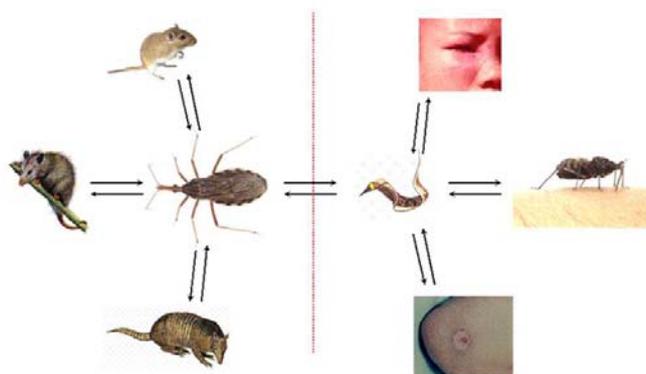


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Teixeira e cols, 2006).

1.5. O DNA mitocondrial (kDNA)

Devido à sua grande complexidade, a mitocôndria de tripanossomatídeos é uma das organelas mais estudadas. Ela alberga moléculas circulares de DNA que chegam a representar 15% do DNA total do parasita. Essas moléculas circulares podem ser classificadas como maxicírculos e minicírculos, as quais estão interligadas formando rede única (Figura 2).

Cada uma das 40 a 50 cópias de maxicírculos tem cerca de 40kb e possui os genes que codificam as proteínas mitocondriais, tais como genes de rRNAs e de proteínas do complexo respiratório (Klingbeil & Englund, 2004).

Os minicírculos de *T. cruzi* são moléculas pequenas de 1.4 kb, presentes como milhares de cópias concatenadas, formando a rede de kDNA. Sua organização é bastante peculiar, apresentando regiões variáveis e conservadas, sendo que a quantidade e distribuição dessas regiões parecem ser específicas para cada tripanossomatídeo. No *T. cruzi*, observa-se a presença de 4 regiões conservadas (120-160pb) intercaladas por 4 regiões variáveis (280-320pb). Os minicírculos codificam RNAs guias (gRNA) que auxiliam na editoração dos mRNAs dos maxicírculos mitocondriais (Junqueira e cols, 2005).

A editoração é uma forma de processamento do mRNA, no qual ocorre a adição ou deleção de resíduos de uridinas antes da tradução, e isso regula a expressão dos genes mitocondriais. Os gRNA são complementares a cada região de mRNA a ser editada, formando assim um

híbrido mRNA-gRNA. Essa união de RNAs, associada a proteínas codificadas por genes nucleares e importadas para a mitocôndria, forma um complexo ribonucléico que é essencial para a iniciação e propagação da editoração do RNA (Mandison-Antenucci e cols, 2002).

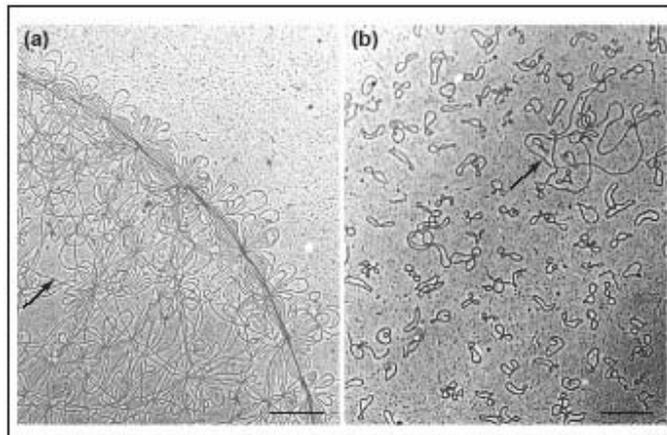


Figura 2: O DNA mitocondrial. (a) O kDNA é uma rede elíptica composta de maxicírculos e minicírculos. (b) Minicírculos decatenados e único maxicírculo (seta) (Liu e cols, 2005a).

A replicação do kDNA é provavelmente o caso mais bem estudado de divisão do DNA de uma organela. Ela envolve a duplicação de minicírculos e maxicírculos que serão repartidos igualmente nas progênes. Pouco se sabe sobre a replicação dos maxicírculos, a não ser que ela ocorre de maneira unidirecional, a partir de uma origem única, e que não há o desprendimento dos maxicírculos da rede.

Em relação à replicação dos minicírculos, existe um conhecimento muito maior. O modelo atual propõe que os minicírculos sofrem a ação de

uma topoisomerase II que os cliva e os lineariza, propiciando a liberação destes para a periferia da rede de kDNA, onde serão replicados na presença de uma série de proteínas, como DNA primases e polimerases. Assim como os maxicírculos, os minicírculos apresentam replicação unidirecional a partir de uma origem única. Os minicírculos replicados apresentam *gaps* que deverão ser removidos antes que eles retornem ao disco de kDNA. A reintegração dos minicírculos também envolve topoisomerasas que promovem a ligação das moléculas recém-sintetizadas com a rede de kDNA (Liu e cols, 2005b; Lukes e cols, 2005).

2. Doença de Chagas e Auto-imunidade

Inicialmente, a Doença de Chagas era estudada como sendo resultado de uma resposta antiparasitária. Essa hipótese tem sustentação no conhecimento sobre a persistência do parasitismo nos tecidos de pacientes que se encontravam na fase crônica da doença. Além disso, drogas contra o parasita são efetivas no combate às formas sangüíneas do protozoário, porém o tratamento não elimina a infecção na maioria das séries de casos encontradas na literatura (revisto em Lauria-Pires & Castro, 2007). Ainda que alguns autores tenham verificado que o tratamento diminui a severidade dos sintomas (Gironès & Fresno, 2003), muitos outros não encontraram efeitos benéficos significativos com o tratamento, não se verificando a interrupção das lesões detectadas pelo eletrocardiograma e

nem o desaparecimento das manifestações clínicas da doença (Lauria-Pires e cols, 2000; Coura e cols, 1997).

Na década de 70, surgiu a hipótese que considera a Doença de Chagas de origem auto-imune (Santos-Buch & Teixeira, 1974; Teixeira, 1975). Essa hipótese tem suporte experimental em trabalhos que demonstram rejeição acelerada de fibras do coração de fetos de coelhos pelos linfócitos do sangue periférico de coelhos chagásicos crônicos. Em 8 horas de incubação, os linfócitos imunes destruíam completamente as células-alvo do coração *in vitro*, enquanto que os linfócitos normais de coelhos sadios não atacavam as células do coração (Santos-Buch & Teixeira, 1974).

Em seguida, vários autores contribuíram com dados que confirmam a auto-imunidade na Doença de Chagas. Por exemplo, Cunha Neto e cols (1986) mostraram que linfócitos esplênicos de camundongos chagásicos são estimulados por antígenos de *T. cruzi* e de miosina de coração murino. Tal resposta proliferativa *in vitro* foi considerada decorrente de antígenos de reação cruzada ou de mimetismo antigênico entre proteínas do coração e do *T. cruzi*. Ribeiro dos Santos e cols (1992) mostraram que enxertos de coração de fetos de camundongos em animais singênicos são destruídos pelas células do sistema imune do receptor, enquanto que camundongos sadios não mostram a rejeição do enxerto. Vários outros relatos identificaram reações auto-ímmunes no curso da infecção chagásica experimental, sendo que os possíveis mecanismos associados com as

respostas auto-ímmunes seriam mimetismo molecular, ativação *bystander* e ativação policlonal.

Para o mimetismo molecular, haveria uma resposta cruzada entre epítomos do hospedeiro e antígenos do parasito, o que levaria a resposta imune a atuar contra proteínas do próprio tecido. Leon e cols (2004) imunizaram camundongos com extrato de *T. cruzi* e observaram que os anticorpos eram capazes de reconhecer uma miosina cardíaca. A resposta cruzada já foi observada entre a miosina e diferentes antígenos do *T. cruzi*, como o antígeno B13 (Iwaia e cols, 2005) e a cruzipaína (Guiñazú e cols, 2004). Além disso, Perone e cols (2003) identificaram uma alta identidade entre a proteína ribossomal L27 de *T. cruzi* e proteínas ribossomais de diferentes espécies, incluindo a de *Homo sapiens*, o que levaria à auto-imunidade.

O modelo de ativação policlonal defende que cepas de *T. cruzi* promovem uma ativação indiscriminada de linfócitos T e B durante a fase aguda, o que resulta em uma resposta imune inespecífica com a produção de auto-anticorpos (Kierszenbaum, 1999). Uma das questões deixadas em aberto pelo autor é que não se tem marcadores genéticos e fisiológicos que identifiquem verdadeiras cepas de *T. cruzi*. Pelo contrário, a reprodução sexuada do protozoário tem sido considerada a fonte da enorme diversidade genética encontrada em isolados e estoques de *T. cruzi* (revisto em Teixeira e cols, 2006)

Na ativação *bystander*, acredita-se que o próprio ambiente inflamatório, rico em citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, pode ser capaz

de induzir células T auto-reativas. Adicionalmente, a infecção pelo *T. cruzi* também levaria à liberação de proteínas próprias, as quais, por sua vez, estimulariam a produção das células auto-reativas (Leon & Engman, 2001).

Diante das diferentes propostas e na ausência de dados experimentais, parece interessante analisar o comentário de Felipe Kierszenbaum (2005): “A hipótese da auto-imunidade tem tido conseqüências, ao desencorajar que sejam feitos novos esforços para se desenvolver quimioterapia e vacinação efetivas”. A frase mostra claramente o efeito da polêmica que é mantida em artigos de revisão sem, contudo, acrescentar algo novo emergente da investigação científica. Pois somente a investigação que produz informação nova poderia esclarecer alguns aspectos ainda não conhecidos da hipótese da auto-imunidade. Acreditamos que o que dificulta o encontro de alternativas para condução do manejo clínico e tratamento é o desconhecimento sobre a patogênese da Doença de Chagas.

2.1. A Auto-Imunidade e o LMPDC

Ao longo de quase duas décadas de trabalho, o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC) da Universidade de Brasília, tem dedicado maior atenção à investigação que visa compreender os mecanismos associados com as lesões do coração e do tubo digestório do chagásico. Diante desse interesse, resolvemos fazer um breve histórico das etapas da pesquisa aqui realizadas, as quais

sugerem a possibilidade de desvendar a origem das reações auto-imunes que rejeitam o coração do chagásico.

Em 1991, Teixeira e cols observaram, por meio de técnicas de citogenética e hibridização *in situ*, a presença de DNA do *T. cruzi* associado ao DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados pelo parasita, o que sugeria um rearranjo transxenogene. Três anos mais tarde, novas análises moleculares apresentaram evidências sugestivas de que apenas os minicírculos do kDNA se integrariam no DNA nuclear de macrófagos humanos em cultura (Teixeira e cols, 1994).

A próxima etapa, então, visou a demonstração da aquisição horizontal do kDNA por meio das técnicas *Southern blot* e PCR com *primers* específicos do kDNA e do DNA do hospedeiro, seguidas de clonagem e seqüenciamento do DNA invasor. As primeiras seqüências mostrando minicírculos de kDNA ligados covalentemente a elementos retrotransponíveis do macrófago humano foram publicadas na tese de doutorado de Argañaraz (1996).

Em seguida, Simões-Barbosa e cols (1999) observaram que clones de macrófagos transfectados com o kDNA mantinham a mutação nas progênes após três anos de passagens sucessivas em culturas. As células clonadas, que tinham a banda de kDNA integrado identificada pelo *Southern blot*, apresentaram modificação do perfil da banda sugestiva de integração ao longo dos anos em cultura, indicando que teria havido mobilização do kDNA integrado no genoma da célula. A transposição dos minicírculos integrados no genoma desse clone de macrófago também

sugeriu a possibilidade de alterações genóticas com repercussões funcionais manifestas nos fenótipos. Verificou-se que alteração do fenótipo correlaciona com expressão gênica diferenciada de antígenos na membrana do macrófago, reconhecidos pelos anticorpos de pacientes chagásicos (Simões-Barbosa, 2000).

O estudo da população de mRNA dos macrófagos infectados mostrou RNAs endógenos sub-expressos três anos pós-infecção, os quais estavam presentes na linhagem de macrófago controle (não-transfectado), tais como transcritos idênticos à Sub1 mRNA (GenBank NM011294) e ao cDNA p15 de *Homo sapiens*, um fator de transcrição da RNA polimerase II (GenBank BC022339). A utilização da técnica ddRT-PCR (*differential display*) permitiu verificar que o gene p15 estava modificado na amostra de DNA daquele clone de macrófago aos três anos pós-infecção. Este achado é sugestivo de uma patologia molecular decorrente da mutação do kDNA e sua posterior mobilização dentro do genoma via retrotransposon ativo, produzindo silenciamento de uma das cópias do gene p15 (Simões-Barbosa e cols, 2006).

Todos esses resultados prévios precederam à investigação da transferência horizontal de kDNA de *T. cruzi* em modelos animais. Os estudos conduzidos em coelhos, aves e humanos mostraram a integração do kDNA no genoma de vertebrados. Os resultados das análises *in vivo*, mostrando a transferência de seqüências de minicírculos de kDNA para o genoma de mamíferos e de aves, levou à publicação do trabalho na revista *Cell* (Nitz e cols, 2004).

Esse trabalho gerou uma acirrada polêmica com grande repercussão e interesse científicos. Surgiram questionamentos sobre três aspectos fundamentais do trabalho de Nitz e cols (2004): 1) As análises bioinformáticas das seqüências justapostas ao kDNA no genoma humano, que deram similaridade parcial e escores baixos na busca em banco de dados; 2) presença de homologias entre aquelas seqüências e outras de várias espécies; 3) possibilidades de contaminação ou de produção de artefatos de PCR pela técnica 5'-RACE. Diante dessas críticas o trabalho foi cancelado unilateralmente pela Editora da revista *Cell*, sem que ao menos uma delas fosse comprovada com dado experimental. A forma como foi feito o retratamento daquele trabalho gerou mais interesse na comunidade científica. A intempestividade do cancelamento tem sido fator de incentivo constante à continuação do trabalho, visando o avanço do conhecimento sobre o tema, mediante produção de informação e dados.

O trabalho publicado na revista *Cell* demonstra a transferência horizontal do kDNA do *T. cruzi* para o genoma de aves, de coelhos e de pacientes chagásicos. A herança vertical das mutações de kDNA para as progênes de coelhos e galinhas foi descrita (Nitz e cols, 2004). Nesse trabalho, as mutações de kDNA foram encontradas em cópias de retrotransposons LINE-1. As análises em bancos de dados das seqüências de DNA híbrido na região de justaposição sugeriu a possibilidade de formação de pseudogenes ou de novos genes, visto que foram identificadas novas fases de leitura aberta (ORFs).

Mais recentemente, o aluno de doutorado Clever Gomes (2006) intensificou a investigação sobre a transferência vertical do kDNA integrado. Naquele estudo, as mutações de kDNA foram estudadas em galinhas (*Gallus gallus*), pois as aves são permissivas ao *T. cruzi* apenas nos primeiros dias de desenvolvimento embrionário e, portanto, a refratariedade das aves ao *T. cruzi* elimina a possibilidade de transferência passiva do kDNA do parasito. De fato, as formas tripomastigotas do *T. cruzi* inoculadas intra-ovo foram eliminadas pela imunidade inata do embrião após o oitavo dia de incubação. Em seguida, a detecção exclusiva do kDNA do parasito (na ausência de nDNA) significa que o DNA mitocondrial do *T. cruzi* foi integrado no genoma da galinha. Gomes (2006) observou a herança da mutação do kDNA em três gerações. Verificou também que as mutações de kDNA nos parentais e nas progênes se associavam com sintomatologia clínica (insuficiência cardíaca), cujo substrato estava claramente presente na cardiopatia com aumento do coração (Figura 3). Além disso, o estudo verificou que um sítio de integração do kDNA no genoma da galinha é o retrotransposon CR-1 (equivalente a LINE de mamíferos) do cromossomo 4. (Gomes, 2006).



Figura 3: Cardiomiopatia em galinha pertencente à geração F₁, oriunda do cruzamento de aves kDNA-positivas. O coração mutado (à esquerda) é cerca de 4 vezes maior que o coração da galinha-controle (à direita), da mesma idade.

3. Elementos Transponíveis

Os elementos transponíveis são seqüências de DNA capazes de se transportar para outros locais dentro do genoma, sem qualquer obrigatoriedade reconhecida de homologia relacionada com o sítio-alvo de posicionamento novo. No geral, eles se limitam à mobilização de si mesmos, mas, às vezes, podem carregar algumas seqüências adicionais. De acordo com suas estruturas e mecanismos de transposição, eles costumam ser agrupados em duas classes. A classe I engloba os elementos que se movem via uma cópia de RNA e utilizam a transcriptase reversa. Já na classe II, estão os elementos que utilizam uma transposase para transpor um DNA intermediário (Casse e cols, 2006). Os elementos da classe I e II são chamados, respectivamente, de retrotransposons e transposons.

Existem pelo menos 7 classes de DNA transposons no genoma humano, mas, aparentemente, eles se encontram completamente inativos nos vertebrados, particularmente nos mamíferos. Em relação aos retrotransposons, sabe-se da existência de um número muito maior de cópias no genoma humano, muitos dos quais permanecem ativos ainda hoje. Os retrotransposons podem ser classificados como elementos LTRs (longas repetições terminais) e não-LTRs. Estes incluem SINEs (seqüências repetitivas curtas) e LINEs (seqüências repetitivas longas) (Figura 4).

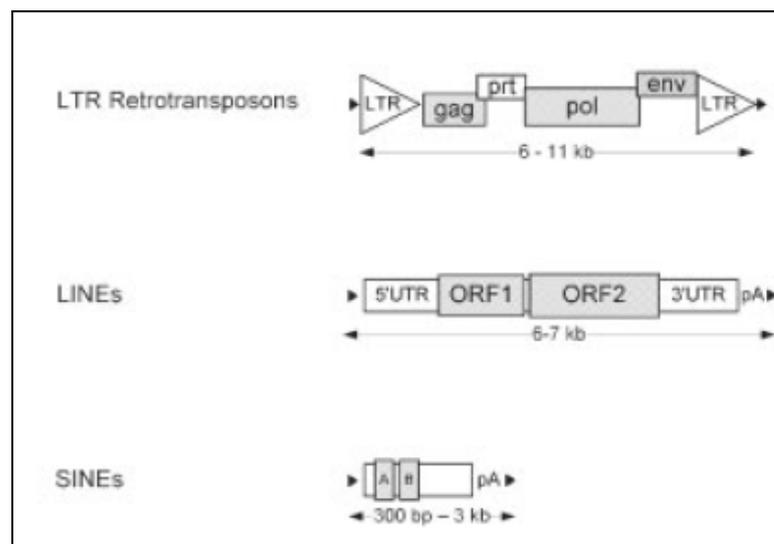


Figura 4: Estrutura de elementos retrotransponíveis. Elemento LTR. Observe-se a presença dos genes *gag* (group-specific antigen), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). LINE, exemplo de elemento não-LTR. SINE é constituído por dois monômeros similares – A e B – e cauda poli-A. Adaptado de Babushok & Kazazian, 2007.

3.1. Descrição dos Retrotransposons

Os retrotransposons LTR constituem uma fração substancial do genoma de eucariotos (aproximadamente 8%), sendo caracterizados pela presença de longas repetições terminais, as quais contêm os componentes reguladores da transcrição. Suas estruturas e modo de replicação são similares aos dos retrovírus infectivos: possuem os genes gag e pol e a transcrição reversa ocorre no citoplasma, iniciando a síntese a partir de um tRNA (Lewin, 2001). Devido a essas características, os elementos LTR também são chamados de retrovírus endógenos e atualmente acredita-se que eles tenham se originado de numerosas infecções virais que ocorreram repetidamente durante a evolução dos primatas (Kovalskaya e cols, 2006).

Dentro da família de LINEs, destaca-se o elemento LINE-1, ou L1, que é o retrotransposon mais bem sucedido em mamíferos, chegando a ocupar 17% do genoma humano. Esse elemento emergiu há cerca de 120 milhões de anos e continua se expandindo no genoma humano (Lee e cols, 2006a). Possui cerca de 6000 pb e é constituído por uma 5'-UTR onde está o promotor de RNA Pol-II, duas fases de leitura aberta (ORFs), uma 3'-UTR e uma cauda poli-A. A ORF1 codifica uma proteína cuja função não é muito bem conhecida, mas sabe-se que ela tem afinidade por RNA e que é essencial para retrotransposição de L1 (Martin, 2006). A ORF2 codifica proteínas com atividade de endonuclease e transcriptase reversa (Hedges & Batzer, 2005). Assim, acredita-se que a inserção do LINE no cromossomo ocorre quando a endonuclease da ORF2 cliva uma única fita do DNA,

liberando um 3' –OH que serve como *primer* para a transcrição reversa, utilizando o RNA de L1 como molde (Kazazian & Goodier, 2002).

SINEs são elementos pequenos que possuem entre 75 e 500pb e contêm um promotor de RNA polimerase III, muito semelhante ao do tRNA, e uma cauda poli-A. Devido a essas características, pseudogenes de tRNA são considerados seus precursores, apesar dos SINEs serem muito mais numerosos (Borodulina & Kramerov, 2006). Estes retrotransposons não codificam proteínas e, por isso, dependem da transcriptase reversa sintetizada pelos LINEs para poderem se mover pelo genoma.

O membro mais conhecido da família SINE é o *Alu*: encontrado exclusivamente em primatas, esse elemento é o único SINE ativo em humanos e representa 5% do genoma total (Lander e cols, 2001). Os membros individuais da família *Alu* são relacionados, mas não idênticos, apresentando uma identidade média de 87% com a seqüência consenso (Lewin, 2001). Acredita-se que os *Alus* originais eram elementos monoméricos que, há cerca de 30-40 milhões de anos, se uniram dois a dois para formar os *Alus* que conhecemos atualmente (Hedges & Batzer, 2005).

3.2 Impactos da Retrotransposição

3.2.1. Tamanho e Variabilidade do genoma

Os retrotransposons têm uma significativa contribuição na evolução dos seres vivos. A expansão dos genomas causada por esses elementos é observada nos mais diferentes seres, chegando a corresponder a 15% do genoma de *Drosophila*, 45% do de humano e a até 70% do de plantas e anfíbios (Biemont & Vieira, 2005). Em 1998, SanMiguel e colaboradores observaram que o aumento do tamanho do genoma do milho deve-se a ampliações de elementos transponíveis que ocorreram há cerca de 6 milhões de anos. Estudos comparativos mostram que houve uma expansão de 15-20% do genoma de humanos em relação ao de chimpanzés, e 90% dessa expansão deve-se à inserção de retrotransposons (Liu e cols, 2003).

Em relação à variabilidade, sabe-se que o elemento *Alu* gera grande instabilidade genômica: eventos de recombinação genética são responsáveis por deleções, inserções e translocações em grande escala (Callinan e cols, 2005). Além disso, esses SINEs também contribuem para que haja um aumento do conteúdo de CG dos sítios de integração. Isso parece ser interessante, pois muitos mamíferos, incluindo os primatas, sofreram um aumento unidirecional de mutações C-T (Hedges & Batzer, 2005).

A retrotransposição de LINEs também contribui para a evolução dos genomas ao promover recombinação ectópica ou alterar a expressão e regulação dos genes. É possível constatar que esses eventos continuam

ocorrendo até os dias atuais: muitos dos elementos L1 que se inseriram no genoma humano são recentes, permitindo verificar polimorfismo populacional pelo estudo de determinados L1s em algumas regiões cromossômicas (Seleme e cols, 2006).

3.2.2. *Exon shuffling* e evolução de proteínas

Após o seqüenciamento de diversos genomas, o mundo científico pôde constatar que o número de proteínas de um organismo é muito superior à quantidade de genes desse mesmo organismo. Em humanos, por exemplo, estima-se que existem cerca de 1 milhão de proteínas a partir dos 20.000-25.000 genes existentes (www.hupo.org).

Para explicar esse fenômeno, muitas teorias surgiram, entre elas, a de *exon shuffling*. Em 1978, Gilbert propôs que os exons correspondem a módulos funcionais nas proteínas e que a sua duplicação, permutação ou rearranjo pode resultar em novos genes com diversas funções, o que acarreta uma consequência direta no conteúdo protéico de um organismo. Um dos mecanismos que causaria o *exon shuffling* é a retrotransposição.

Recentemente, observou-se o surgimento de um novo gene em *Drosophila melanogaster*. Denominado de Sdic, esse gene codifica uma nova proteína relacionada com a mobilidade dos espermatozoides. Acredita-se que ele tenha se originado de três duplicações *in tandem* e de um evento de retrotransposição (Ponce & Hartl, 2006).

Em vertebrados, o primeiro relato de formação de um gene quimérico mediado por *exon shuffling* foi feito em 2004. Em seus estudos, Sayah e colaboradores identificaram uma proteína resultante da fusão do gene TRIM5 e da Ciclofilina A (CypA), a qual seria responsável por impedir a proliferação do vírus HIV em macacos. Essa proteína teria surgido em primatas do Novo e do Velho Mundos quando a retrotransposição de um LINE-1 catalisou a inserção do cDNA de CypA no locus de TRIM5.

3.2.3. Doenças causadas por elementos transponíveis

As alterações genéticas resultantes de um evento de retrotransposição podem trazer sérias conseqüências para um organismo, não apenas ao gerar novas proteínas, mas também ao influenciar a expressão de genes vizinhos.

Estima-se que 0,5% das desordens genéticas humanas sejam resultantes da integração ou recombinação homóloga de elementos transponíveis (Hedges & Batzer, 2005). Entretanto, esse número deve ser consideravelmente maior, pois ainda não se entende muito bem a patogênese de muitas doenças.

Desde o primeiro relato, sugerindo que a inserção de um elemento L1 no gene do fator VIII era capaz de causar hemofilia do tipo A (Kazazian e cols, 1988), muitos outros casos de danos causados por elementos retrotransponíveis foram descritos. Chen e colaboradores (2006) foram capazes de identificar 51 eventos de mutações resultantes da integração de

L1 que estavam associadas a doenças genéticas. Musova e colaboradores (2006) relataram que a integração de L1 no exon 44 do gene da distrofina promovia a distrofia muscular de Duchenne. Hurk e cols (2007) demonstram que L1 é capaz de se retrotranspor no gene CHM do cromossomo X, causando uma séria doença ocular que pode ser passada para os descendentes. Várias doenças causadas por elementos *Alu* também já foram descritas: associação com leucemia, câncer de ovário e de mama, deficiência do complemento, neurofibromatose, entre outras (Deininger & Batzer, 1999).

4. Suscetibilidade ao DNA exógeno

A assimilação de DNA exógeno é um fenômeno natural muito antigo. Um exemplo freqüente na literatura descreve a interação de DNA viral com o DNA do hospedeiro. Retrovírus e lentivírus necessitam da maquinaria celular para se replicarem e, para isso, convertem o RNA em cDNA e o integra no genoma do hospedeiro. Estudos *in vivo* identificaram 524 sítios de integração do vírus HIV no genoma humano, sendo que os genes ativos são os principais alvos (Schröder e cols, 2002).

A integração do DNA de bactérias em células hospedeiras também é um fenômeno bastante comum, e isso tem sido demonstrado pelo seqüenciamento de genomas. Um exemplo conhecido teria ocorrido durante o processo de evolução que levou ao aparecimento do DNA em organelas simbiotes. As teorias atuais sugerem que mitocôndrias e

cloroplastos teriam surgido a partir de eubactérias ancestrais que passaram a manter uma relação endossimbiótica com seus hospedeiros (Gray, 1999). Além disso, acredita-se que, durante a evolução dos vertebrados, uma centena de genes bacterianos tenha sido transferida para o genoma humano (Lander e cols, 2001).

Elaborando um pouco mais na escala evolutiva, chegamos aos organismos eucariotos. Por apresentarem uma membrana envolvendo o núcleo, a transferência do DNA de um organismo eucarioto para outro tem maior complexidade, mas ainda assim continua a ocorrer. Existem relatos de que, através do contato físico entre plantas e parasitos, pode ocorrer transferência de genes entre organismos eucariotos (Mower e cols, 2004; Davis & Wurdack, 2004). A identidade de 97,6% entre o elemento transponível MLE de traça e de vespa sugere que esse gene tenha sido transferido recentemente durante o processo de parasitismo (Yoshiyama e cols, 2001).

Alguns estudos revelam a aquisição de DNA de hospedeiros mamíferos por parasitos. Imase e cols (2004) identificaram seqüências de nucleotídeos provenientes de camundongos no genoma de *Schistosoma japonicum* adultos e de seus descendentes (cercárias). Igualmente, Williams e cols (2006) e Demarco e cols (2007) estudaram a albumina de *S. mansoni*, uma proteína bastante incomum entre invertebrados, que apresentava alta similaridade com a albumina de mamíferos, sugerindo a transferência do gene do hospedeiro para o verme.

Como visto nos parágrafos anteriores, a literatura tem documentado múltiplos episódios de transferência de genes entre organismos eucariotos. Entretanto, o trabalho realizado no LMPDC, que indica a transferência de seqüências de minicírculos de kDNA para vários hospedeiros vertebrados (Nitz e cols, 2004), assume grande importância porque o fenômeno ocorre sempre que o mamífero é infectado pelo *T. cruzi*. Portanto, trata-se de demonstração de transferência gênica horizontal (TGH), ocorrendo diariamente em animais infectados no laboratório e em humanos.

A herança do kDNA integrado no genoma de aves e mamíferos sugere uma nova teoria e, possivelmente, um novo paradigma, ao indicar que a Doença de Chagas tem base genética. Conseqüentemente, essa teoria leva adiante a sugestão de que a doença não resulta simplesmente da ação mecânica direta do parasito, produzindo morte da célula do coração. Ao contrário, a nova teoria sugere que a Doença de Chagas seria uma doença genética induzida pelo parasito transmitido pelo inseto-vetor, dependendo ainda de diversas vias metabólicas de sinalização que influenciam a integração das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro.

Ademais, a nova teoria também sugere, pela natureza dos resultados publicados, que a evolução darwiniana continua sua marcha. Nossos registros de transferência de seqüências de minicírculos foram observados em todos os hospedeiros chagásicos estudados. Os trabalhos conduzidos no LMPDC descrevem este fenômeno na natureza, reproduzindo-o continuada e experimentalmente. A constatação de integração do kDNA no

genoma hospedeiro, subseqüentes às infecções naturais pelo *T. cruzi*, sugere que se trata de um evento freqüente, superando as expectativas citadas na literatura (Simonson e cols, 2005; Choi & Kim, 2007).

4.1. DNA Exógeno e Efeitos na População

Ao falarmos de assimilação do DNA exógeno, devemos levar em consideração dois conceitos muito importantes: transferência gênica horizontal (TGH) e transferência gênica vertical (TGV). O primeiro refere-se à troca de material genético entre seres sem parentesco, afetando unicamente o indivíduo que adquiriu o DNA. O segundo está relacionado com a passagem das seqüências integradas para a progênie, passando a ter um efeito sobre a população. Nesse caso, é imprescindível que a assimilação do DNA também ocorra nas células germinativas.

Em 1998, Magnano e cols demonstraram que DNA exógeno pode ser espontaneamente capturado e internalizado no núcleo de espermatócitos de camundongos. No contexto, foi reconhecida uma região específica no segmento equatorial e região pós-cromossomal da cabeça do espermatozóide, a qual tem capacidade de ligação com o DNA exógeno (Camaioni e cols, 1992). Em seu trabalho de revisão, Spadafora (1998) afirma que os espermatozoides de uma grande variedade de espécies são capazes de interagir com DNA do meio e atuar como vetores. Em resumo, muitos autores postulam que a integração do DNA exógeno pode ter papel evolutivo.

Muitas vezes, o DNA integrado não altera nem a expressão nem a regulação dos genes vizinhos, e, por isso, dizemos que esse evento foi uma mutação neutra, a qual apenas contribui para a variabilidade da população. Caso a mutação altere o fenótipo do indivíduo, nós podemos classificá-la como benéfica ou deletéria, dependendo de se ela vai favorecer ou diminuir a adaptação do organismo ao meio ambiente (Futuyama, 2002).

Em *E. coli*, por exemplo, observou-se a ocorrência de mutações que possibilitaram um melhor crescimento desse organismo em meios ricos em maltose. Essa mutação benéfica foi passada para as gerações seguintes, favorecendo o crescimento de toda população (Remold & Lenski, 2001). Em relação às mutações deletérias, elas podem ser letais ou não. No primeiro caso, os organismos portadores de tal mutação não são viáveis, enquanto que, no segundo, se observa alguns prejuízos de adaptação. Assim, a integração do kDNA ao genoma da galinha, com conseqüente transferência para a prole (Gomes, 2006), é um bom exemplo de mutação deletéria não letal, visto que os animais apresentaram diversos danos à saúde. Apesar disso, a mutação continuou sendo passada para as gerações futuras.

II. Objetivos

1. Objetivo Geral

Diante do conhecimento exposto até aqui, nós definimos como objetivo geral de nosso estudo identificar e caracterizar os diversos tipos possíveis de integração do kDNA ao genoma humano, e verificar se há transferência vertical do kDNA de pacientes chagásicos para seus descendentes.

2. Objetivos Específicos

- Comparar resultados de exames imunológicos e de PCR usados no diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*.
- Empregar marcadores genéticos para detectar DNA nuclear e kDNA de *T. cruzi* em células sanguíneas de pacientes chagásicos.
- Investigar a ocorrência de transferência vertical do kDNA para a progênie de chagásicos.
- Identificar os sítios de integração das seqüências de minicírculos no genoma humano.

III. Materiais e Métodos

1. Amostragem

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Todos os pacientes deste estudo eram informados sobre a participação voluntária na pesquisa, respondiam ao questionário médico (ANEXO I) e, só então, se procedia à colheita de sangue.

A amostragem consistiu de 123 indivíduos. Desses, 85 foram agrupados em 5 grandes famílias. As famílias A, B e C são constituídas por parentais que nasceram em áreas endêmicas, mas que se mudaram para regiões livres de triatomíneos, e aí nasceram seus descendentes. Já as famílias D e E são formadas por indivíduos que nasceram e continuam a residir em área endêmica. Quatorze indivíduos foram reunidos em pequenas famílias (2-4 pessoas) e os outros 24 foram casos isolados encaminhados ao nosso laboratório para complementação do diagnóstico clínico.

2. Extração de DNA

2.1. Extração de DNA de células sanguíneas

De cada voluntário, coletou-se 20 mL de sangue venoso em tubos *vacutainers* contendo EDTA, e as células nucleadas, separadas em gradiente de ficol-hipaque, eram lavadas com PBS, pH 7,4, para extração de DNA (Sambrook & Russel, 2001) . O soro de cada voluntário era obtido de 5 mL de sangue colhido sem anticoagulante e guardados a -20°C .

O sedimento de células nucleadas do sangue, suspensas em tampão de extração (1 mM TRIS-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) e proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), era incubado por 12 h a 37°C . Então, o material era submetido a 2 extrações com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1) e 1 extração com igual volume de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24: 1). A separação da fase orgânica da aquosa foi feita por centrifugação a $5000 \times g$ por 15 min.

O DNA foi precipitado com 5 v de etanol 100% gelado e incubação de 1 h a -80°C . Depois desse período, o DNA foi sedimentado por centrifugação a $12000 \times g$ por 15 min. Etanol 70% gelado foi utilizado duas vezes para a lavagem do sedimento, o qual, após seco, foi ressuspenso em 500 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e RNase (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após incubação de 12 h a 37°C , o DNA era

quantificado em espectrofotômetro e sua integridade era observada em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo.

2.2. Extração de DNA total de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* crescidas em meio LIT foram colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min. O sedimento, lavado duas vezes com TBS, foi ressuspensão em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células/ml de solução. Foi feita incubação a 37°C por 1 h e, depois, adicionou-se proteinase K (100 µg/mL), prosseguindo-se a incubação por mais 12 h. A partir daí, procedeu-se a duas extrações de clorofane, seguida de uma extração de clorofil. O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, pH 4.7, e com etanol gelado (100%). O sedimento foi lavado duas vezes com etanol gelado (70%), secado e, depois, ressuspensão em tampão TE. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% e estocado a 4°C.

2.3. Extração de kDNA

O kDNA de *Trypanosoma cruzi* foi extraído segundo metodologia descrita por PEREZ-MORGA e cols (1993). Brevemente, 5×10^7 formas de cultivo foram colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min e o sedimento lavado duas vezes com PBS. O sedimento foi ressuspensão em

630 μ L de tampão NET100 (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 100 mM de EDTA pH 8.0, 100 mM de NaCl) e as células foram lisadas com 71 μ L de SDS 10%. Posteriormente, adicionou-se proteinase k (7 μ l, 20 μ g/ml). O lisado foi incubado a 37°C durante 12 h e, após incubação, foi gentilmente homogeneizado com ajuda de uma seringa de volume aproximadamente 10 vezes maior que a suspensão. Então, foram acrescentados 690 μ L de NET 100 e sacarose a 20%. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 min. Depois, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com pipeta. Adicionou-se novamente mais 690 μ L de NET 100 e sacarose 20%, repetindo-se a centrifugação.

Após a segunda centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 1000 μ L de água destilada, seguindo-se duas extrações de clorofane e uma de clorofil. O kDNA foi precipitado com etanol 100% (2,5 v) e acetato de sódio 3 M, pH 8.0 (0,1 v). O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspenso em 200 μ L de tampão TE. O kDNA extraído foi mantido a 4 °C.

3. Imunodiagnóstico

Para verificar a existência de anticorpos antiproteínas de *T. cruzi*, foram empregados três testes imunológicos, utilizando-se técnicas padronizadas (Vexenat e cols, 1993; Lauria-Pires, 2000).

3.1 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Epimastigotas do estoque Berenice, cultivados em meio de cultura, foram centrifugados a 4000 x g por 10 min. O sedimento era lavado 3 vezes com PBS pH 7,2 (4000 x g por 10 min) e, então, ressuspenso em 2 mL de água destilada. Em seguida, as células eram lisadas por três ciclos sucessivos de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) e submetidas a centrifugação de 4000 x g por 30 min. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 16000 x g por 15 min. Ao fim desse processo, determinou-se a concentração protéica do antígeno pelo método de Bradford (1976).

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno (0,1 µg de proteína por poço) diluído em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9,6 e ficaram incubadas por 12 h a 4 °C. O excesso de antígeno foi desprezado e as placas foram lavadas três vezes com PBS- Tween 0,05%, pH 7,4. Para bloquear os sítios livres, adicionava-se a cada poço 100 µL de PBS-Tween 0,05% e leite desnatado 2%, mantendo a placa incubada por 1h a temperatura ambiente. Ao final, repetiu-se o procedimento de lavagem.

Visando a detecção de anticorpos específicos, os soros foram diluídos em PBS-leite 2% (v/v) na proporção de 1:100 e transferidos para os poços. O tempo de incubação foi de 2 h a temperatura ambiente. Após mais um procedimento de lavagem, os poços foram incubados com o 2º anticorpo (anti-IgG humano conjugado com fosfatase (ZIMED, CA) diluído em PBS-leite 2%, na proporção de 1:1000) por 90 min a 37 °C. A reação foi revelada

com o substrato p-nitrofenol fosfato (SIGMA) e as densidades ópticas foram lidas a 630 nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.2 Hemaglutinação Indireta

O processamento dos parasitos utilizados nos testes de hemaglutinação indireta é idêntico ao utilizado em ELISA, até a etapa de lise por congelamento e descongelamento. Depois disso, os parasitos foram isotonzados com salina concentrada 10 vezes e o extrato foi centrifugado a 1475 x g por 5 min. O sobrenadante foi guardado a -20 °C até o momento do uso.

As hemácias utilizadas nesse procedimento foram coletadas de um doador não portador da Doença de Chagas, de grupo sanguíneo O e fator Rh negativo. As hemácias (10 mL) foram misturadas a 10 mL de solução Alsever e armazenadas a 4 °C por 24 h. Após centrifugação a 365 x g por 4 min e três lavagens em PBS pH 7,2, o sedimento foi ressuspenso em 20 mL de PBS pH 7,2, contendo 1% de ácido tânico, e incubado a 37 °C por 15 min, com agitação moderada. Depois de lavadas com PBS pH 7,2, as hemácias taninizadas foram centrifugadas a 365 x g por 4 min. Uma alíquota foi separada para ser usada com soros-controle, e outra, sensibilizada com o antígeno.

Os testes foram feitos em placas de microtitulação de fundo em “U” (TITERK). Aos poços, eram adicionados 50 µL de hemácias sensibilizadas

e 50 μ L dos soros em diferentes diluições (1:4 até 1:1024). Após incubação de 2 h a 37 °C, foram consideradas positivas as amostras em cujos poços (com título maior que 1:8) houve a formação de um tapete de hemácias, conseqüência da aglutinação. Nas amostras negativas, observou-se a formação de um botão de hemácias no fundo do poço.

3.3. Imunofluorescência Indireta

Epimastigotos cultivados em meio LIT foram centrifugados a 2000 x g por 10 min. O sedimento, lavado três vezes em PBS pH 7,2, foi ressuspenso em volume de PBS contendo formol a 2% (v/v). Após três lavagens com PBS, os parasitos formalizados foram ressuspenso em volume de água necessário para se obter uma concentração de 6 parasitos/ μ L. As lâminas receberam 5 μ L da mistura e, após secagem ao ar livre, foram embrulhadas com papel de alumínio forrado com lenço de papel e guardadas a -20°C.

Diluições seriadas dos soros em PBS pH 7,2 de 1:20 até 1:360 foram preparadas e 10 μ L de cada diluição foram colocados em cada divisão da lâmina de vidro. Após incubação por 30 min, a 37°C, e três lavagens com PBS, esperou-se as lâminas ficarem secas para se adicionar um conjugado de anti-IgG marcado com fluoresceína (Laborclin), diluído 1:100 em PBS. Seguiram-se, então, mais uma incubação por 30 min, a 37°C, e três lavagens com PBS. Depois de secas, as lâminas foram montadas com

glicerina tamponada pH 9,0 e analisadas em microscópio de fluorescência. Uma amostra era considerada positiva quando a silhueta do parasito aparecia fluorescente nos campos sob luz ultravioleta, em microscópio usando filtro de barreira e filtro excitado com comprimento de onda 495 nm. O resultado positivo era dado pela fluorescência verde-maçã obtida em diluições iguais ou maiores que 1:40.

4. Reação de Polimerização em cadeia (PCR)

Com o objetivo de amplificar o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* no DNA molde extraído das células nucleadas do sangue dos pacientes, foram utilizados quatro pares de *primers* diferentes. Os pares TCZ1/2 (Moser e cols, 1989) e PON1/2 (Requena e cols, 1992) amplificam regiões do nDNA do parasita, enquanto os *primers* S36/S35 e S34/S67 (Sturn e cols, 1989) amplificam seqüências dos minicírculos de kDNA. A Tabela 1 contém as seqüências de cada par de *primers*.

Os *primers* TCZ1/2 amplificam uma região de microssatélite, com repetições *in tandem*, que corresponde a 9% do DNA total do *T. cruzi* (Virreira e cols, 2003). Já o par PON1/2 amplifica uma seqüência repetitiva dispersa que representa cerca de 7% do DNA total do parasito, existindo $1-2 \times 10^4$ cópias desta seqüência por genoma (Requena e cols, 1992). Esses *primers* são específicos de *Trypanosoma cruzi*, não amplificando o DNA de outros tripanossomatídeos ou de humano. Os *primers* de kDNA foram

deduzidos a partir das regiões conservadas dos minicírculos de kDNA (Figura 5) e abrangem 25% do DNA total do parasita.

As amplificações foram realizadas em triplicada e seguiram as seguintes condições, previamente padronizadas: 200 ng de DNA humano foram utilizados como molde e os reagentes do kit de PCR da INVITROGEN: tampão de reação (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 9.0 e 2 mM de MgCl₂), 50 ng de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Foram incluídos em todas as reações os devidos controles, negativo e positivo, que consistiram, respectivamente, de DNA de indivíduo não infectado e de 250 pg de DNA de *T. cruzi* Berenice. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador modelo PTC-100 da MJ Research e seguiram o seguinte programa:

94°C / 5 min

32 ciclos { 94°C / 30 seg
 { T_m°C do *primer* / 1 min
 { 72°C / 1 min

72°C / 5 min

4°C ...

Tabela 1: *Primers* utilizados nas reações de PCR.

Primer	DNA a ser amplificado	Seqüências	Tm*
TCZ 1	nDNA	5'GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3'	67,6
TCZ 2	nDNA	5'CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3'	61,4
PON 1	nDNA	5'TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT3'	57,4
PON 2	nDNA	5'AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT3'	58,0
S 34	kDNA	5'ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'	57,9
S 67	kDNA	5'GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)T C 3'	60,1
S 35	kDNA	5'ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'	59,4
S 36	kDNA	5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'	57,9
L1-1	LINE	5'CTC CGG TCT ACA GTC CCC A3'	65,6
L1-2	LINE	5'TCC CAA GAC TAA ACC AGG A3'	62,9
L1-3	LINE	5' ATC ACA CTC TGG GGA CTG TG 3'	64,7
L1-4	LINE	5' CAC AGT CCC CAG AGT GTG AT 3'	59,9
L1-5	LINE	5' TCC TGG TTT AGT CTT GGG AG 3'	60,1
L1-6	LINE	5' TGG GAG CTG TAC ACC GGA G 3'	63,0

* Tm = temperatura média de anelamento em °C.

5. Amplificação das regiões flangeadoras do kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma humano

A técnica de *TAIL PCR* (Thermal Asymmetric Interlaced – PCR) foi modificada para se tentar obter as regiões do genoma humano que flanqueiam o kDNA integrado. Inicialmente descrita por Liu & Whittier (1995), esse procedimento alterna ciclos de baixa estríngência e alta estríngência e utiliza *primers* degenerados combinados com *primers* específicos. Dessa forma, enquanto as altas temperaturas favorecem o

anelamento apenas dos *primers* específicos, as baixas temperaturas permitem o anelamento de ambos.

No presente estudo, nós alteramos a *TAIL PCR* com base em dados anteriores que indicaram a ligação do kDNA a retroelementos LINE-1 (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006), e, assim, substituímos os *primers* degenerados por específicos. A metodologia, então, passou a ser chamada *psTAIL PCR* (*primer specific Thermal Asymmetric Interlaced – PCR*). Para isso, deduzimos *primers* de regiões conservadas de L1 de diversos organismos (Figura 5B), visando substituir os *primers* degenerados de Liu & Whittier, 1995. Assim, seguiu-se a primeira amplificação: utilizou-se 200 ng de DNA genômico em uma reação contendo 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 100 ng do *primer* de kDNA (S34 ou S67), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), juntamente com 10 ng de cada um dos *primers* de L1 usados neste estudo (Tabela 1). O programa utilizado na *psTAIL PCR*1 foi:

	94°C / 4 min
5 ciclos	{ 94°C / 30 seg 64°C / 1 min 72°C / 2 min
1 ciclo	{ 94°C / 30 seg 25°C / 2 min 72°C / 2 min
12 ciclos	{ 94°C / 30 seg 64°C / 1 min 72°C / 2 min 94°C / 30 seg 64°C / 1 min 72°C / 2 min 94°C / 30 seg 44°C / 1 min 72°C / 2 min 72°C / 7 min 4 °C.

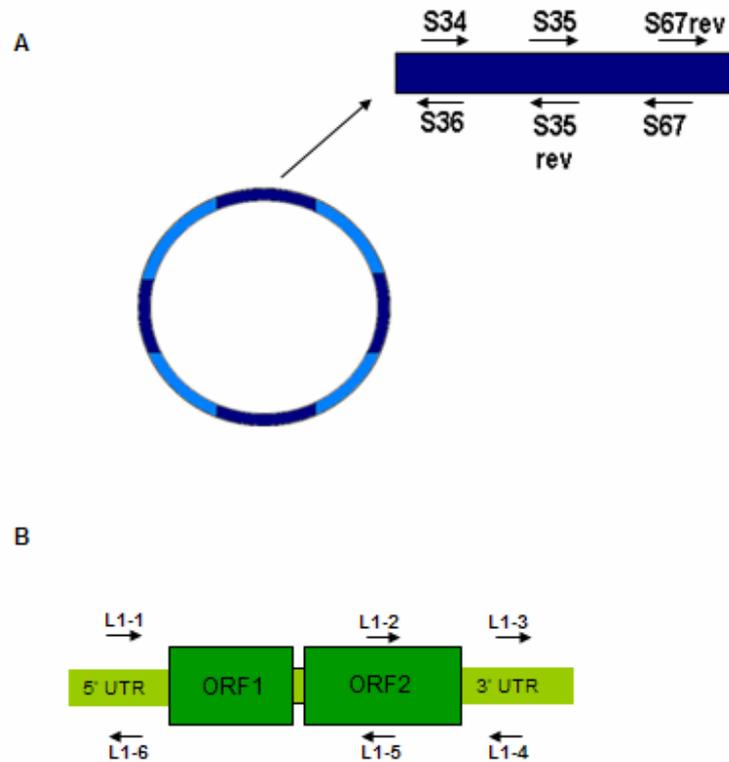


Figura 5: Regiões de dedução dos *primers* utilizados na *psTAIL* PCR. A) Estrutura do minicírculo de kDNA, composta por 4 regiões conservadas (azul escuro) e 4 regiões variáveis (azul claro). Em destaque, os *primers* deduzidos das fitas senso e anti-senso. B) Elemento LINE-1: seqüências bastante conservadas entre os diversos L1 de humano possibilitaram a construção de *primers* para as regiões 5'-UTR, 3'UTR e ORF2.

Para a segunda amplificação, foram utilizados 2 µL da diluição de 1:40 da *psTAIL* PCR 1, em uma reação contendo 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 100 ng do *primer* de kDNA mais interno (S35 ou S35 reverso), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), mantendo-se os mesmos *primers* de L1 utilizados na primeira amplificação (10 ng). O programa utilizado na *psTAIL* PCR 2 foi o seguinte:

	94°C / 4 min
12 ciclos	94°C / 30 seg
	64°C / 1 min
	72°C / 2 min
	94°C / 30 seg
	64°C / 1 min
	72°C / 2 min
	94°C / 30 seg
	45°C / 1 min
	72°C / 2 min
	72°C / 7 min
	4°C ...

Os produtos da *psTAIL* PCR 2 foram diluídos 1:10, e 2 µL da diluição foram utilizados como molde para a *psTAIL* PCR 3. A reação continha 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 100 ng do *primer* de kDNA mais interno (S67 reverso ou S36), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen) junto com 10 ng

dos mesmos *primers* de L1. O programa utilizado na *psTAIL* PCR 3 foi o seguinte:

94°C / 3 min
20 ciclos { 94°C / 30 seg
 45°C / 1 min
 72°C / 2 min
 72°C / 7 min
 4°C ...

6. Digestão Enzimática do DNA genômico

Para a digestão enzimática do DNA genômico, utilizamos a enzima de restrição *EcoRI* (Promega), pois ela é capaz de cortar o kDNA apenas uma única vez. Neste experimento, foram utilizados 50 µg de DNA genômico, 3 unidades de enzima por micrograma de DNA, 1/10V de tampão 10X e 1/100V de BSA. A digestão era realizada a 37°C por 12 h. Em seguida, o produto da digestão era precipitado com 2,5V de etanol absoluto gelado e 1/10V de acetato de sódio 3 M pH 4,7. Após 2 lavagens com etanol 70% gelado, o DNA era ressuspensão em 50 µL de água Milli-Q e guardado a -20°C.

7. Clonagem, transformação em *E. coli* competente e extração de DNA plasmidial

Os produtos da terceira *psTAIL* PCR foram clonados no vetor comercial pGEM T-Easy (PROMEGA) conforme instruções do fabricante. Esse vetor caracteriza-se pela presença de uma timina em ambas as extremidades 3'. Assim, a ligação dos produtos se faz possível, pois a Taq polimerase utilizada adiciona uma adenina na extremidade 3', permitindo o pareamento.

Para o procedimento de transformação, fez-se necessária a preparação de células competentes, a qual seguiu o protocolo de cloreto de rubídio descrito no *Protocols and Application Guide* da PROMEGA (1996). Diferentes linhagens de *E. coli* foram utilizadas durante os nossos experimentos: JM109 (Promega) e XL10-Gold (STRATAGENE).

Após a transformação, foi feita a seleção dos clones que contêm o inserto através da diferença de coloração das colônias. As colônias brancas são formadas quando o inserto é adicionado ao plasmídeo, havendo, assim, o rompimento do gene da β -galactosidase que, conseqüentemente, se torna incapaz de processar o substrato X-gal. Quando o inserto não se insere, o gene da β -galactosidase codifica a enzima que age sobre X-gal, formando a coloração azul das colônias. Além disso, o vetor pGEM T-Easy também possui o gene de resistência a ampicilina, o que garante que apenas as bactérias transformantes consigam crescer em meio contendo este antibiótico.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. A análise do tamanho dos insertos foi feita em gel de agarose 1%, na presença de marcador molecular, após digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição *EcoRI* (12 h, 37°C).

8. Southern Blot

8.1 Southern Blot dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e, posteriormente, utilizou-se o método de transferência alcalina (Sambrook & Russel, 2001) para transferir o DNA para uma membrana de nylon positivamente carregada (Hybond-XL – Amersham Pharmacia Biotech). Resumidamente, desnatura-se o DNA em solução alcalina (NaOH 0,4 M) por 20 min e, então, faz-se a transferência, por capilaridade, do DNA presente no gel para a membrana, utilizando a mesma solução alcalina. Após 8 h de transferência, as membranas eram secas em estufas a 37 °C para a fixação do DNA.

8.2 Southern Blot Genômico

Inicialmente, o DNA genômico digerido era separado em um gel de agarose 0,8% por cerca de 8 h a 4°C (~80 Volts). Com o término da

eletroforese, o gel era submetido por 30 min a uma solução de 0,25 M HCl para depurinação do DNA, seguido por duas lavagens com água destilada. Logo após, realizou-se o processo de desnaturação (0,4 M NaOH por 45 min) para, então, se iniciar a transferência do DNA para a membrana de nylon positivamente carregada. A partir desse ponto, o procedimento é idêntico ao realizado com os produtos de PCR, alterando-se apenas o período de transferência, que passa a ser de 24 h.

8.3 Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon

Os clones de bactérias transformantes foram repicados para uma membrana de nylon em contato com meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C por 12 h, as membranas eram retiradas e embebidas em papel de filtro contendo solução de lise (SDS 10%) por 10 min, seguida de solução de desnaturação (0,4 M NaOH) por 10 min, e, por último, SSC 2X por 10 min. As membranas foram secas em estufas a 37°C para a fixação do DNA.

9. Marcação de Sondas Radioativas

DNA mitocondrial de *T. cruzi* ou fragmentos de DNA resultantes da amplificação do DNA desse parasito com diferentes primers foram marcados radioativamente, utilizando-se o kit *Random Primer Labelling System* (Invitrogen). Essa técnica consiste em inserir um dATP radiomarcado [α - ^{32}P] na seqüência da fita de DNA molde, sintetizada pela enzima *Klenow* (atividade polimerásica) na presença de primers randômicos (hexaméricos). A reação foi realizada conforme instruções do fabricante: 30 ng de DNA (em um volume final de 25 μL) foram desnaturados a 100°C por 10 min e depois colocados no gelo. Foram adicionados 2 μL de dCTP, 2 μL de dGTP e 2 μL de dTTP; 15 μL de tampão, 3 μL de [α - ^{32}P] dATP (3000 μCi) e 1 μL de *Klenow*. Após um período de incubação de 3 h a temperatura ambiente, a reação foi parada com 5 μL do tampão de parada. A Tabela 2 contém as sondas utilizadas neste estudo.

9.1. Purificação de Sondas radioativas

As sondas radiomarcadas foram purificadas em coluna Sephadex G50 e lâ de vidro (Sambrook e cols, 1989). A incorporação radioativa foi confirmada através de cintilografia. As sondas foram usadas dentro dos limites de concentração de 1 a 2×10^6 cpm/mL de solução de hibridização e as atividades específicas foram iguais ou maiores que 10^8 cpm/ μg de DNA.

Tabela 2: Sondas radiomarcadas utilizadas na hibridização de membranas contendo DNAs específicos mobilizados.

Sonda	Descrição
	A) kDNA total extraído de <i>T. cruzi</i> (~1,4kb)
	B) Produto de PCR (~330pb) de <i>T. cruzi</i> amplificado pelos <i>primers</i> S35/S36 e purificado do gel de agarose com o auxílio do kit QIAEX II (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.
	C) Sonda consenso I: GAAGCCCCCTCCCAAACCAACAATTTTCGAATTCCACACCAACCTCCTAACCACCCATAA TACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAGAATATAAGTATAATCAGTACAATCATTATA TATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAATCAATAAACTCTACCCAACAACCTCCTAT ATCACACCAACCCCAATCGAACCTCACCTCCCGTAAACAACCCCATTTTCGGCCAAATA ATGTACGGGTGAGATGCATGATTTTTCGGGCCCAAATTTGAACGCCCTCCCAAGACTAA ACCAGGA
	D) Sonda consenso II: GAAGCCCCCTCCCAAACCAATATTTTCACGAATTTCCATACCTCATACTCCGTAACCATA ACACAAACACAATCATAACAACCCATTAACCAAATATATAAACTGTAATATAACTCTAAT TATACAAACTTAAACCACCTACCAAATGTAACCTCACACGATATAAACTCACATACATCA TCTTAAACATATTCAATAAGTTATATCACCAATATTCTACTAATCCACTAACCTCCTTAT ATTACACCAACCCCAACCGAACCC
TCZ	Produto de PCR (~188pb) de <i>T. cruzi</i> amplificado pelos <i>primers</i> TCZ1/2 e purificado do gel de agarose com o auxílio do kit QIAEX II (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.
PON	Produto de PCR (~250pb) de <i>T. cruzi</i> amplificado pelos <i>primers</i> PON1/2 e purificado do gel de agarose com o auxílio do kit QIAEX II (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.

10. Hibridização

As membranas com o DNA mobilizado foram bloqueadas por 12 h a 65°C com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 µg/mL de DNA de espermatozoides de salmão). Ao término desse período, as sondas radiomarcadas eram desnaturadas a 100°C por 5 min e adicionadas à solução de pré-hibridização, onde as membranas permaneciam por mais 12 h a 65°C. As lavagens das membranas foram realizadas com graus crescentes de estringência, visando a remoção da sonda que não se ligou adequadamente à membrana. Foram feitas duas lavagens com SSC-2X/0.1% SDS, a 65°C, por 15 min, seguidas de outras duas com SSC-0.1X/0.1% SDS, a 65°C, por 15 min. As membranas, ainda úmidas, eram revestidas em filme plástico de PVC e expostas em um cassete metálico com filme sensível a raios X (KODAK T-MAT), e incubadas a -80°C. O tempo de exposição variava de acordo com o DNA transferido para a membrana. Assim, aquelas contendo os produtos de PCR ou as colônias transformantes ficavam expostas entre 12 h e 7 dias. Já aquelas que continham o DNA genômico tinham um tempo de exposição de até 30 dias. Procedia-se, então, à revelação dos filmes.

11. Seqüenciamento dos clones e análise em banco de dados

O DNA extraído dos clones selecionados foi enviado para o seqüenciamento automático comercial (Genomic, SP), o qual utilizou os

primers T7 e Sp6 para a amplificação das seqüências. Para a análise das seqüências de DNA em banco de dados, utilizou-se o algoritmo BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov). Além disso, também foi feita a análise de formação de possíveis ORFs, utilizando-se o programa DNAMAN, com posterior busca em banco de dados através dos algoritmos BLASTx, BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html).

Nas buscas por BLASTn, utilizamos os seguintes parâmetros: Database – Others, Optimize for Somewhat similar sequences (blastn). Para os demais algoritmos, mantivemos os parâmetros padrões. Eram considerados significativos os resultados com *E-value* acima de $1,0e^{-3}$ e identidade superior a 60%.

IV. Resultados

1. Imunodiagnóstico

Exames ELISA, HI e IF foram empregados para identificação de anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi* no soro dos indivíduos da amostra. O diagnóstico da infecção era firmado pelos resultados de dois ou mais exames positivos entre os 3 testes realizados. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. No teste ELISA, feita a subtração da absorbância do branco, foram considerados positivos aqueles soros cujas absorbâncias mostravam-se 2 vezes maiores que a do controle negativo. Dessa forma, pudemos detectar que 26 pacientes apresentavam títulos de IgG específicos bastante aumentados. A HI mostrou-se menos sensível que o ELISA, indicando a presença de anticorpos em apenas 21 pacientes. Para esse teste, considerou-se resultado positivo a aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígenos pelo soro diluído 1: 16 ou acima. Para a IF, considerou-se como resultado positivo a presença de parasitos com coloração verde-maçã, após tratamento com soro na diluição 1:40 e acima. Utilizando esses critérios, identificamos 24 pacientes com resultados positivos para a infecção pelo *T. cruzi*. Desses, 20 pacientes tiveram resultados concordantes pelos três testes e quatro foram positivos apenas para ELISA e imunofluorescência. Destaca-se o fato de que apenas 12 pacientes sabiam ser portadores da Doença de Chagas.

Tabela 3: Diagnósticos imunológicos de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na amostragem analisada *.

ELISA	HI	IF	Positivos
26/123	21/123	24/123	24/123

*Número de pacientes com resultado positivo/ número total de pacientes.

2. Diagnóstico por PCR

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas visando identificar a presença de DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (kDNA) nas amostras estudadas. As reações foram repetidas três vezes com cada par de *primers*, necessárias para confirmação do diagnóstico de cada paciente.

As ampliações das seqüências de nDNA correspondem a regiões repetitivas presentes no genoma do parasita (Moser e cols, 1989; Virreira e cols, 2005). Os *primers* TCZ1/2 geraram fragmentos de 188pb e seus catâmeros. Os *primers* PON1/2 produziram seqüências de 250pb. Para confirmar a especificidade dos produtos de PCR, realizou-se a hibridização com sondas de TCZ e PON, respectivamente (Figura 6A e B). Com esses resultados, foi possível identificar os indivíduos que possuíam a infecção pelo *T. cruzi*. Essa análise revelou que o *primer* TCZ1/2 é mais sensível que o PON1/2, sendo capaz de identificar uma maior quantidade de amostras positivas (Tabela 4). Dos 123 pacientes estudados, 38

tiveram o DNA amplificado pelos *primers* TCZ1/2, enquanto apenas 33 amplificaram com PON1/2.

Para detectar a presença do kDNA, foram utilizados os *primers* S34/S67 e S35/S36, que amplificam, respectivamente, fragmentos de 122 pb e 330 pb e seus catâmeros (Figura 6C e D). O primeiro fragmento corresponde ao tamanho de uma região conservada completa do kDNA, enquanto o segundo, abrange as extremidades de duas regiões conservadas mais uma região variável inteira. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada por hibridização com a sonda B de kDNA (vide Materiais e Métodos). Verificamos que os dois pares utilizados foram capazes de amplificar o DNA mitocondrial em um número de amostras praticamente idêntico (Tabela 4).

Em resumo, nós assumimos que 38 pacientes são realmente chagásicos, pois tiveram seus DNAs amplificados com pelo menos um par de *primers* de nDNA e um de kDNA. De grande interesse foi a constatação que o DNA molde de 36 pacientes do estudo amplificaram apenas com os *primers* de kDNA. Esse dado sugeriu a possibilidade de transferência vertical do DNA mitocondrial do protozoário, pois a amplificação com nDNA não foi obtida nesses casos.

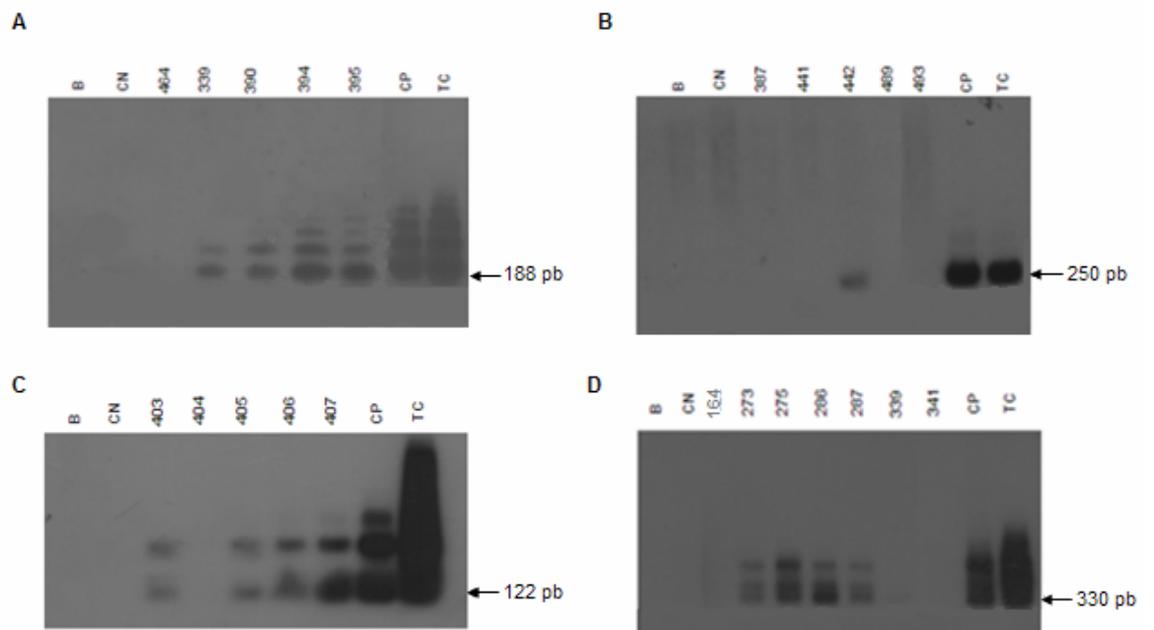


Figura 6: *Southern Blot* de produtos de nDNA e kDNA amplificados por PCR e hibridizados com sondas específicas. A) TCZ1/2. B) PON1/2. C) S34/S67. D) S35/S36. As siglas representam: B, branco; CN, controle negativo; CP, controle positivo; TC, *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 4: Amplificação de seqüências de minicírculos de kDNA e nDNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de chagásicos e seus descendentes*

TCZ1/2	PON1/2	S34/S67	S35/S36	Chagásicos
38/123	33/123	74/123	73/123	38/123

* Número de amostras amplificadas pelos *primers* específicos/ número total de pacientes.

3. Estudo das Famílias

Para uma melhor compreensão do significado dos resultados dos exames imunológicos e de PCR, nós fizemos o heredograma das cinco grandes famílias (Figuras 7 a 11) com os dados registrados cuidadosamente nos prontuários clínicos, revistos no momento da colheita de sangue.

Com base nesses resultados, verificamos que a família A é composta por 24 indivíduos, dos quais quatro têm a infecção chagásica ativa, na vigência de testes positivos com os primers de nDNA; onze indivíduos nessa família apresentaram apenas o teste positivo para o kDNA. Os parentais dessa família nasceram na zona rural e viveram em casas infestadas por barbeiros, porém desconheciam ser portadores das infecções pelo *T. cruzi*. Interessantemente, o parental 389 do sexo masculino tinha teste sorológico negativo, contrastando com os resultados de PCR positivos. Dos sete filhos deste casal, um faleceu de problemas cardíacos aos 32 anos, 3 apresentam PCRs positivas apenas para kDNA e outros 3 possuem resultados negativos em exames imunológicos e PCR. De grande importância, todos os cônjuges da geração G₁ são oriundos de zonas rurais, o que pode explicar o fato de dois deles serem portadores de infecções pelo *T. cruzi* e os demais (dois) apresentarem as PCRs com primers de kDNA positivas. Também podemos observar que os primers específicos usados na PCR amplificaram kDNA de *T. cruzi* em seis indivíduos da geração G₂.

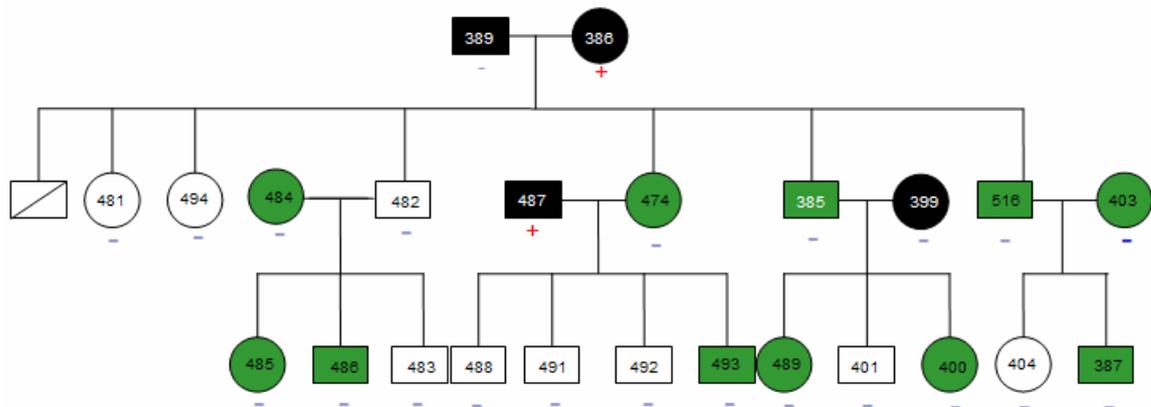


Figura 7: Heredograma da família A. Os parentais dessa família nasceram na área rural e, após 20 anos, mudaram-se para Brasília, onde nasceram seus filhos e netos. As cores utilizadas têm os seguintes significados: Branco: TCZ - / kDNA - . Preto: TCZ + / kDNA +. Verde: TCZ - / kDNA +. Os sinais + e - referem-se aos resultados obtidos pelos testes sorológicos. O retângulo com linha diagonal significa óbito.

O heredograma da família B (Figura 8) também mostra fundadores chagásicos que residiam em casas infestadas com barbeiros no interior de Minas Gerais. O paciente 393 tem sintomas e sinais clínicos da Doença e possui seis irmãos com problemas cardíacos, dois dos quais sucumbiram por esse mal. A paciente 406 tivera os exames sorológicos consistentemente negativos. Entretanto, os resultados desses exames diferem dos resultados positivos pela PCR. Os resultados da PCR foram positivos também em todos os filhos deste casal, cujos DNA molde amplificaram o kDNA mitocondrial. Além disso, o kDNA mitocondrial foi amplificado em 66% dos membros da terceira geração.

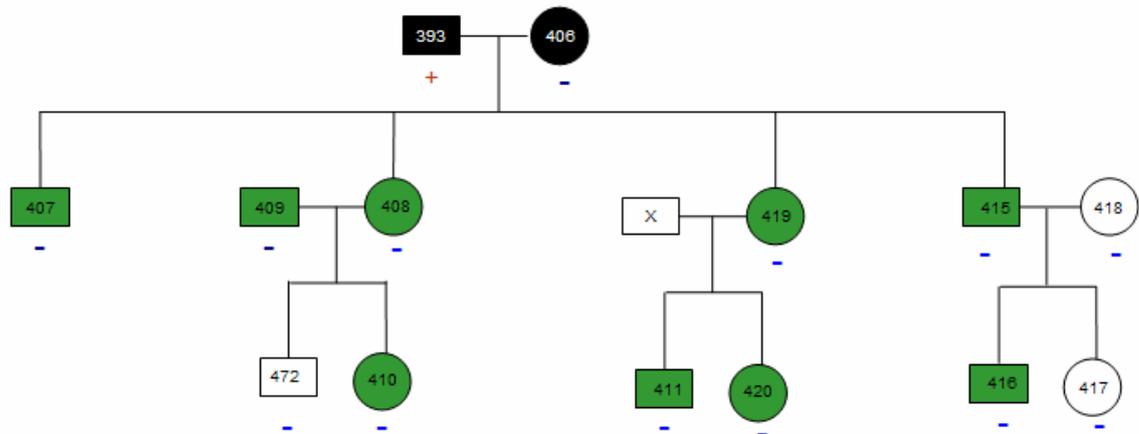


Figura 8: Heredograma da família B. Os parentais foram expostos aos insetos-vetores das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* e apresentam PCRs de nDNA e kDNA positivas (preto). As progêneses G₁ e G₂ jamais foram expostas aos triatomíneos, mas muitos apresentam testes de PCR positivos apenas com primers de kDNA (verde). Os sinais + e - referem-se aos resultados obtidos pelos testes imunológicos. (x) o DNA não foi obtido.

A peculiaridade da família C (Figura 9) é que apenas o patriarca 466 é realmente chagásico, diagnosticado pelos testes sorológicos e pelos marcadores genéticos da infecção pelo *T. cruzi*. Dois filhos e dois netos do casal fundador apresentam reações de PCR positivas apenas para kDNA, enquanto os demais componentes tiveram todos esses testes negativos.

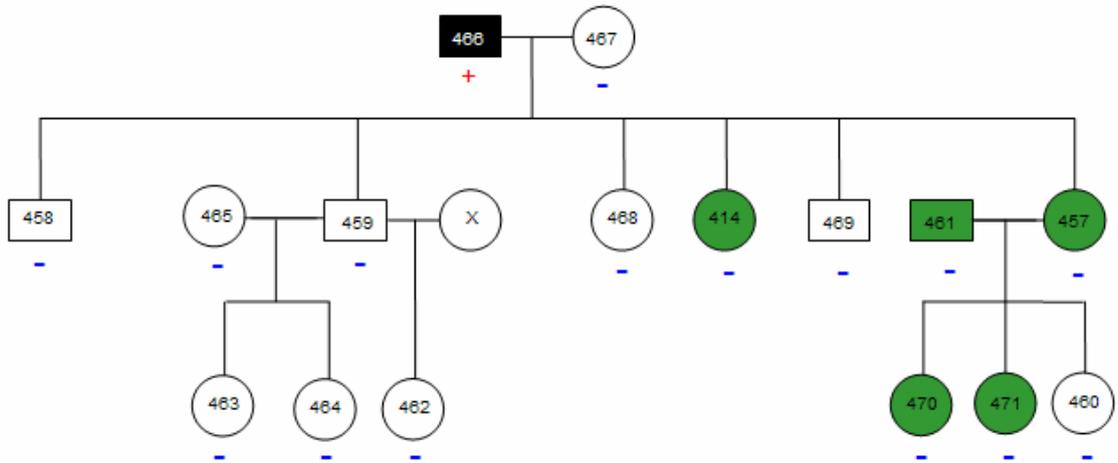


Figura 9: Heredograma da família C. Apenas o patriarca da família nasceu na zona rural, onde ficou exposto aos insetos-vetores. As progênes G₁ e G₂ jamais foram expostas aos triatomíneos. As cores utilizadas têm os seguintes significados: Branco: TCZ - / kDNA - . Preto: TCZ + / kDNA +. Verde: TCZ - / kDNA +. Os sinais + e - referem-se aos resultados de testes sorológicos positivos e negativos. (x) DNA não foi obtido.

Na família D, todos os indivíduos nasceram em meio rural e disseram notar a existência de barbeiros em suas casas. Nessa família, verificamos a infecção chagásica ativa (sugerida pela positividade da PCR de nDNA) em 50% dos indivíduos. Ainda verificamos progênes G₂ e G₃ com positividade apenas para o kDNA mitocondrial (Figura 10).

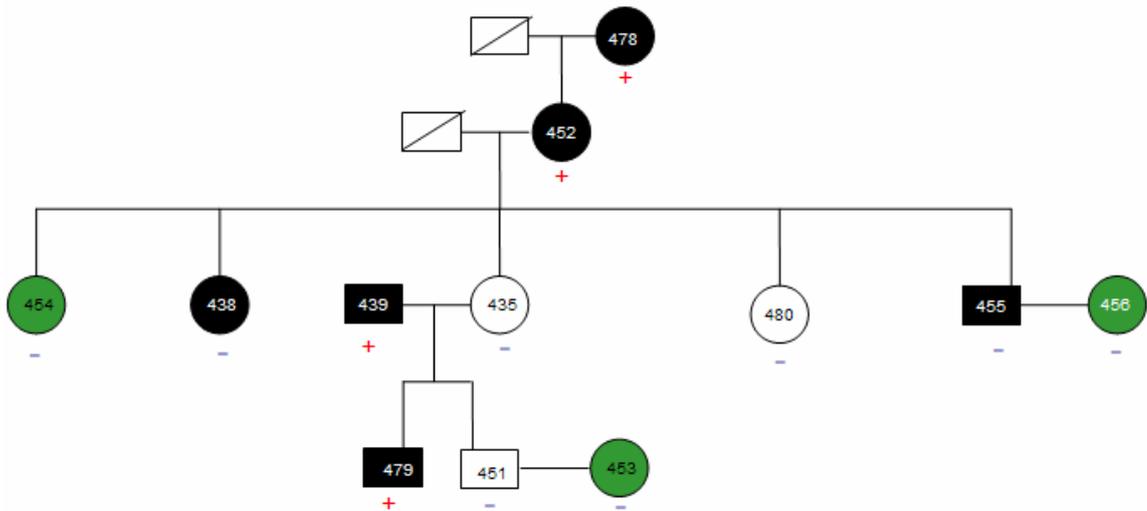


Figura 10: Heredograma da família D. Todos os membros desta família nasceram em área endêmica, onde foram expostos aos insetos transmissores do *Trypanosoma cruzi*. As cores utilizadas têm os seguintes significados: Branco: TCZ - / kDNA - . Preto: TCZ + / kDNA +. Verde: TCZ - / kDNA +. Os sinais + e - referem-se aos resultados obtidos pelos testes sorológicos. Os retângulos com linha diagonal significam óbito.

O heredograma da família E (Figura 11) inclui 19 pessoas que nasceram e residem em área endêmica. O paciente chagásico mais idoso (433) tem 61 anos, enquanto que o paciente chagásico mais jovem (442) tem 8 anos de idade. Isto sugere que a transmissão vetorial do *T. cruzi* está ativa, naquela região do Município de Bonfinópolis, Estado de Minas Gerais. Os pacientes 441 e 446 tiveram os testes imunológicos (IF, HI e ELISA) positivos enquanto que os testes de PCR foram positivos apenas com primers de kDNA. Diferentemente, o paciente 429 apresenta os testes imunológicos positivos e PCRs negativas com primers de nDNA e kDNA.

Esse último resultado pode ser considerado como reação cruzada inespecífica.

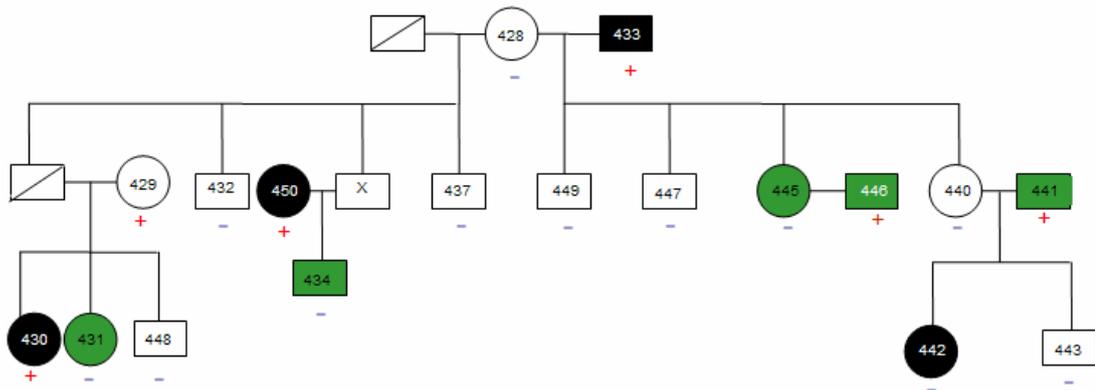


Figura 11: Heredograma da família E composta de indivíduos que nasceram e residem em área endêmica. As cores representam: Branco: TCZ - / kDNA -. Preto: TCZ + / kDNA +. Verde: TCZ - / kDNA +. Os sinais + e - referem-se aos resultados obtidos pelos testes sorológicos. Os retângulos com uma linha diagonal representam indivíduos já falecidos. [x] DNA não foi obtido.

A análise destas árvores filogenéticas revela cinco fundadores do sexo feminino e seis do sexo masculino. Os resultados mostram que 72,8% dos parentais daquelas famílias são chagásicos, pois apresentam positividade da PCR com *primers* de nDNA. Essa frequência caiu para a metade quando tomamos apenas os resultados dos exames imunológicos. Nas gerações subsequentes, a frequência de chagásicos (portadores da infecção ativa) diminuiu espetacularmente: apenas 15% da geração G₁ e 9% da geração G₂ eram chagásicos. Provavelmente, a queda na prevalência das infecções

chagásicas deve ser creditada ao sucesso do desalojamento do *T. infestans* domiciliado.

Nas cinco famílias estudadas, 45% dos descendentes tiveram seus DNAs amplificados apenas com *primers* de kDNA. Nesta coorte dos descendentes, predominam os indivíduos que nasceram em áreas urbanas, não receberam transfusão de sangue e nunca tiveram contato com o inseto vetor. Todos esses indivíduos (kDNA+) apresentam testes sorológicos e PCRs de nDNA negativos. No conjunto, os dados sugerem que o kDNA do *Trypanosoma cruzi* foi transferido dos parentais para a progênie, visto que a história epidemiológica exclui a possibilidade de transmissão vetorial da infecção na grande maioria dos casos.

4. Análise da integração de minicírculos de kDNA no genoma humano

Com o objetivo de investigar a transferência de minicírculos de kDNA para o genoma humano, utilizamos os procedimentos *psTAIL* PCR e *Southern Blot* genômico. No primeiro, foram utilizados *primers* de kDNA e de LINE-1 (vide Tabela 1, materiais e métodos) visando amplificar o sítio de justaposição desses dois elementos. No segundo, visou-se demonstrar bandas de integração do kDNA pela hibridização com sonda específica. A seguir, apresentamos os resultados desses procedimentos.

4. 1 *psTAIL* PCR (*primer specific* Thermal Asymmetric Interlaced – PCR)

Após analisarmos os dados apresentados nas árvores filogenéticas das famílias A a E, selecionamos alguns casos que tinham marcadores genéticos sugestivos da presença do DNA do protozoário. O DNA molde desses indivíduos foi submetido à *psTAIL* PCR. Também incluímos amostras de DNA de indivíduos que não pertenciam às grandes famílias do estudo, mas que procuraram o laboratório voluntariamente para fazer o estudo dos marcadores genéticos da infecção.

A *psTAIL* PCR consiste na amplificação de seqüências de DNA, a partir de DNA genômico, utilizando *primers* específicos de kDNA de *T.cruzi* juntamente com um *primer* específico de L1. As reações são feitas alternando ciclos de alta estringência com ciclos de baixa estringência. As reamplificações sucessivas dos produtos de PCR com *primers* de kDNA mais internos (*nested-PCR*) permitiu a eliminação dos produtos de baixa especificidade formados na primeira amplificação. Os produtos amplificados nas três reações foram submetidos à hibridização com sonda específica de kDNA, tornando possível identificar vários produtos de diferentes tamanhos contendo seqüências reconhecidas pela sonda (Figura 12).

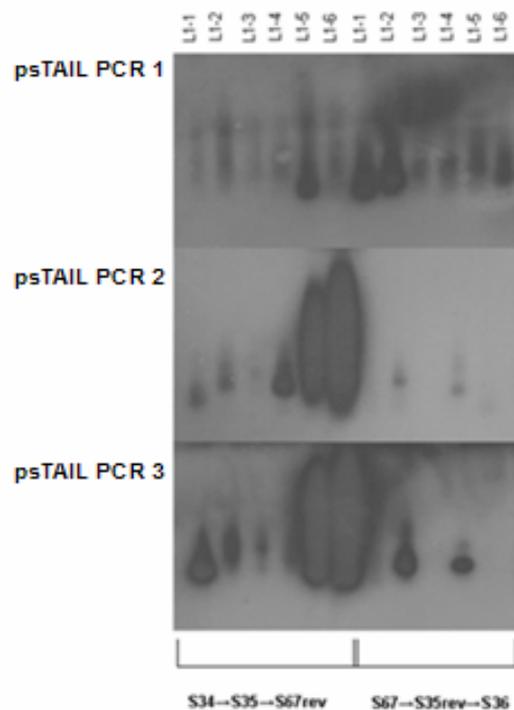


Figura 12: Hibridização dos produtos de *psTAIL* PCR do paciente 479 com sonda de kDNA. *psTAIL* PCR 1: as amostras foram amplificadas com os primers S34 ou S67 e um dos primers de L1 (1 a 6). *psTAIL* PCR 2: os produtos da 1ª reação eram diluídos 1:40 em água (v/v) e reamplificados com o primer seguinte de kDNA, combinado com o mesmo primer de L1 usado na reação anterior. *psTAIL* PCR 3: os produtos da 2ª reação foram diluídos em 1:10 em água.

Resumidamente, os produtos da terceira *psTAIL* PCR que apresentavam sinais mais intensos no *Southern Blot* foram clonados e seqüenciados. Analisou-se 400 desses clones, dos quais 2 apresentaram apenas o vetor, 11 não tiveram seqüenciamento com qualidade satisfatória, 17 apresentavam apenas DNA humano e 138 continham apenas o kDNA.

Afortunadamente, 232 clones seqüenciados tinham kDNA e regiões flanqueadoras do genoma hospedeiro. Com esse rendimento de 58%, a *psTAIL* PCR foi considerada satisfatória, haja vista que esse rendimento é similar ao obtido por outros autores (Sessions e cols, 2002; Michiels e cols, 2003; Settles e cols, 2004). O alinhamento daquelas 232 seqüências permitiu verificar que muitas já estavam contidas em outros clones. Como resultado desse pareamento, os 232 clones foram reduzidos a 128, os quais tinham origem em 44 pacientes. A análise desses clones está ilustrada na tabela do ANEXO II. Devido à grande dimensão do arquivo, as seqüências dos 128 clones foram disponibilizadas no nosso portal www.lmpdc.unb.br

No portal e no Anexo II, o leitor verificará que as seqüências geralmente são longas, pois encontramos até 660 nucleotídeos de minicírculos de kDNA (tamanho médio de 311 ± 117 nts) adentrando no genoma humano em até 1350 bases. Em vista das características das seqüências longas, obtivemos análises bioinformáticas acuradas. Essas análises revelaram identidades e *E-value* com valores altamente significativos (Anexo II). Por exemplo, seqüências de 28 clones tiveram o *E-value* igual à zero. As análises das seqüências daqueles 128 clones identificaram regiões de minicírculos de kDNA integrados no DNA humano, como exemplificado na Figura 13.

A)

S67 rev

```

1      GACGCCCTC CCAAAACAAT AATGTACGGG TGAGATGCAT GATTTTTTCGG CCATAAATTT
61     GAAGCCCCCT CCCAAACCA AATTTCAGG AATTTCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
121    ACACAAGCAC AATCATACAA CCCCTTAAC CAAATATATA AACTGTAATA TAACCTAAT
181    TAACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
241    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AATATTCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
301    ATTACACCAA CCCCAATCGA ACCTTAGAC TCACGCACAA ATCCACTGA GATCAGCAGA
361    GCCACCCTAG ATCAGCTGAA ACTCTAAGCA CAAAATAAAA AACTTATCAC TGTATACCAC
421    TGGAGITTTT TGGTTATCTC TCGTATAGCA AAATCTAACT GATGCAATCT CCATCTGGCC
481    TTCATCCTTC TCCCTTTTAT GTCCCTTCGT GTATTGTTCA TCCAGCAACC AGGATGATCT
541    TGTTAAAACA TTAACAGAT TCTGTCACTC TTCCTCAGCC CCCTGTGATG GTTTTCCAAT
601    GTGCTTCTGG AAAGAGCAA CATCCTTAAA AGGCTCAGTG TGGCGATTCC TCAAGGATCT
661    AGAACTAGAA ATACCATTTG ACCCAGTGAT CCCATTACTG GGTATATACC CAAAGGATTA
721    TAAATCACGC TACTATAAAG ACACATGCAC ACGTATGTTT ATTGTGGCAC TATTACAAT
781    AGCAAAGACT TGGACCRAAC CCAAAGTCC ATCAGTGATA GACTGGATTA AGAAAATGTG
841    GCACATATAC ACCATGGAAI ACTATGTAGC CACAAAAGG GATGAGAGTT CATGTCTTTT
901    GTAGGGACAT GGATGAAGCT GGAACCATC ATTCTGAGCA AGCTATCGCA AAGACAGAAA
961    ACCAAACACC ACATGTTCTC ACTCATAGGT GGGAAATTGAA TAATGAGAGC ACTTGGACAC
1021   CAGGCAGGA ACATCACACA CCGGCCTG TCGTGGGGTG TGAGGAGAGG GGAGGGACAG
1081   CATTAGGAGA AATACCTAAT ATAAATGATA AGTTAGTGGG TGCAGCACAC CAACATGGCA
1141   CATGTATACA TATGTAACAA ACCTGCACAT TGTGCACATG TACCCTAGGA CTTAAAGTAT
1201   AATTTTAAAA AAAAGAGAGG GAGGAGCCAA GATGGCCGAA TAGGAACAGC TCCGGTCTAC
1261   AGCTCCCA
      L1-6

```

B)

[gb|M18814.1|TRBKPMCAA](#) T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, cloneKY-3
 Expect = 2e-20, Identities = 232/331 (70%), Gaps = 37/331 (11%)

[gb|AC073647.9|](#) D Homo sapiens BAC clone RP11-707F14 from 7
 Expect = 0.0 Identities = 958/962 (99%), Gaps = 0/962 (0%)

Figura 13: Integração de seqüência de minicírculo de *Trypanosoma cruzi* no genoma do paciente número 474. A) Note que o DNA do parasito (azul) está ligado ao DNA humano (verde) no cromossomo 7. Em amarelo, destaca-se a região compartilhada entre o minicírculo de kDNA e o DNA humano. Os retângulos distinguem algumas regiões ricas em A e C. O kDNA em azul escuro representa região conservada e, em azul claro, a região variável. Os *primers* utilizados na terceira etapa da *psTAIL*-PCR estão sublinhados. B) Resultado obtido pela análise BLASTn. O alinhamento com seqüências depositadas em banco de dados está presente no Anexo III.

A integração de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* foi observada em todos os pacientes testados, o que incluía 14 indivíduos com infecção ativa e 30 descendentes G₁ e G₂ (40%), que tiveram apenas resultado positivo nas amplificações pela PCR com primers de kDNA, conforme mostram os heredogramas (Figuras de 7 a 11). Os resultados desses seqüenciamentos indicam que houve integração de kDNA no genoma de chagásicos parentais e sua herança vertical para as progênes. Na Tabela 5, relacionamos as cinco famílias estudadas com a ocorrência de eventos de integração nos diversos cromossomos. Nesta tabela, verifica-se que as integrações ocorreram em quase todos os cromossomos, excluindo-se apenas os cromossomos 17, 19 e 21. Ainda que não tenha sido possível determinar um padrão de integração preferencial nas famílias, nós notamos uma alta freqüência de integração no cromossomo X, presente em 74% dos chagásicos e seus descendentes G₁ e G₂.

A Figura 14 mostra um evento de integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no *locus* RP13-444K19 do cromossomo X, onde identificamos 93% das integrações desse cromossomo. A observação indica que este é um sítio preferencial de integração do kDNA em LINE-1 humano no cromossomo X. Entretanto, nós observamos que o kDNA entra naquele cromossomo em 7 pontos diferentes, ainda que a maior freqüência, vista em 51% dos clones examinados, tenha ocorrido na base 77.363 do RP13-444K19 ([emb|AL732374.14|](#)).

Tabela 5: Distribuição das integrações/mutações nos diversos cromossomos das famílias estudadas.

Cromossomo	Famílias					Total
	A	B	C	D	E	
1	3	4	2	0	0	9
2	2	2	0	0	1	5
3	3	0	0	0	0	3
4	0	4	0	0	0	4
5	1	2	0	0	1	4
6	1	1	0	0	1	3
7	7	0	2	2	0	11
8	3	0	0	0	1	4
9	1	0	0	1	0	1
10	0	3	1	1	2	7
11	2	0	0	0	1	3
12	2	1	0	1	1	5
13	0	1	0	0	0	1
14	2	1	1	0	1	5
15	2	0	0	0	0	2
16	1	0	0	0	0	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	1
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	1	1
X	20	7	5	3	4	39
Y	0	0	1	0	0	1
TOTAL	51	26	12	8	14	111

A)

```

                                67 rev
1   GAAACTAAAC CAGGAACCCC AATTCCAACC AACATTCAAC ACAACAACCC CATACTTAC
61  CTACAATAAG ATTATAATAT TGAACTTACA CTAACTATAC AACATTAAAC AATCATCATC
121 ACCTCATTTA TCATCATCAC TGTATACTAA CTATATATCA CTATCACCTC AGTACATAAC
181 CACAAATATA AAAACTATAA ATACATTAAA AACTGTATCT CTACCCACAG CCCTTATATT
241 ACACCAACCC CAATCGAACC TCACCTCCCG TAAACAACCC CCATTTTCGG CCATATAATG
301 TACGGGTGAG ATGCATGATT TTTCGGGCCC AAATTTGAAC CCGCTCCA AGACTAAACC
361 AGGAGGAAGT TGAGTCTCTG AATAGACCAA TAACAGGCTC TGATACACAT ACACCCTCCC
421 AAGACTAAAC CAGGAAGAAG TTGAATCTCT GAATAGACCA ATAACAGGCT CTGATACACA
481 TACACCCTCC CAGACTAAA CCAGGA
                                L1-5
```

B)

[gb|EU088388.1|](#) Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone A8
Expect = 2e-121, Identities = 241/245 (98%), Gaps = 0/245 (0%)

[emb|AL732374.14|](#) **D** Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on X
Expect = 1e-52, Identities = 127/132 (96%), Gaps = 0/132 (0%)

Figura 14: Sítio preferencial de integração do kDNA no cromossomo X. A) clone 175 do paciente 386 ilustrando a entrada do kDNA (azul) no *locus* RP13-444K19 do retrotransposon LINE-1 (verde). Os primers utilizados na terceira *psTAIL* PCR encontram-se sublinhados. B) Resultados da análise BLASTn. Os alinhamentos com as seqüências depositadas em banco de dados estão representados no Anexo III.

4.1.1 Características das seqüências flanqueadoras do hospedeiro humano

Tendo analisado a distribuição dos eventos de integração do kDNA do *T. cruzi* nos diversos cromossomos, decidimos analisar detalhadamente as regiões que flanqueavam o kDNA integrado em sítios específicos do genoma humano. Nesta análise, verificamos que a integração ocorreu, predominantemente, em retrotransposons LINE, em 71% dos clones seqüenciados (Figura 15). Verificamos também que seqüências de

minicírculos de kDNA ligaram-se em retrotransposons não-autônomos Alu, ERV, MER, MIR e MaLR. Interessantemente, esses elementos sempre estavam próximos de retrotransposons LINE, diretamente ligados ou situados numa distância nunca maior que 5 kb. Em três clones (274, 302,126), o kDNA foi visto associado ao gene de receptor olfatório OR1-17. No caso dos clones (160, 239, 264), observa-se o kDNA junto aos genes ADAM 23 (*a desintegrin and metalloproteinase domain 23*), TRIM69 (*tripartite motif protein 69*) ou theta 14-3-3 (*tyrosine 3/tryptophan 5 - monooxygenase activation protein*). Em 16 clones, o *locus* onde o kDNA integrou não pôde ser caracterizado, devido à ausência de informações sobre a região no banco de dados. Não obstante, esses *loci* apresentavam *E-value* e identidades significativos com cromossomos humanos. Esses casos aparecem com *locus* indeterminado na tabela do ANEXO II.

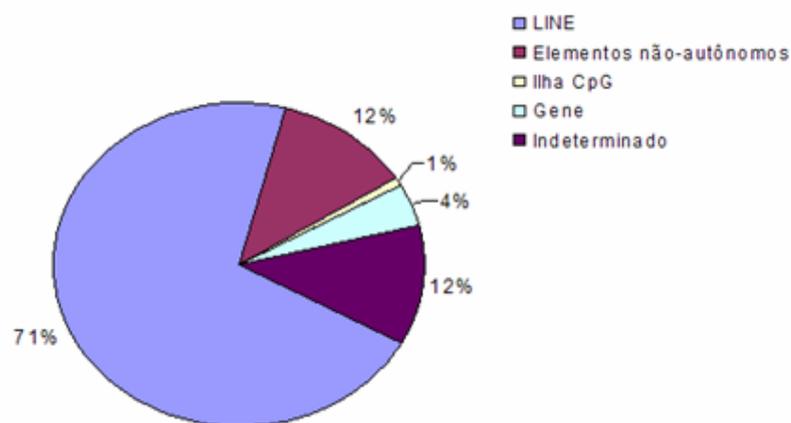


Figura 15: Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano.

De grande importância, observa-se que, em todos os clones, existe o compartilhamento de nucleotídeos entre a seqüências de kDNA e a seqüência flanqueadora humana (micro-homologias), cujo tamanho alcança até 32 pb (Figura 13, ANEXO II). Em 81% dos casos, as micro-homologias são seqüências ricas em AC, como já descrito no trabalho de Nitz e cols, (2004). Essas micro-homologias poluem as seqüências de minicírculos de kDNA e de retroelementos LINEs e SINEs à exaustão, como visto em vários de nossos clones e no trabalho prévio do nosso laboratório (Simões-Barbosa e cols, 2006).

Em alguns clones, um único primer de kDNA foi capaz de se ligar, especificamente, nas extremidades 5' e 3', possibilitando a obtenção de seqüências onde o DNA humano aparece flanqueado pelo kDNA nas duas extremidades, como pode ser observado na Figura 16. A interpretação desse evento sugere que teria havido duas integrações de kDNA separadas por 429 nucleotídeos em retrotransposon do genoma hospedeiro. Chamamos atenção para o fato de que a análise de homologia com a seqüência de kDNA revelou *E-value* significativos para os fragmentos da região conservada, porém não encontramos homologia significativa para a região variável com 191 nucleotídeos (Anexo III).

A)

```

          S67 rev
1  GAAGGCCCT CCCAAAACCA AAATTTCCAC AAATTTCTGA TACGTCTCAC CACCAGTATA
61 ACCTTATTCA ACAAATAATA TACAACAAAT AACATTCAAT GAATCAACAT TATTATCAAA
121 CTCTCACAAC TTTCATCTTT GTCATCTTAC ACCGTCACAT AACCACCATA CTGTATACAC
181 ATAGTCACTA AGTACTTTAT ACCGGCTCAC ATCTTCCCTA TATTACACCA ACCCCAATCG
241 AACCAAATCA AAAGTAAAGT TGGACAAATA ATGCAAATGA CTTAATTTAT GGTAGAATGA
301 AATTATTTTA TCAAAATTTG TTCTAGCTCA GCTGTAATTA TTTTACCTAA TACGATCAGC
361 AAGGAAATAA AATGTGCTGG GGACCCTATT TATGTAATAT GTCATTACAT TTCTATCCCA
421 AGAAAATTTT AGAGATGGAA ACTCACAAAT ATTTAAGGA GTTAAATCTC CCTAGCAAGT
481 AAAAAAGCTT CTTCTGTTTC TTTTAGAAAT AATTTCCCTG CTTCTTTATT TTATCCTTTG
541 GTTCAATGT TTTCTGGTTA TAGCTGATGT CAAGGTTGGC ACTAATTGAT GATAAAGGAA
601 CATTTTTAAA CAGCAAGGAA AACACATTCT AAAGATGCTT TATAGCTTTC AGTAATCTAA
661 TTTGTGGGGA CTGTAGACCG GAGAGGGGTT CAACTTTTGG GGTGGAAATT CATGCATCTC
721 ACCCGTACAT TATGGTTTTG GGAGGGGCGT TC
          S67 rev
```

B)

[gb|EU088390.1](#) Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone C5
Expect = 9e-10; Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)

[gb|AC002433.2](#)  Homo sapiens BAC clone CTA-317M2 from 7
Expect = 0.0, Identities = 450/459 (98%), Gaps = 2/459 (0%)

Figura 16: Região do genoma de paciente chagásico entre dois eventos de integração de minicírculo de kDNA do *Trypanosoma cruzi*. A) Paciente 386, clone 154. Seqüências de kDNA (azul) à montante e à jusante da seqüência de DNA humano (verde) na região CTA-317M2 do cromossomo 7 (*E-value* = 0). Note compartilhamento de nucleotídeos (amarelo) na justaposição do kDNA e do DNA humano. B) Resultados da análise BLASTn. O alinhamento com seqüências depositadas em banco de dados pode ser encontrado no Anexo III.

Assume importância especial o registro de integração do kDNA no genoma da paciente chagásica 1287, incluída no trabalho de Nitz e cols (2004), porque o seqüenciamento do clone 87 dessa paciente mostra minicírculos de kDNA de *T. cruzi* flanqueando LINE-1 dos cromossomos 10 e 14 (Figura 17). Como as seqüências de kDNA encontram-se em

orientações opostas, esse acontecimento poderia ser o resultado de translocação entre esses cromossomos, como verificado por Choi e cols (2007) em seus estudos de integração de T-DNA no genoma de *Magnaporthe oryzae*. Outra possível interpretação para esse achado é de que ele seria decorrente de mutações no genoma da paciente 287, cuja placa molde modificada não alinha perfeitamente com aquela do genoma haplóide depositado em banco de dados.

A) S67 rev

1	AACGCCCTC	CCAAAACCAA	AATTTCTGTA	ATTTTTAAAC	CTCCAAAATA	GTAAACCAAC
61	CAAGGATACA	ACCACCACTA	CAAAACACCA	GAATTATATT	TACAGCAATA	ATCAGAACAA
121	CATAGTAGTA	ATAAATTTCT	TATACATAGA	CACACGAACT	ATCCTCTTGT	ATGTTTACAT
181	GCATCATCAA	TATAATAACC	ACAAACTAAT	CACAAACTAC	TCATTATAAT	TTCTAACACC
241	CCACCAAACCT	CTCTATATTA	CACCAACCCC	AATCGAACCA	ACATTGATTA	AAGAGTTAAA
301	TCTAAGACCC	AAAACCTATGA	AACTACTAGA	AGAAAACATT	GGGGAAACAC	TCCATGACAT
361	TTATCTGGGC	AAACTTTTTT	GTGCAAAATG	TCAAAAGCAT	ACTCAACCAA	AACAAAAATA
421	GACAAATGGA	ATTATATCAA	GTTACAAAGC	TTCCGGGGGA	GCAGCCAAGA	TGGCCGAATA
481	GGAACAGCTC	CGGTCTACAG	CTCCCATCAA	AGTTCTTTTA	AATAATGAAC	CTCCTTAGTG
541	CATTTC AAGT	AGGGTT CGAT	TGGGGTTGGT	GTAATATAGG	ATGTGTAGAT	TTAGGATACA
601	TTTAGAATTA	AGTTTGAAGT	TTATTTGTAT	TATAGAACAT	GTGAAGAGAA	CGGTACGACA
661	TGGTGTAGTG	GATAGTTCTG	TAGATTTGTA	TGTTTCAATT	TGTTAGATTA	TATATTCTAT
721	TTATGTATAC	CTATGTGTTA	ATGGGTATGG	TGAAGGTTGT	GGGTGTTAGA	TTGTGGGTGT
781	AATCCTGTAA	AATTTGGTAC	CTGAAAATTA	CGAAAATTTG	GTTTTGGGAG	GGGCCGTC

S67 rev

B)

[emb|AL049875.2|CNS00000](#) **D** Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-111A21 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens
Expect = 5e-109; Identities = 227/230 (98%), Gaps = 0/230 (0%)

[emb|AL450466.8](#) **D** Human DNA sequence from clone RP11-315M8 on chromosome 10 Contains a CpG island.
Expect = 4e-19; Identities = 58/60 (96%), Gaps = 0/60 (0%)

[gb|AF114153.1|AF114153](#) Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA
Expect = 1e-14; Identities = 38/38 (100%), Gaps = 0/38 (0%)

Figura 17: Seqüências de minicírculo de kDNA ligadas a DNA humano de diferentes cromossomos. A) Paciente 1287, clone 87. Observa-se seqüências de kDNA (azul) flanqueando região de DNA humano oriunda dos cromossomos 14 (verde) e 10 (magenta). B) Resultados da análise BLASTn. O alinhamento com seqüências depositadas em banco de dados pode ser encontrado no Anexo III.

Outro aspecto inusitado da investigação foi revelado no genoma do paciente 493 (família A, geração G₂), onde se identificou elemento não-autônomo *Alu* ligado em seqüência de kDNA que interrompe a ORF do gene theta 14-3-3 (Figura 18). Análise bioinformática revela que o gene theta 14-3-3 tem homologia significativa com elementos transponíveis de varios organismos, desde bactérias e plantas até primatas, com 99% de identidade e *E-value* = 0. Em vista disso, não se descarta a possibilidade de que aquela seqüência do DNA hospedeiro seja, na realidade, um retrotransposon sem identificação reconhecida. Em favor dessa interpretação, verificamos a presença de duplicações diretas nas extremidades 5' e 3' do DNA do hospedeiro flanqueado pelo kDNA.

A)

```

L1-3
1      AICACACTCT GGGGACTIGG GTGGGTCGG GGGAGGGGGG AGGGATAGCA TTGGGAGATA
61     TACCTAAATG TAGATGACGC GTTAGTGGGT GCAGCGCACC AGCATGGCAC AIGTATACAT
121    AITGTAACATA CCTGCACAAT GTGCACATGT ACCCTAAACC TTAAAGTATA AAAAAAAAAA
181    AAGTAAAAAA AAAAAAATAT GATGTAATAA CCCAATATAT TATCTGTTCT ACCCAAGTCA
241    TCTCTACCAT AATTATGAAA TGTGAACGCC CCTCCAAAA CCACAAITTC CGAATCTTCC
301    AACCCCAAAAT TAAGCCCTGAG AGATCCCCCTC ATAAITTTCC CAAAGCGTAA CCATGTGTGA
361    ATAAATTTTG AGCTAGTAGG GTTGCAGCCA CGAGTAAGTC TTCCCTTGTT ATTGTGTAGC
421    CAGAAATGCC CAAAACITCC ATGCCTAAGC GAACGTGTGA GAGTACGTTT CGATTTCTGA
481    CTGTGTTAGC CTGGAAGTGC TTGTCCCAAC CTTGTTTCTG AGCATGAACG CCCGCRAGCC
541    AACATGTTAG TTGAAGCATC AGGGCGATTA GCAGCATGAT ATCAAAACGC TCTGAGCTGC
601    TCGTTCGGCT AIGGCGTACG CCTAGTCCGT AGGCAGGACT TTTCAAGTCT CGGAAGGTTT
661    CTTCAATCTG CAITTCGCTTC GAAATAGATA TTAACAAGT TTTGGGTGT TCGAATTTCA
721    ACAGGTAAGT TAGTTGCTAG AATCCATGGC TCCTTTGCCG ACGCTGAGTA GATTTTAGGT
781    GACGGGTGGT GACAATGAGT CCGTGTCCAG CGCTGATTTT TTCGGCCTTT AGAGCGGAGT
841    TTATACAATA GAATTTGGCA TGAGATTGGA TTGCTTTTAG TCAGCCTCTT ATAGCCTAAA
901    GTCTTTGAGT GACTAGATGA CATATCATGT AAGTTGCTGA TAGGTTTCCA GTTTTCCGCT
961    CCTAGGTCG CTATTTGATC TTTTCCCTCT ACTCGACTTA ACCAGTACCA ACCCAGCTTC
1021   TCAACGGATT TATACCATGG CACTTTTAAAG CCAGCATCAC TGACAAITGAG CGGTGTGGTG
1081   TTACTCGGTA GAATGCTCGC AAGGTCGGCT AGAAATGGT CATGAGCTTT CTTTGAACAT
1141   TGCTCTGAAA GCGGGAACGC TTTCTCATAA AGAGTAACAG AACGACCGTG TAGTGGGACT
1201   GAAGCTCGCA ATACCAATAAG CCGTTTTTGC TCACGGATAT CAGACCAGTC AACAAATACA
1261   ATGGGCATCG TATTGCCCGA ACAGATAAAG CTAGCATGCC AACGGTATAC AGCGAGTCCG
1321   TCTTTGTGGA GGTGACGATT ACCTAACAAAT CCGTCCGATT GTTTGATGTT ATGTTTTGTT
1381   CTCGCTTTGG TTGGCAGGTT ACGGCCAAGT TCGGTAAGAG TGAGAGITTT ACAGTCAAGT
1441   AAGGCGTGGC AAGCCAACGT TAAGCTGT TG AGTCGTTTTA AGTGTAAATC GGGGCGAAT
1501   TGGTAAAGAG AGTCGTGTAA AATATCGAGT TCGCACATTT TGTGTCTGA TTATTTGATT
1561   TTGGCGAAAC CATTGTATCA TATGACAAGA TGTGTATCTA CCTTAACTTA ATGATTTTGA
1621   TAAAAATCAT TAGGGGATTC ATCAGTAAATTAAGCTGACC AACCCAAATCC CAACCCCACT
1681   ACCAACTATT TTATAAAATT ATATACAGTA TACATTAGTA CTCAACACAT AATACTTCT
1741   CATACACGAA CAACACTTT ATCTTCTTGT ATATCGTTAA CTGTACACACA TATACTGAAC
1801   ACATACTAGT TTAACATCAT CCATCACAGT TATAAATACA TCTCCTTAAA CCACCCCTCA
1861   TATTACACCA ACCCCAAATCG AACCAATCAC ACTCTGGGGA CTGTGGACCG GAGATAATGT
1921   ACGGGTGA GA TGC

```

535

B)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AC202726.6	Macaca mulatta BAC CH250-361C3 () complete sequence	2390	2390	98%	0.0	99%
AC169515.3	Medicago truncatula chromosome 7 BAC clone mth2-62p5, complete :	2390	2390	98%	0.0	99%
AY345595.2	Bacteroides uniformis strain WH207 transposon CTnBST, complete se	2390	2390	98%	0.0	99%
BC004131.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3504703, **** WARNING: chimeric	2390	2390	98%	0.0	99%
AY751453.1	Medicago truncatula HP (HP) gene, partial cds	2390	2390	98%	0.0	99%
AK132649.1	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched libra	2390	2390	98%	0.0	99%
BC001197.1	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygen:	2390	2390	98%	0.0	99%
AL117609.1	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564O0463 (from clone DKFZp564C	2390	2390	98%	0.0	99%
AC084650.1	Caenorhabditis briaqsaee cosmid G45N14, complete sequence	2390	2390	98%	0.0	99%
AC084616.1	Caenorhabditis briaqsaee cosmid G44F16, complete sequence	2390	2390	98%	0.0	99%
AF240619.1	Homo sapiens clone 9qtel 2241draft c sequence	2390	2390	98%	0.0	99%
AC155895.2	Medicago truncatula chromosome 2 clone mth2-82i6, complete sequen	2390	2390	98%	0.0	99%
AK287980.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA, clone: J075083D24, full	2388	2388	98%	0.0	99%
CP000720.1	Yersinia pseudotuberculosis IP 31758, complete genome	2388	2388	99%	0.0	99%
AC189714.12	Canis Familiaris chromosome 37, clone XX-415O15, complete sequen	2388	2388	98%	0.0	99%
DQ682922.1	Shewanella putrefaciens 200 ribosomal protein S8 (rpsH), ribosomal c	2388	2388	98%	0.0	99%
BC013022.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3354425, **** WARNING: chimeric	2388	2388	98%	0.0	99%
AC006650.1	Caenorhabditis elegans fosmid H05L03, complete sequence	2388	4776	98%	0.0	99%
CT025605.11	Mouse DNA sequence from clone RP23-259D11 on chromosome 13, c	2388	2388	98%	0.0	99%
AP008209.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 3	2388	9462	98%	0.0	99%
AB128049.1	Macaca mulatta genes, MHC class I region, partial and complete cds	2388	2388	98%	0.0	99%
BC015595.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4647608, **** WARNING: chimeric	2388	2388	98%	0.0	99%
S67119.1	BST=somatotropin...BST/beta-Gal fusion protein [Escherichia coli, LB]	2388	2388	98%	0.0	99%
AC084641.1	Caenorhabditis briaqsaee cosmid G45J09, complete sequence	2388	2388	98%	0.0	99%
AC084670.1	Caenorhabditis briaqsaee cosmid G47G21, complete sequence	2388	2388	98%	0.0	99%
AC215451.1	Solanum lycopersicum Tomato chromosome 2, C02SLe0031D11, com	2387	2387	98%	0.0	99%
EU124739.1	Solanum lycopersicum chromosome 3 clone C03HBa0233O20, comple	2387	2387	98%	0.0	99%
CU313307.6	Pig DNA sequence from clone CH242-264E8 on chromosome 7, compl	2387	2387	98%	0.0	99%
EF625817.1	Carica papaya clone MSY BAC PH41F24 complete sequence	2387	2387	98%	0.0	99%
AC161407.5	Medicago truncatula chromosome 2 BAC clone mth2-9c15, complete s	2387	2387	98%	0.0	99%
NW_001594213.1	Aspergillus niger CBS 513.88 contig An09c0100, complete genome >ε	2387	2387	98%	0.0	99%

Figura 18: Integração de seqüência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do paciente 493. A) Seqüência de kDNA (azul) ligada a elemento *Alu* (magenta) e ao gene theta 14-3-3 (verde) que também apresenta homologia significativa com LINE-1. Veja as regiões repetidas, direta e invertida (sublinhadas), nas extremidades 5' e 3' que caracteriza LINE-1. B) BLASTn mostrando *E-value* = 0 para diferentes organismos.

4.1.2 Estrutura das seqüências de minicírculos de kDNA consensos I e II

Inicialmente, a análise dos resultados focalizou, principalmente, as seqüências de DNA do genoma humano em justaposição ao kDNA. A seguir, passamos a analisar detalhadamente as seqüências dos minicírculos de kDNA do *T. cruzi* ligadas ao DNA hospedeiro. A partir dos alinhamentos dos diversos fragmentos de kDNA que aparecem nos eventos de integração, identificamos duas seqüências de minicírculos que aparecem freqüentemente nos clones originados de pacientes chagásicos ou de suas progênes (Figuras 19 e 20). A seqüência consenso I foi encontrada em 4 membros da família C (470, 471, 461 e 414) e em 3 pacientes (129, 1287 e 1288) que constam na publicação de Nitz e cols (2004). A seqüência consenso II foi identificada em dez indivíduos das famílias A, B, D e E, e no paciente 1287 que está citado na publicação de Nitz e cols (2004). Além dessas duas seqüências consensos, que se repetiram em vários casos, encontramos diversas seqüências de minicírculos de kDNA com diferenças estruturais marcantes nas regiões variáveis, as quais não puderam ser alinhadas entre si.

A)

```
1 90
Clone 74 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCCTACCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 107 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCACCCCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 112 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCACCCCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 117 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCCTACCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 128 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCACCCCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 146 .GACGCCCCTCCCAAAATTCGATTTCGAATTCGACCCACCCCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Clone 169 .GACGCCCCTCCCAAAACCGACGATTTCGAATTCGACCCACCCCTCTTACCACCCATAATACACCACAACCCCTACCATACAAATTCAG
Consensus a ccctcccaaaa a atttcgaattcc a tta ccaccataatacaccacaacccctaccatacaaaattcag

91 180
Clone 74 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 107 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 112 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 117 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 128 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 146 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Clone 169 AATATAAGTATAATCAGTAAATCGTTATATATCAACTTTAACTTCACACTATTAATCATACTCCTATCACTATAGTTATCTCTTACTCT
Consensus aatataagtataatcagtaa atc tta tatcaactttaacttcacactattaatcatactcctatcactatagttatctcttactct

181 270
Clone 74 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 107 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 112 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 117 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 128 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 146 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Clone 169 CATCAATATACCCAATACCTAAACCATTAAATCAATAAACTCTACCCAACACCTCCTATATTACCCAACCCCAATCGACCTCACCTC
Consensus catcaatatacccaataccctaaaccattaaatcaataaaactctacccaacaacctcctatattacccaaccccaatcg acc

271 360
Clone 74 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Clone 107 .....
Clone 112 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Clone 117 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Clone 128 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Clone 146 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Clone 169 CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
Consensus CCGTAAACAACCCCAATTTTCGGCCATATAATGTACGGGTGAGATGCAIGATTTTTTCGGGCCAAATTTGAACACCCCTCCCAAGACTAA
```

B)

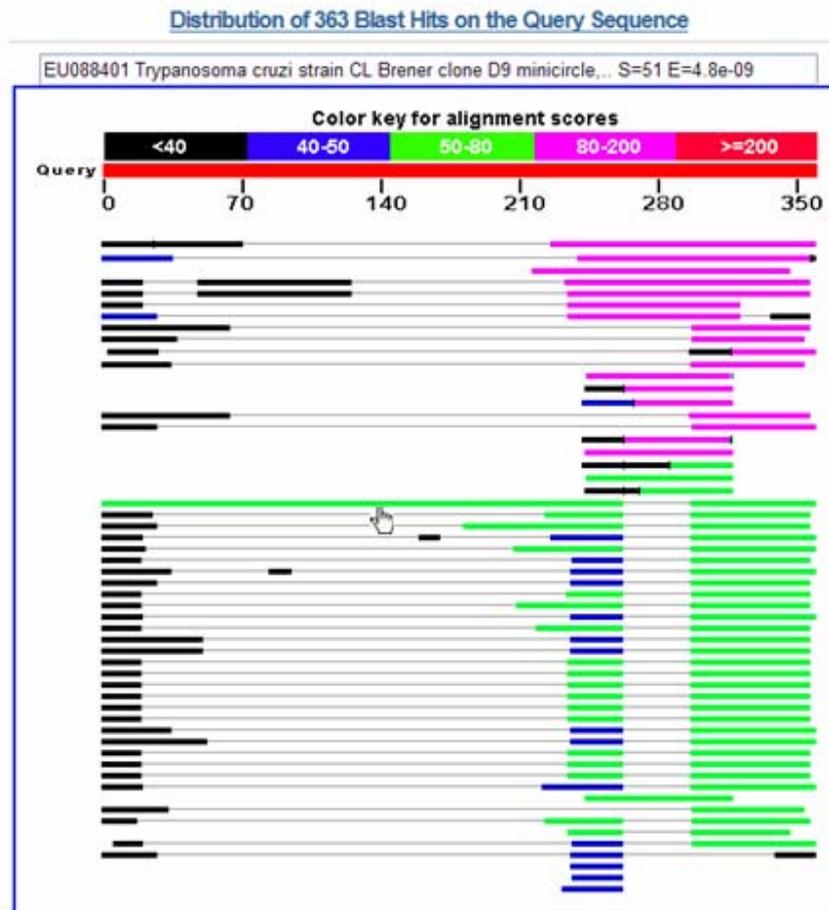


Figura 19: Análise das seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma humano. A) Alinhamento das seqüências de kDNA consenso I. Os clones 74, 107 e 112 são oriundos dos pacientes 1288, 1287 e 129. Os clones 117, 128, 146 e 169 são provenientes, respectivamente, dos pacientes 470, 471, 461 e 414, todos da Família C. As regiões em preto mostram identidade total entre as seqüências analisadas. B) Súmula de busca da seqüência consenso I no BLASTn.

A)

```

1
100
Clone 326 AARGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 293 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 210 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 229 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 234 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 235 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 253 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 340 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 360 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 377 ...GCGCCCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 364 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Clone 82 GACGCCCGCTCCCAACCAATATTTCAGGATTTCCATACCTCATATCCGTAACATAACACAAACACAAACATACAACCCCATTAACCAAAATATATAA
Consense g cccctcccaa accaatatttca gaa ttccataccctcata tccgtaac ataacacaa cacaa catacaaccccatTAACCAAAATATATAA

101
200
Clone 326 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 293 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 210 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 229 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 234 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 235 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 253 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 340 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 360 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 377 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 364 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Clone 82 ACGTAAATAAAGTCTAATTATACAAGCTTAAACCCACTACCAAACTGTAAGTACACAGATATAAAGTACATACATGCTCTAATCATATTCAATAAGTCTT
Consense ac gtaataaactctaattatacaaaacttaaacccactaccaaactgtaactcacagatataaactcacatacatgctctaaacatattcaataaagctctaaac
201
276
Clone 326 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATAT.....TACACCAACCCGCA
Clone 293 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTAAAGAGGAGTCTT
Clone 210 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTCACTCCCGTAAACG
Clone 229 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCCAGTGTTCCTGGAC
Clone 234 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATAT.....TACACCAACCCGCA
Clone 235 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTT.....
Clone 253 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTAGACTCAGGAA
Clone 340 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTACACCAACCCGCA
Clone 360 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTACACCAACCCGCA
Clone 377 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTACACCAACCCGCA
Clone 364 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTACACCAACCCGCA
Clone 82 TATCACCAAATATTCTACTAATCCACTAACCTCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCTTACACCAACCCGCA
Consense taccaccatatttctactaattccactaacct cttatat

```

B)

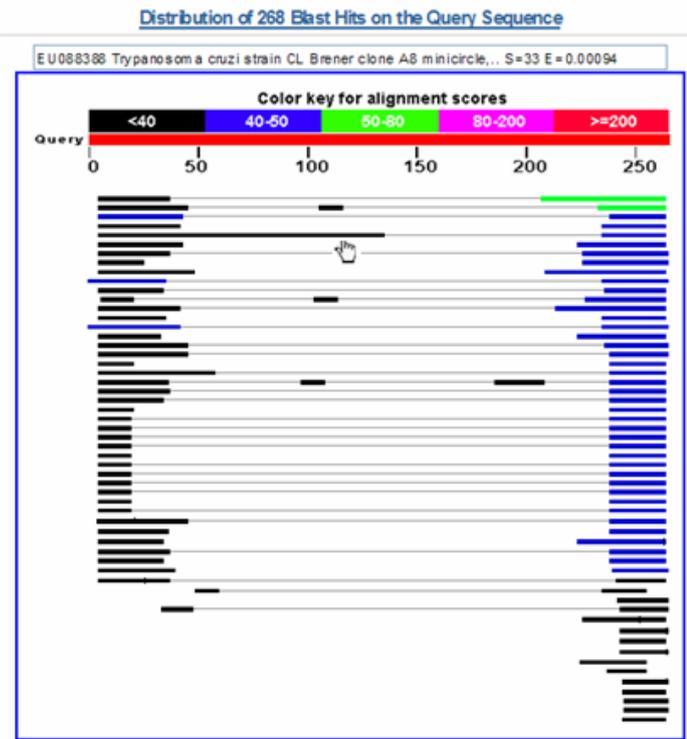


Figura 20: Análise das seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integrado no genoma humano. A) Alinhamento das seqüências de kDNA consenso II. Os clones 229, 234 e 252 são oriundos, respectivamente, dos pacientes 387, 403 e 474 da família A. Também possuem essa seqüência os pacientes da família B, 410 (clone 326), 415 (clone 292) e 416 (clone 210). Os clones 340, 360, 364 e 377 são provenientes, respectivamente, dos pacientes 452 (família D), 445, 446 e 442 (família E). As regiões em preto mostram identidade total entre as seqüências analisadas. B) Súmula de busca da seqüência consenso II no Blastn.

4.2 Southern Blot Genômico

Visando definir perfis de bandas formados pelo kDNA integrado no genoma de pacientes chagásicos e de seus descendentes, foi feita a análise do DNA genômico pela técnica *Southern blot*. Utilizando a sonda de kDNA de *T. cruzi* selvagem ou o produto de amplificação do DNA do protozoário com os *primers* S35/36, não foi possível identificar banda de kDNA integrada no DNA dos chagásicos. Neste experimento, apenas o DNA do *T.cruzi*, usado como controle positivo, formou a banda esperada (1,4 kb) do minicírculo linearizado pela clivagem com *EcoRI* (dado não apresentado).

Diante desses resultados, decidimos usar as seqüências consensos I e II de kDNA (Figuras 19 e 20) presentes nos sítios de integração de vários chagásicos e descendentes. Como observado na Figura 21, as sondas consensos I e II reconheceram bandas de aproximadamente 3 kb no DNA humano. O tamanho desta banda é superior ao do minicírculo livre (1,4 kb),

indicando associação do kDNA ao genoma do hospedeiro. Estes dados corroboram os dados prévios da publicação de Nitz e cols (2004).

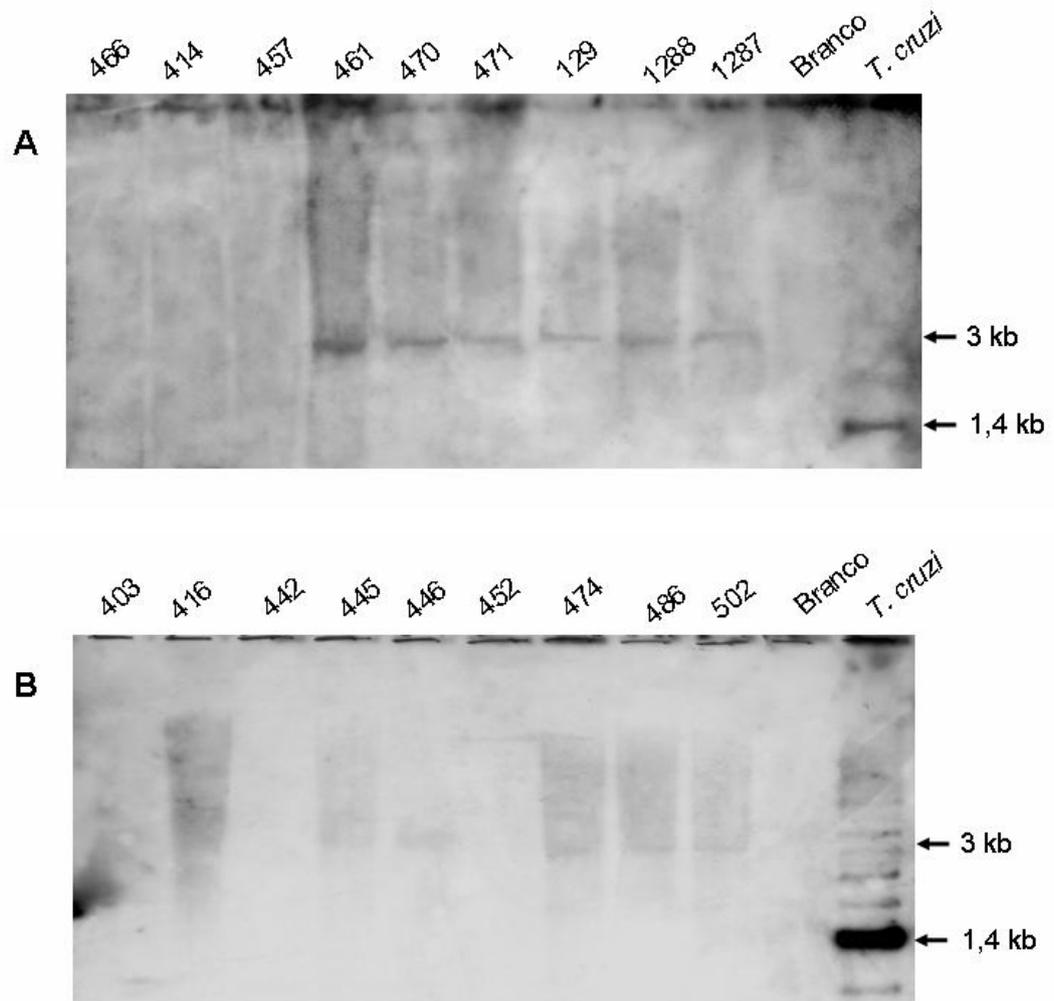


Figura 21. Identificação de banda de kDNA no genoma de pacientes chagásicos e seus descendentes, evidenciada pelo *Southern blot* do DNA genômico digerido com *EcoRI*. A) Sonda consenso I de kDNA. Os casos 466, 414, 457, 461, 470 e 471 são todos da família C. Note que os três últimos casos formaram a banda de 3 kb com a sonda específica e que os dois últimos são da geração G₂. De interesse, os chagásicos 129, 1288, e 1287 aparecem no trabalho de Nitz e cols (2004). B) Sonda consenso II. Note que os três primeiros casos não formam bandas de kDNA. O controle positivo (DNA de *T. cruzi* clivado com *EcoRI*) forma banda de 1.4 kb.

5. Análise da formação de possíveis novas fases de leitura aberta

Publicações prévias do nosso laboratório (Nitz e cols 2004; Simões-Barbosa e cols. 2006) mostram eventos de integração do kDNA no genoma hospedeiro, onde aparecem fases de leitura aberta com possibilidade de tradução em proteínas quimeras. Neste estudo, a investigação *in silico* das seqüências dos clones com as mutações de kDNA revelou 64 novas fases de leitura aberta (ORFs), abrangendo nucleotídeos pertencentes ao parasito e ao hospedeiro humano (Figura 22). Interessantemente, notamos, em vários clones, a presença da ORF da transcriptase reversa. Esse achado é consistente com a observação da integração de minicírculos de kDNA naquela região codificadora arquétipa de elemento LINE-1.

A)

```
67 rev
1   GAACGCCCT CCCAAAACCA ACATTTCCAG AATTTTCOTA CCCTTAACTA CCTAACACCA
61  ACCCACTACA ACCCCACCAA CCAACTACCT ATAAACAACC CCCACCACCTA AACATAAACA
121 TAGAATACAA CATAATATAT CTAATTTCAAT TCAATACACA TCAATTCATG TCAACCACCTA
181 TACTCTCAAAG ATCAATCTAC TGTTTAACAT ACATCATTAT ATCATGTTTA TAGTATCAAA
241 TCCATAAAAC CACCTCTATC TATATTACA CACCCCTGAT CCGAGCTTA GACTCAGGAA
301 CAAATCCACC TGAGATCAGC CCAACCCGGG CTAGATCAGC TGAAAAGTGT AAGGCACAAA
361 ATAAAAACTT ATCAGCTGAT ACCACTGGAG TTTTCTGGTT ATCTCTGGTA TAGCAAAATC
421 TAACTGATGC AATCTGCATC TGGCCCTTCAT CCTTCTCCCT TTATTGTCCT TTCGTGTATT
481 GTTCATCCAG CAACCAGGAT GATCTTGTTA AAACATTAAA CAGATTCTGT CACTCTTGTT
541 CAGCCCCCTG TGATGGTTTT CCAATGTGCT TCTGGAAAGA GCAAACATCC TTAARAGGCT
601 CAGTGTGGCG ATTCTCAAG GATCTAGAAC TAGAAATACC ATTTGACCCA GTGATCCCAT
661 TGCTGGGTAT ATACCCBAAG GATTATAAAT CACGCTACTA TAAAGACACA TGCACAGGTA
721 TGTTTATTGT GGCCTAATC ACAATAGCAA AGACTTGGAA CCAACCCAAA TGTCCATCAG
781 TGATAGACTG GATTAAGAAA ATGTGGCACA TATACCCAT GGAATACTAT GCAGCCACAA
841 AAAAAGGATG AGAGTTCATG TCCTTTGTAG GGACATGGAT GAAGCTGGAA ACCATCATT
901 TGAGCBAAGT ATCGCBAAGB CAGAAAACCA AACACCACAT ATTCTCAGTC ATAGTGGG
961 ATTGAATAAT GAGAGCACTT GGACACCAGG CAGGGAACAT CACACACCAG GGCCTGTCTG
1021 GGGGTGTGAG GAGAGGGGAG GGACAGCATT AGGAGAAATA CCTAATATAA ATGATAAGTT
1081 AGTGGGTGCA GCACACCAAC ATGGCACATG TATACATATG TAACAAACCT GCACATTGTG
1141 CACATGTACC CTAGGACTTA AAGTATAATT TTAATAAATA GAGAGGGAGG AGCCAAGATG
1201 GCCGAATAGG AACAGCTCCG GTCAGCTCCC
```

L1-6

B)

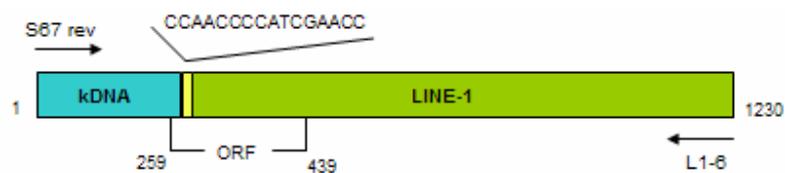


Figura 22: Integração de seqüência de minicírculo de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em LINE-1 humano. A) Clone 48, oriundo do paciente 1288 (Nitz e cols, 2004). Em azul está identificada a região do kDNA, e, em verde, o DNA humano do LINE-1 do cromossomo 7 (gi:18098531). A possível ORF quimérica está sublinhada em preto, e a região da ORF 2 da transcriptase reversa está sublinhada em magenta. As setas indicam a orientação e os asteriscos, o início de cada ORF. Os *primers* utilizados para obtenção desse evento de TGH aparecem escritos sobre setas indicadoras da orientação senso ou anti-senso. B) Representação esquemática do clone 48.

Uma vez determinadas as prováveis ORFs, procedemos com as buscas de homologias nos bancos de dados BLASTx, BLASTp e Swiss-Prot. Os resultados dessas análises estão sumariados na Tabela 6 e Anexo IV.

De modo geral, notamos que a maioria das ORFs quimeras é absolutamente nova, visto que não tiveram similaridade reconhecida pelo programa BLASTx. Os poucos casos que apresentaram homologia com seqüências depositadas em banco de dados referiam-se a regiões pertencentes à ORF 2 do elemento L1 (Anexo IV). Em relação às proteínas quimeras putativas, observamos a existência de motivos comuns, que

tinham origem tanto na seqüência do kDNA integrado, quanto no DNA humano. A análise das quimeras, nos programas BLASTp e Swiss-Prot, revelou que seis delas (clones 101, 185, 247, 325, 357 e 363) são homólogas a quimeras já descritas no nosso laboratório (gb|AAR88804.1|, gb|AAR88801.1|). Em outros nove casos, as quimeras continham seqüências encontradas em proteínas humanas previamente descritas (Tabela 6). Entre elas, merece destaque a proteína deduzida do clone 217 (paciente 411, família B) que apresenta uma alta identidade com a proteína humana conhecida como SCAMP (*secretory carrier membrane protein*), cujo alinhamento é mostrado na Figura 23. As demais quimeras assemelhavam-se a proteínas codificadas pela ORF 2 de L1.

A)

```

1      M H L T R T L W F W E G R S T F G V E I
21     H A S H P Y I M V L G G A F N F W G G N
41     S C I S P V H Y G F G R G V Q G S G V R
61     D P L K E A V C P F S D L Q L R A G R T
81     T A L F K A Q M E M Q K S P V F C V A H
101    A G D C R P

```

B)

ORF VI (Fragment) [Homo sapiens (Human)]	194 AA
Score = 51.6 bits (122), Expect = 1e-05	
Identities = 25/30 (83%), Positives = 27/30 (90%)	
Query: 57 SGVRDPLKEAVCPFSDDLQLRAGRTTALFKA 86	
SGVRDPL+EAVC FSDL+L AGR TT LFKA	
Sbjct: 22 SGVRDPLEEAVCLFSDLKLCAGR TTTLFKA 51	

Figura 23: Similaridade entre proteína quimera e a proteína SCAMP de humano. A) Proteína quimera definida pelo programa DNAMAN. Em verde, seqüência humana. Em azul, seqüência do *T. cruzi*. B) Resultado de busca da proteína quimera pelo programa Swiss-Prot.

Tabela 6: Similaridade entre as proteínas quiméricas deduzidas e seqüências depositadas em banco de dados.

Paciente	Clone	Resultado Blastp/ Swiss Prot	E-value
129	101	gb AAR88801.1 putative chimeric protein 146-19 [Trypanosoma cruzi]	0.003
287	79	gb EAX08712.1 hCG2020499 [Homo sapiens]	1,0e ⁻⁴
386	161	Q9UJZ4 Putative uncharacterized protein (Fragment) [Homo sapiens]	5,0e ⁻⁷
399	185	Q6RV10 Putative chimeric protein 173-56 [Trypanosoma cruzi]	0.019
385	195	pir B34087 hypothetical protein (L1H 3' region) - human	2,0e ⁻⁴
385	199	Q9P1K9 PRO1051 (HCG2036704) [hCG_2036704] [Homo sapiens (Human)]	0.012
389	152	Q8N886 CDNA FLJ39824 fis, clone SPLEN2011981 [Homo sapiens (Human)]	2,0e ⁻⁹
400	247	gb AAR88801.1 putative chimeric protein 146-19 [Trypanosoma cruzi]	0.017
411	217	Q95662 Pot. ORF VI (Fragment) [Homo sapiens (Human)]	1,0e ⁻⁵
409	314	pir B34087 hypothetical protein (L1H 3' region) - human	2,0e ⁻³⁵
407	325	Q6RV13 Putative chimeric protein 146-19 [Trypanosoma cruzi]	0.017
478	333	Q9UJZ4 Putative uncharacterized protein (Fragment) [Homo sapiens (Human)]	5,0e ⁻⁷
445	357	Q6RV13 Putative chimeric protein 146-19 [Trypanosoma cruzi]	0.003
446	363	Q6RV13 Putative chimeric protein 146-19 [Trypanosoma cruzi]	0.061
442	381	gb AAC51269.1 putative p150 [Homo sapiens]	9,0e ⁻⁶⁵

V. DISCUSSÃO

1. Aspectos gerais

No presente estudo, nós analisamos, com a ajuda de marcadores genéticos específicos, a ocorrência de transferência horizontal de DNA (TGH) do *Trypanosoma cruzi* para o genoma de 123 indivíduos que vivem em regiões endêmicas para a Doença de Chagas ou que nasceram em regiões endêmicas e mudaram-se há várias décadas para o Distrito Federal, região sem transmissão vetorial dessa doença. As técnicas de IF, HI e ELISA permitiram a identificação de anticorpos contra o *T. cruzi* nos indivíduos com a infecção crônica ativa. Utilizando métodos de PCR e *Southern blot*, encontramos, em chagásicos e em seus descendentes G₁ e G₂, evidências da integração de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. No conjunto, os resultados obtidos demonstram a ocorrência de TGH em todos os chagásicos com a infecção ativa, e a transferência vertical (TGV) dessas mutações para 45% das progênes G₁ e G₂.

Verificamos, também, que há uma enorme discrepância entre os resultados obtidos com as técnicas imunológicas, comparativamente com as técnicas de biologia molecular, haja vista que os testes imunológicos identificadores de anticorpos específicos contra antígenos do protozoário foram positivos apenas nos indivíduos portadores de infecções ativas de *T. cruzi*. Ainda que alguns indivíduos tivessem os testes imunológicos

negativos, a presença da infecção ativa nesses pacientes foi sugerida pela positividade do testes de PCR com *primers* iniciadores de nDNA, seguidos de hibridização com a sonda de kDNA específica. O real significado das discrepâncias observadas entre resultados de testes imunológicos e genéticos neste estudo parece ter interesse clínico-epidemiológico. Tendo em vista que não foram apresentados resultados das análises clínicas laboratoriais conduzidas nos 123 pacientes deste estudo, requerendo procedimentos e acompanhamento de longa duração, aqueles aspectos de interesse médico não foram tratados aqui. Portanto, esta Tese está focalizada na análise dos aspectos genéticos embutidos na transmissão horizontal e vertical de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o homem.

2. Emprego de *psTAIL* PCR para identificar eventos de TGH e TGV no genoma de chagásicos e seus descendentes

A técnica *TAIL* PCR foi desenvolvida por Liu & Whittier, em 1995, visando amplificar seqüências desconhecidas que flanqueiam regiões conhecidas. Todavia, a *TAIL* PCR possui algumas limitações, tais como o tamanho dos produtos gerados, raramente maiores que 500 pb, e a baixa eficiência de amplificação. Isso tem levado diversos autores a modificarem a *TAIL* PCR visando a obtenção de melhores resultados (Sessions e cols, 2002; Michiels e cols, 2003; Settles e cols, 2004). Recentemente, Liu & Chen (2007) otimizaram as condições térmicas e desenharam *primers*

especiais, os quais continham regiões degeneradas ancoradas a nucleotídeos fixos. Essas alterações renderam eficiência muito acima da obtida pelo método tradicional, pois foi capaz de gerar produtos de até 3 kb. Por essa razão, a metodologia foi chamada de *hiTAIL* PCR (high-efficiency *TAIL* PCR).

Em nosso estudo, o conhecimento prévio de que os minicírculos de kDNA se associavam a elementos L1 trouxe-nos a vantagem de utilizar *primers* que reconheciam nucleotídeos “fixos”, os quais possibilitaram a obtenção de clones de até 2 kb. Clones com esse tamanho não haviam sido conseguidos por outras estratégias experimentadas em nosso laboratório, como PCR direta e 5' RACE (Rudi e cols, 1999). Dessa forma, a *psTAIL* PCR, modificada em nosso laboratório, amplificou seqüências híbridas oriundas das integrações de kDNA em LINEs e em sítios com similaridades estruturais, possibilitando seqüenciamentos e análises de TGH e TGV no genoma de chagásicos e seus descendentes.

3. Transferência horizontal do kDNA de *T. cruzi* para o genoma humano

As análises de clones originados de pacientes chagásicos deste estudo mostraram presença de TGH em todos eles. Em alguns casos, foram encontrados até oito eventos independentes de integração. Em outros, foi possível encontrar o kDNA flanqueando o DNA humano nas extremidades 5' e 3'. Esse perfil estrutural pode ter sido gerado pela integração de dois minicírculos em proximidade, ou, ainda, ter sido devido à

interrupção do kDNA por retrotransposons do hospedeiro. Esses achados podem ser um indicativo de que a integração de kDNA no genoma do paciente chagásico é fenômeno freqüente decorrente das infecções naturais pelo *T. cruzi*.

A aquisição de material genético exógeno é um fenômeno evolucionário reconhecido. Porém, a literatura cita que a transferência gênica horizontal envolvendo organismos eucariotos não é um fenômeno comum na natureza (Choi, 2007; Simonson e cols, 2005), o que contrasta com os resultados desta Tese. Este assunto, entretanto, pode estar sendo subestimado em decorrência de métodos de investigação inadequados, que consideraram apenas os dados tirados de análises *in sílica*. Ainda que existam diversos relatos de genes eucariontes em organismos procariontes, que parecem aceitar prontamente o DNA exógeno, os poucos relatos feitos até agora estão sujeitos a severas críticas (Rogers e cols, 2007).

A ocorrência de trocas de DNA mitocondrial do tripanossomatídeo *T. cruzi* para o homem ocasionou a remodelagem do genoma, o que pode resultar no surgimento de novas proteínas (quimeras), na alteração da expressão de genes já existentes ou, até mesmo, no silenciamento de genes (Lee e cols, 2006; Simões-Barbosa e cols, 2006; Okubo e cols, 2007).

O estudo da formação de novas ORFs, resultantes da integração dos minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro, indica um potencial teórico de expressão de proteínas quimeras. Essa possibilidade de formação de novos antígenos precisa ser mais bem investigada, pois sua confirmação

poderia ser associada à patogênese da Doença de Chagas. Nesse caso, a existência de motivos comuns, repetidos nas seqüências oriundas do kDNA e do DNA humano, poderia ajudar a explicar o desenvolvimento da autoimunidade. Entretanto, essa possibilidade não foi considerada objetivo principal deste estudo, pois outro projeto do nosso laboratório, que usa como modelo experimental aves congênicas mutadas com kDNA de *T. cruzi*, oferece melhor condição de investigação. Acreditamos que a presença de mutações com o kDNA ligado ao DNA é consistente com a hipótese que sugere a patogênese da Doença de Chagas associada com alterações genótípicas e fenótípicas no genoma de aves (Gomes, 2006).

Cabe aqui esclarecermos que os eventos de transferência gênica horizontal (TGH) identificados neste estudo fortalecem os resultados do trabalho de Nitz e cols (2004), descartando as severas críticas referentes a uma possível contaminação de nossas amostras com DNA de outros seres, acusação essa que nunca foi comprovada. O fato de as seqüências que flanqueavam o kDNA apresentarem homologia com seqüências de DNA de diversos organismos, como *Oryzae sativa* e *Mus musculus*, pode ser explicado pela ocorrência de integração em retrotransposon L1, um elemento cuja seqüência tem características comuns nos diversos seres vivos, animais e vegetais. A comprovação desta interpretação tem base na existência de seqüências das regiões de justaposição das mutações que alinham com DNA humano e com seqüências de genoma de diferentes animais e de *Oryzae sativa* (*E-value* = 0 e identidade de 99%). Assim, nós consideramos a retração do trabalho de Nitz e cols (2004) pela revista *Cell*

uma atitude preconceituosa que coloca sob suspeição a credibilidade daqueles “experts”, agnósticos anônimos, que recomendaram o cancelamento daquela publicação. Espera-se que, com os resultados apresentados neste trabalho, o cancelamento seja revisto, pois os resultados de Nitz e cols (2004) são originais, revestindo-se de grande interesse biológico.

4. Sítios de integração do kDNA no genoma humano

Neste trabalho, observamos que a integração do kDNA ocorreu em quase todos os cromossomos, predominantemente (71% dos casos) em elementos LINE, o que pode ser prontamente explicada pela ampla distribuição desses elementos retrotransposníveis em todo o genoma humano (Song & Boissinot, 2007). A observação de que a integração do kDNA ocorreu freqüentemente no cromossomo X é consistente com diversos relatos na literatura, que mostram uma maior abundância de elementos L1 neste cromossomo (Graham & Boissinot, 2006; Song & Boissinot, 2007). De interesse, mutações ocorridas em elementos L1 do cromossomo X têm sido associadas à cardiomiopatia dilatada e outras doenças cuja patogênese passou a ter uma base genética conhecida (Yoshida e cols, 1998).

Ademais, o encontro de eventos de integração em outros sítios do genoma humano acrescenta maior interesse ao estudo, visto que, naqueles casos em que os minicírculos de kDNA integraram-se em elementos

transponíveis não-autônomos, como *Alu*, faz-se necessária a utilização da maquinaria de retrotransposição de LINE para a semeadura no genoma do mamífero (Buzdin, 2004). Aqui, lembramos que elementos *Alu* são associados ao desenvolvimento de diversas doenças humanas (Deininger & Batzer, 1999).

O fato de clones de diferentes indivíduos apresentarem seqüências de minicírculos de kDNA com características estruturais semelhantes, pode ter importante implicação biológica. Esta observação sugere que, possivelmente, algumas famílias de minicírculos seriam mais competentes para invadir o genoma do hospedeiro humano. Talvez seja uma propriedade estrutural encontrada em certas famílias de minicírculos que determine sua seletividade de integração em sítios no genoma das espécies de vertebrados.

Nós verificamos que, nos sítios de integração, existem regiões de micro-homologias, compartilhadas pelas seqüências do kDNA e do DNA humano, as quais podem estar envolvidas no mecanismo que medeia a integração. Estudos sobre a movimentação de elementos retrotransponíveis demonstram que a integração da extremidade 5' destes elementos parece ser um processo dependente de recombinação homóloga, onde a presença de micro-homologias no ponto de junção da extremidade 5' de L1 e a extremidade 3' do DNA adjacente é essencial para a entrada de L1 no genoma (Fujimoto e cols, 2004; Zingler e cols, 2007), como ilustrado no modelo de integração de LINE da Figura 24. Evidentemente, a longa viagem do kDNA mitocondrial pelos componentes celulares, atravessando o

citoplasma da célula hospedeira até invadir o núcleo e encontrar o sítio de integração no cromossomo, requer estudo detalhado. Essa investigação está em curso no nosso laboratório.

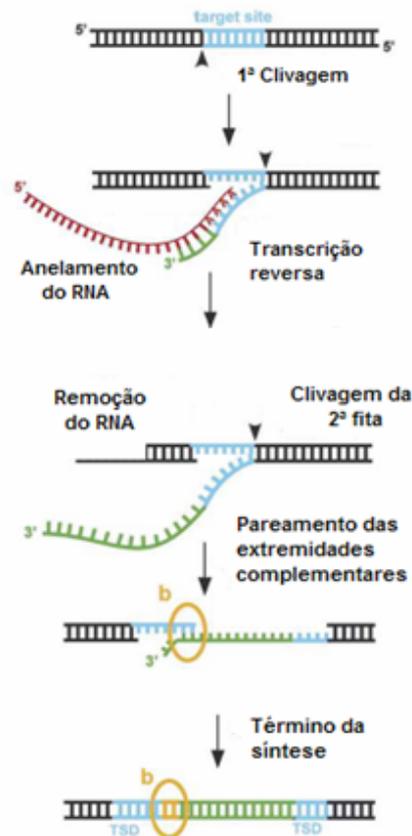


Figura 24: Modelo de integração de L1 dependente de micro-homologias. Após o pareamento da extremidade 3' de L1 com uma seqüência AATAAA, faz-se necessário o reconhecimento de homologias para que a extremidade 5' se integre e ocorra o término da síntese da fita de DNA. Adaptado de Zingler e cols, 2007.

4. 1 Associação do kDNA a genes

Até o momento, discutimos a associação do kDNA a elementos móveis do genoma humano, faltando-nos abordar os casos em que seqüências de minicírculos de kDNA foram encontradas em fases de leitura aberta de alguns genes. Esse aspecto se afasta de todos os outros descritos neste estudo e se aproxima do caso de mobilização do kDNA via retrotransposon e sua posterior integração na fase aberta de leitura do gene p15 (Simões-Barbosa e cols, 2006). Diferentemente, nos casos aqui descritos, as seqüências de kDNA estão diretamente ligadas aos genes sem intercalamento de seqüência de L1.

Em três situações, encontramos o kDNA integrado no gene do receptor olfatório OR1-17. A família OR é composta por 339 genes intactos e 297 pseudogenes distribuídos em 172 subfamílias, cujos membros são 60% idênticos em suas seqüências protéicas (Malnic e cols, 2004). Desta forma, como receptores da mesma família costumam reconhecer o mesmo odor, é pouco provável que a integração do kDNA em um dos genes venha a trazer danos para o paciente, a não ser que esteja se produzindo uma nova proteína.

Fato sujeito a uma possível repercussão funcional, identificamos o kDNA associado ao gene ADAM23. Esse gene pertence a uma família composta por 35 membros, os quais parecem estar envolvidos em muitos eventos durante o desenvolvimento, como fertilização, miogênese e neurogênese. O silenciamento de ADAM23 tem sido associado a tumores cerebrais e gástricos (Takada e cols, 2005; Sun e cols, 2007).

Em mais um caso, observamos a entrada do kDNA no gene TRIM69. A família TRIM é muito extensa e parece estar bastante dispersa no genoma humano (Reymond e cols, 2001). Em camundongos, o ortólogo desse gene é especialmente expresso em células germinativas e, quando superexpresso, induz a apoptose (Shyu e cols, 2003). Desta forma, existe a possibilidade de a entrada do kDNA alterar a expressão desse gene e levar à morte celular.

A família *theta 14-3-3* é altamente conservada, sendo encontrada desde plantas até mamíferos. Existem diversos relatos que demonstram a importância dessa proteína para a sobrevivência dos cardiomiócitos e associam sua inativação ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (Gurusamy e cols, 2005; Lau e cols, 2007). Desta forma, sugerimos que essa proteína seja alvo de estudo, com possibilidade de mais bem compreender a Doença de Chagas.

5. Transferência vertical de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*

A transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* do genoma de parentais chagásicos (geração G_0) para a progênie G_1 e G_2 foi demonstrada nas cinco famílias deste estudo. Foi de grande interesse notar que, em geral, as integrações nas progênies também se fizeram nos retrotransposons LINE-1, guardando aquelas similaridades estruturais descritas nas seqüências oriundas dos ascendentes, onde o kDNA se encontra ligado ao DNA hospedador.

Esses aspectos moleculares da transferência gênica horizontal, seguida da transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA, indicam que houve herança dependente das células germinativas. De fato, neste estudo, a transferência vertical do kDNA foi imputada à presença da mutação com contribuição materna e paterna. Esta interpretação tem base em estudo conduzido em nosso laboratório, no qual a análise do sêmen dos pacientes das famílias indica a herança dos minicírculos de kDNA via células germinativas. Os resultados e as conclusões sobre essa análise serão apresentados na dissertação de mestrado da aluna Perla Fabíola de Araújo (Universidade de Brasília, 2008, em publicação).

Não obstante, a mobilização de um DNA exógeno integrado horizontalmente em parentais e sua transferência vertical para a progênie pode ser uma força que atua na constante evolução dos seres vivos. Interessantemente, as análises *in silico* das seqüências de genomas depositadas em bancos de dados sugerem que, no passado distante, teria havido transferência de seqüências de DNA mitocondrial para o DNA nuclear. Esse tipo de transferência é conhecido como *numt* (nuclear sequences of mitochondrial origin) (Triant & Daewoody, 2007a; Hazkani-Covo & Graur, 2007). De grande importância, Triant & Daewoody (2007b) descreveram a integração de um pseudogene mitocondrial (citocromo b) em seqüências ricas em A e C (ACACCACCCCA) de elementos retrotransponíveis, semelhantes às micro-homologias que medeiam a recombinação e integração do kDNA no genoma humano.

6. Modelo de integração dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma humano

Existem diversos elementos LINE-1 no genoma humano que possuem uma maquinaria completa de retrotransposição e que se encontram ativos. Além disso, elementos não-autônomos, como os SINEs, podem se aproveitar das proteínas dos LINEs para realizarem a retrotransposição (Buzdin, 2004).

O mecanismo de retrotransposição abrange duas etapas, uma nuclear e outra citoplasmática. Inicialmente, as ORFs 1 e 2 do LINE-1 são transcritas em RNA, e este migra para o citoplasma, onde ocorrerá a tradução. A proteína da ORF1 (ORF1p), que tem afinidade por RNA e DNA fita simples, se liga ao RNA de L1 e o leva de volta para o núcleo, onde ele será reintegrado utilizando a endonuclease e a transcriptase reversa da ORF2 (Babushok & Kazazian, 2007).

Como já descrito na literatura, a proteína da ORF1 pode se ligar a outros RNAs que não de L1 e transportá-los para o núcleo (Buzdin e cols, 2007). Dessa forma, é possível que moléculas livres de minicírculo de kDNA, perdidas durante o processo de replicação do parasita, se associem à ORF1p e sejam levadas para o núcleo celular. Alí, as seqüências dos minicírculos podem ser integradas no genoma do hospedeiro, mediante auxílio das proteínas da ORF2 (Figura 25). Futuramente, as investigações em curso no nosso laboratório poderão elucidar os diversos aspectos associados aos mecanismos de integração do kDNA no genoma humano.

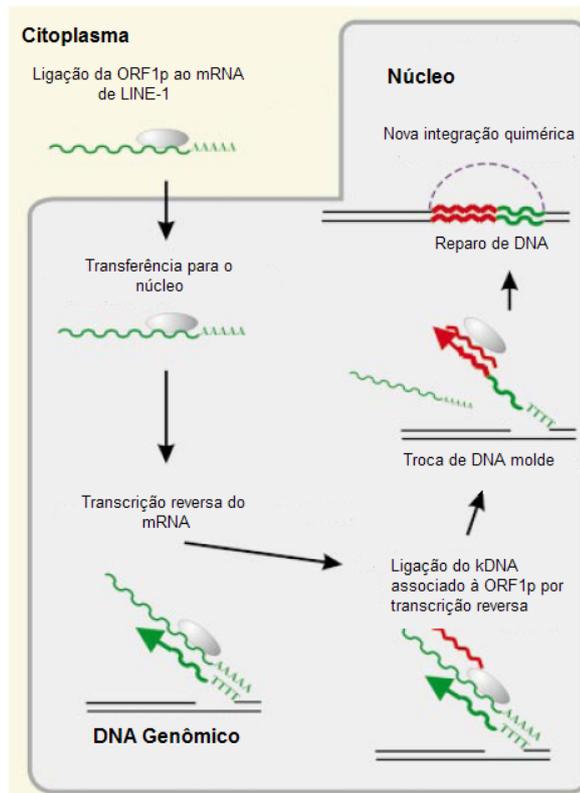


Figura 25: Representação esquemática da integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. Durante o processo normal de integração dos elementos L1 (verde), o kDNA (vermelho) associado à proteína ORF1p utiliza a transcriptase reversa de L1 para se integrar e formar uma nova seqüência quimérica. Adaptado de Buzdin e cols, 2003.

7. Mutação, recombinação, deriva genética, crescimento e modificação do genoma: a evolução do genoma de chagásicos e seus descendentes.

Neste trabalho, foram apresentados dados que demonstram a integração de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de chagásicos, portadores de infecção ativa, e a transferência vertical das

mutações para os descendentes. Existe uma noção corrente que admite que o processo de evolução dependa exclusivamente de seleção adaptativa. Porém, essa noção parece não ser suficiente para explicar a enorme diversidade genética nas populações de seres vivos, particularmente no que concerne ao aumento de complexidade das espécies (Lynch e cols, 2006; Lynch, 2007; Gherman e cols, 2007).

As observações apresentadas nesta Tese sugerem que os aspectos fundamentais de evolução do genoma dependem largamente de poderosas forças não adaptativas, como mutação, recombinação e deriva genética. Aqui, empregamos o termo mutação com o significado de força evolutiva que impõe variação, resultando em recombinação cromossômica e em deriva que determina desvios na frequência de alelos de geração para geração.

No caso particular das infecções pelo *T. cruzi* no homem e em mais de 1150 espécies de mamíferos que habitam o Continente Americano, todos permissivos às trocas genéticas em decorrência da infecção natural, as forças evolutivas parecem operar livremente, sem barreiras conhecidas. Os estudos que foram conduzidos no nosso laboratório mostraram a transferência de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma de camundongos (Teixeira e cols, 1991; Teixeira e cols, 1994), de coelhos (Nitz, 2001), de babuínos *Papaya Hamadrias* (Teixeira e cols, 2006) e de aves (Nitz e cols, 2004; Gomes, 2006). As características das seqüências analisadas mostram que essas integrações se fazem em sítios preferenciais em aves e em mamíferos. Esta compreensão sobre os

eventos de TGH e TGV descrita aqui acompanha o que tem sido relatado para outros fenômenos da natureza.

Em se tratando de modificação introduzida no genoma humano, as mutações precisam ser bem examinadas antes de se admitir aquisição e proliferação do DNA exógeno. No caso das mutações originadas de minicírculos de *T. cruzi*, nós sabemos sua origem e composição, na ausência de função reconhecida. Portanto, não se esperaria que esses elementos tivessem funções vantajosas imediatas na nova localização. Entretanto, é possível que, mediante embaralhamento e recombinação das seqüências quimeras no sítio da mutação, possa ocorrer silenciamento ou superexpressão de genes, com formação de novos genes ou de pseudogenes. Diante da identificação de novas fases de leitura aberta nas análises *in sílica*, sugerimos a possibilidade de alterações fenotípicas nas células mutadas.

Em resumo, a maioria das mutações identificadas neste estudo foi considerada neutra. Porém, nós também consideramos que mutações deletérias sejam importantes no processo evolutivo. Pois achamos que essas últimas, usualmente reconhecidas em chagásicos na idade adulta, não interrompem a saga reprodutiva. Assim, a reprodução sexuada passa as mutações para as progênies. A fixação dessas mutações sustenta o fluxo genético introdutor de crescente complexidade nas espécies em evolução. Neste curso singular, a Doença de Chagas emerge como uma manifestação fortuita de seleção negativa.

8. Perspectivas

O presente trabalho traz à tona novos parâmetros para o estudo da Doença de Chagas e da evolução do genoma nos indivíduos infectados com o *T. cruzi*. Entretanto, este é apenas o início de uma série de perguntas, cujas respostas dependem de mais investigação. Estudos futuros deverão esclarecer:

- Os mecanismos moleculares envolvidos na integração dos minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano;
- Se há a alteração da expressão gênica e/ou a formação de novas proteínas em consequência da integração;
- Quais eventos de integração estariam associados ao aparecimento dos sintomas da doença.

VI. Referências Bibliográficas

ABAD-FRANCH, F & MONTEIRO, FA. **Molecular research and the control of Chagas Disease Vectors.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* V 77(3): 437-454, 2005.

ANDERSSON, J. **Molecular diagnosis of experimental Chagas disease.** *Trends in parasitology.* V 20(2): 52-3, 2004.

ANDRADE, ZA. **Imunopathology of Chagas Disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 94(1): 71-80, 1999.

ARGAÑARAZ, ER. **Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elemento L1 no genoma da célula hospedeira.** Tese, Universidade de Brasília, 1996.

BABUSHOK, DV & KAZAZIAN HH. **Progress in Understanding the Biology of the Human Mutagen LINE-1.** *Human Mutation.* V 0: 1-13, 2007.

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, 2005.

BONAMETTI, AM, CASTELO-FILHO, A; RAMOS, LR; BALDY, JLS; MATSUO, T. ***Trypanosoma cruzi* infection in blood donors.** *Journal of Public Health.* V 32(6): 566-71, 1998.

BORODULINA, OR & KRAMEROV, DA. **t-SINE or simple SINE? Can be both.** *Gene.* V 375: 111, 2006.

BRADFORD, MM. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* V 72: 248-254, 1976.

BURLEIGH, BA. **Probing *Trypanosoma cruzi* biology with DNA microarrays.** *Parasitology.* V 128: S3-S10, 2004.

BUSTAMANTE, JM; RIVAROLA, HW; FÉRNANDEZ, AR; ENDERS, JE; FRETES, R; PALMA, JA; PAGLINI-OLIVA, PA. **Indeterminate Chagas Disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy.** *Clinical science.* V 104: 415-420, 2003.

BUZDIN, AA; 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, AA. **Retroelements and formation of chimeric retrogenes.** *Cellular and Molecular Life Sciences.* V 61: 2046 – 2059, 2004.

BUZDIN, AA; GOGVADZE, E; LEBRUN, MH. **Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification.** *FEBS.* V 581: 2877-2882, 2007.

CALLINAN, PA; WANG, J; HERKE, SW; GARBER, RK; LIANG, P; BATZER, MA. **Alu Retrotransposition-mediated Deletion.** *J. Mol. Biol.* V 348: 791-800, 2005.

CAMAIONE, A; RUSSO, MA; ODORISIO, T; GANDOLFI, F; FAZIO, VM; SIRACUSA, G. **Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads.** *J Reprod Fertil.* V 96 (1): 203-212, 1992.

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.

CHAGAS, C. **New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 1: 159-218,1909.

CHEN, JM; FÉREC, C; COOPER, DN. **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.

CHOI, IG & KIM, SH. **Global extent of horizontal gene transfer.** *PNAS.* V 104 (11): 4489-94, 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.

COURA, JR; ABREU, LL; PERCY, H; WILLCOX, F; PETANA, W. **Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazol, nifurimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I – Avaliação Preliminar.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* V 139: 144-151, 1997.

CUNHA NETO, E. **Estudo da Ativação e Inativação de Linfócitos T Com Clones Murinos Ativados Quimicamente.** In: XI CONGRESSO DA SOC. BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, 1986. RESUMOS. CAXAMBU, 1986.

DAVIS, CC & WURDACK, KJ. **Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales.** *Science.* V 305 (5684): 676-678, 2004.

DEININGER, PL & BATZER, MA. **Alu Repeats and Human Disease.** *Molecular Genetics and Metabolism.* V 67: 183-193, 1999.

DEMARCO, R; MATHIESON, W; DILLON, GP; ALAN WILSON, R. **Schistosome albumin is of host, not parasite, origin.** *Int J Parasitol.* V 37 (11): 1201-8, 2007.

DEVERA, R; FERNANDES, O; COURA, JR. **Should Trypanosoma cruzi be Called 'cruzi' Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after in Vitro Culturing and Mice Infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 98(1): 1-12, 2003.

DIAS, JCP; SILVEIRA, AC; SCHOFIELD, CJ. **The impact of Chagas Disease Control in Latin América – A Review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 97(5): 603-612, 2002.

DIAS, JCP. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agentes de enfermidades transmitidas por alimentos.** *Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.* V 39 (4): 370-375, 2006.

FUJIMOTO, H; HIRUKAWA, Y; TANI, H; MATSUURA, Y; HASHIDO, K; TSUCHIDA, K; TAKADA, N; KOBAYASHI, N; MAEKAWA, H. **Integration of the 5' end of the retrotransposon, R2Bm, can be complemented by homologous recombination.** *Nucleic Acid Research.* V 32 (4): 1555-1565, 2004.

FUTUYAMA, DJ. **Biologia Evolutiva.** Editora Funpec, 2ª edição, 2002.

GADELHA, AAM; VERÇOSA, AFA; LORENA, VMB; NAKAZAWA, M; CARVALHO, AB; SOUZA, WV; FERREIRA, AGP; SILVA, ED; KRIEGER, MA; GOLDENBERG, S; GOMES, YM. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test.** *Vox Sanguinis.* V 85: 165-170, 2003.

GHERMAN, A; CHEN, PE; TESLOVICH, TM; STANKIEWICZ, P; WITHERS, M; KASHUK, CS; CHAKRAVARTI, A; LUPSKI, JR; CUTLER, DJ, KATSANIS, N. **Population bottlenecks as a potential major shaping force of human genome architecture.** *PLoS Genetics.* V 3(7): 119, 2007.

GILBERT, W. **Why genes in pieces?** *Nature.* V 271 (5645): 501, 1978.

GIRONÈS, N & FRESNO, M. **Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?** *Trends in Parasitology*. V 19(1): 19-22, 2003.

GOMES, ML; MACEDO, AM; VAGO, AR; PENA, SDJ; GALVÃO, LMC; CHIARI, E. ***Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood.** *Experimental Parasitology*. V 88: 28-33, 1998.

GOMES, CC. **Lesões típicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma Alterado por Interações de Sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.** Tese, Universidade de Brasília, 2006.

GRAHAM, T & 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.

GRAY, MW. **Evolution of organellar genomes.** *Current Opinion in Genetics & Development*. V 9: 678-687, 1999.

GUIÑAZÚ, N; PELLEGRINI, A; GIORDANENGO, L; AOKI, MP; RIVAROLA, HW; CANO, R; RODRIGUES, MM; GEA, S. **Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice.** *Microbes and Infection*. V 6: 1250-1258, 2004.

GURUSAMY, N; WATANABE, K; MA, M; ZHANG, S; MUSLIN, J; KODAMA, M; AIZAWA, Y. **Inactivation of 14-3-3 protein exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis through enhanced expression of protein kinase C beta 2 in experimental diabetes.** *Biol Pharm Bull.* V 28 (6): 957-62, 2005.

HAZKANI-COVO, E & GRAUR, D. **A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee.** *Mol Biol Evol.* V 24 (1): 13-18, 2007.

HEDGES, DJ & BATZER, MA. **From the margins of the genome: mobile elements shape primate evolution.** *BioEssays.* V 27:785–794, 2005.

HURK, J; MEIJ, I; SELEME, M; HOEFSLOOT, L; SITERSMANS, E; WIJS, I; PLOMP, A; JONG, P; KAZAZIAN, H; CREMERS, F. **L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development.** *Oxford University Press.* 2007.

IMASE, A; OHMAE, H; IWAMURA, Y; KIRINOKI, M; MATSUDA, H. **A comparative study on mouse MHC class I sequences detected in *Schistosoma japonicum* recovered from BALB/c (H-2d) and C57BL/6 (H-2b) mice.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* V 35 (1): 8-10, 2004.

IWAIA, LK; JULIANO, MA; JULIANO, L; KALIL, J; CUNHA-NETO, E. **T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between Trypanosoma cruzi B13 and cardiac myosin heavy chain.** *Journal of Autoimmunity*. V 24: 111-117, 2005.

JUNQUEIRA, ACV; DEGRAVE, W; BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations.** *Trends in Parasitology*. V 21(6): 270-272, 2005.

KAZAZIAN, HH; WONG, C; YOUSSEFIAN, H; SCOTT, AF; PHILLIPS, DG; ANTONARAKIS, SE. **Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man.** *Nature*. V 332: 164-166, 1988.

KAZAZIAN, HH & GOODIER, JL. **LINE Drive: Retrotransposition and Genome Instability.** *Cell*. V 110: 277–280, 2002.

KIERSZENBAUM, F. **Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis.** *Clinical Microbiology Review*. V 12(2): 210-223, 1999.

KIERSZEBAUM, F. **Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?** *TRENDS in Parasitology*. V 21 (11): 513-516, 2005.

KLINGBEIL, MM & ENGLUND, PT. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication.** *PNAS.* V 101(13): 4333-4334, 2004.

KOVALSKAYA, E; BUZDIN, A; GOGVADZE, E; VONOGRADOVA, T; SVERDLOV, E. **Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions.** *Virology.* V 346: 373-378, 2006.

LANDER, ES; LINTON, LM; BIRREN, B; NAUSBAUM, C; ZODY, MC; BALDWIN, J; DEVON, K; DEWAR, K; DOYLE, M; FITZHUGH, W. **Initial sequencing an analysis of the human genome. Internatiol Humam Sequencing Genome Consortium.** *Nature.* V 409: 860-921, 2001

LAU, JM; JIN, X; REN, J; AVERY, J; DEBOSCH, BJ; TRESKOV, I; LUPU, TS; KOVACS, A; WEINHEMER, C; MUSLIN, AJ. **The 14-3-3tau phosphoserine-binding protein is required for cardiomyocyte survival.** *Mol Cell Biol.* V 27 (4): 1455-66, 2007.

LAURIA-PIRES, L; BRAGA, MS; VEXENAT, AC; NITZ, N; SIMÕES-BARBOSA, A; TINOCO, DL; TEIXEIRA, ARL. **Progressive chronic Chagas Heart disease tem years after treatment with anti-trypanosoma nitroderivatives.** *Am J Trop Med Hyg.* V 63 (3-4): 111-118, 2000.

LAURIA-PIRES, L & CASTRO, CN. **Doença de Chagas e Evolução.**
Primeira Edição, Editora UnB, p. 167-180, cap 4, 2007.

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,
2006a.

LEE, Y; ISE, T; HA, D; FLEUR, AS; HAHN, Y; LIU, XF; NAGATA, S; LEE, B;
BERA, TK; PASTAN, I. **Evolution and expression of a chimeric POTE-
actin genes in the human genome.** *PNAS.* V 103 (47): 17885-17890,
2006b.

LEIBY, DA; HERRON, RM; READ, EJ; LENES, BA; STUMPF, RJ.
***Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of
evolving donor demographics on seroprevalence and implications for
transfusion transmission.** *Transfusion.* V 42: 549-555, 2002.

LEON, JS & ENGMAN, DM. **Autoimmunity in Chagas heart disease.**
International Journal for Parasitology. V 31: 555-561, 2001.

LEON, SJ; DANIELS, MD; TORIELLO, KM; WANG, K; ENGMAN, DM. **A
Cardiac Myosin-Specific Autoimmune Response Is Induced by**

Immunization with *Trypanosoma cruzi* Proteins. *Infection and Immunity.*

V 72(6): 3410-3417, 2004.

LEWIN, B. **Genes VII.** Atmed Editora, 7^a edição, 2001.

LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, SA; AGBO, EEC; ENGLUND, PT.

Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology.* V 21(8): 363-369, 2005a.

LIU, Y; MOTYKA, SA; ENGLUND, PT. **Effects of RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Structurespecific Endonuclease-I on Kinetoplast DNA Replication.** *The Journal of Biological Chemistry.* V 280(42): 35513-35520, 2005b.

LIU, YG; ZHAO, S; BAILEY, JA; SAHINALP, SC; ALKAN, C; TUZUN, E; GREEN, ED; EICHLER, EE. **Analysis of Primate Genomic Variation Reveals a Repeat-Driven Expansion of the Human Genome.** *Genome Research.* V 13: 358-368, 2003.

LIU, YG & WHITTIER, R. **Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking.** *Genomics.* V 25 (3): 674-81, 1995.

LIU, YG & CHEN, Y. **High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences.** *Biotechniques*. doi 10.2144/000112601, 2007.

LUKES, J; HASHIMI, H; ZYKOVA, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates.** *Curr Genet*. V 48: 277-299, 2005.

LYNCH, M; KOSKELLA, B; SCHAACK, S. **Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture.** *Science*. V 311(5768): 1727-1730, 2006.

LYNCH, M. **The frailty of adaptative hypotheses for the origins of organismal complexity.** *PNAS*. V 104 (1): 8597-8604, 2007.

MAGNANO, AR; GIORDANO, R; MOSCUFO, N; BACCETTI, B; SPADAFORA, C. **Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome.** *J Reprod Immunol*. V 41 (1-2): 187-196, 1998.

MALNIC, B; GODFREY, PA; BUCK, LB. **The human olfactory receptor gene family.** *PNAS*. V 101 (8): 2584-2589, 2004.

MANDISON-ANTENUCCI, S; GRAMS, J; HAJDUK, SL. **Editing Machines: The Complexities of Trypanosome RNA Editing.** *Cell.* V 108: 43-438, 2002.

MARCUS, E. **Retraction Controversy.** *Cell.* V 123: 173-175, 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.

MICHIELS, A; TUCKER, M; ENDE, WV; LAERE, A. **Chromosomal Walking of Flanking Regions From Short Known Sequences in GC-Rich Plant Genomic DNA.** *Plant Molecular Biology Reporter.* V 21: 295-302, 2003.

MOSER, DR; KIRCHHOFF, LV; DONELSON, J. **Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol.* V 27: 1477-1482, 1989.

MOWER, JP; STEFANOVI, S; YOUNG, GJ; PALMER, JD. **Gene transfer from parasitic to host plants.** *Nature.* V 432: 165-166, 2004.

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.

NITZ, N. **Evidência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de coelhos chagásicos.** *Tese, Universidade de Brasília*, 2001.

NITZ, N; GOMES, C; ROSA, AC; SOUZA-AULT, MR; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, AR. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell*. V 118 (2): 174-186, 2004.

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

PÉREZ-MORGA, D & ENGLUND, P.T. **The Attachment of Minicircles to Kinetoplast DNA Networks During Replication.** *Cell*. V 74: 703-711, 1993.

PERONE, D; SANTOS, MA; PEIXOTO, MS; CICARELLI, RM. **Trypanosoma cruzi: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TcrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody.** *Parasitology*. V 126 (6): 577-583, 2003.

PINTO, AYN; VALENTE, SAS; VALENTE, VC. **Emerging acute Chagas Disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement.** *Braz J Infect Dis*. V 8 (6): 454-460, 2004.

PONCE, R & HARTL, DL. **The evolution of the novel Sdic gene cluster in *Drosophila melanogaster*.** *Gene*. V 376: 174-183, 2006.

PORTELA-LINDOSO, AAB & SHIKANAI-YASUDA, MA. **Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction.** *Revista de Saúde Pública*. V 37 (1): 107-115, 2003

PRATA, A. **Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease.** *The Lancet Infectious Diseases*. V 1: 92-100, 2001.

Protocols and Application Guide. Promega Corporation, cap3. V 45, 1996.

REMOLD, SK & LENSKI, RE. **Contribution of individual random mutations to genotype-by-environment interactions in *Escherichia coli*.** *PNAS*. V 98 (20): 11388-11393, 2001.

REQUENA, JM; JIMENEZ-RUIZ, A; SOTO, M; LOPEZ, MC; ALONSO, C. **Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification.** *Mol Biochem Parasitol*. V 51: 271-280, 1992.

REYMOND, A; MERONI, G; FANTOZZI, A; MERLA, G; CAIRO, S; LUZI, L; RIGANELLI, D; ZANARIA, E; MESSALI, S; CAINARCA, S; GUFFANTI, A; MINUCCI, S; GIUSEPPE, P; BALLABIO, A. **The tripartite motif family identifies cell compartments.** *The EMBO Journal*. V 20 (9): 2140-2151, 2001.

RIBEIRO dos SANTOS, R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SANTANA SILVA, J.; SAVINO, W. & MENGEL, J. **Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.** *J. exp. Med*. V 175: 29-39, 1992.

ROGERS, MB; PATRON, NJ; KEELING, PJ. **Horizontal transfer of a eukaryotic plastid-targeted protein gene to cyanobacteria.** *BMC Biol*. V 5: 26-33, 2007.

RUDI, K; FOSSHEIM, T; JAKOBSEN, KS. **Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences.** *Biotechniques*. V 27: 1170-1177, 1999.

SAMBROOK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Second Edition. Cold Spring Harbor NY, 1989

SAMBROOK, J & RUSSEL, DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Third Edition. Cold Spring Harbor NY, 2001

SANMIGUEL, P; GAUT, BS; TIKHONOV, A; NAKAJIMA, Y; BENNETZEN, JL. **The paleontology of intergene retrotransposons of maize.** *Nature América*. V 20: 43-45, 1998.

SANTOS-BUCH, C.A. & TEIXEIRA, A.R.L. - **The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** *J. exp. Med.* V 140: 38-53, 1974.

SAYAH, DM; SOKOLSKAJA, E; BERTHOUX, L; LUBAN, J. **Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1.** *Nature*. V 430: 569-572, 2004.

SCHRÖDER, ARW; SHINN, P; CHEN, H; BERRY, C; ECKER, JR; BUSHMAN, F. **HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots.** *Cell*. V 110: 521-529, 2002.

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.

SESSIONS, A; BURKE, E; PRESTING, G; AUX, G; MCELVER, J; PATTON, D; DIETRICH, B; HO, P; BACWADEN, J; KO, C; CLARKE, JD; COTTON, D; BULLIS, D; SNELL, J; MIGUEL, T; HUTCHISON, D; KIMMERLY, B; MITZEL, T; KATAGIRI, F; GLAZEBROOK, J; LAW, M; GOFF, SA. **A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System.** *The Plant Cell*. V 14: 2985-2994, 2002.

SETTLES, AM; LATSHAW, S; MACCARTY, DR. **Molecular analysis of high-copy insertion sites in mice.** *Nucleic Acid Research*. V 32 (6): e54, 2004.

SHYU, HW; HSU, SH; HSIEH-LI, HM; LI, H. **Forced expression of RNF36 induces cell apoptosis.** *Exp Cell Res*. V 287 (2): 301-313, 2003.

SIMÕES-BARBOSA, A; BARROS, AM; NITZ, N; ARGANARAZ, ER; TEIXEIRA, AR. **Integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V 94 (1): 249-252, 1999.

SIMÕES-BARBOSA, A. **Transferência horizontal de seqüência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para transposon LINE-1 e alteração da expressão do gene p9 na célula hospedeira.** Tese, Universidade de Brasília, 2000.

SIMÕES-BARBOSA A, ARGANARAZ ER, BARROS AM, ROSA AC, ALVES NP, LOUVANDINI P, D'SOUZA-AULT MR, NITZ N, STURM NR, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (8): 833-43, 2006

SIMONSON, AB; SERVIN, JA; SKOPHAMMER, RG; HERBOLD, CW; RIVERA, MC; LAKE, JA. **Decoding the genomic tree of life.** *PNAS.* V 102 (1): 6608-13, 2005.

SONG, M & BOISSINOT, S. **Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination.** *Gene.* V 290: 206-213, 2007.

SPADAFORA, C. **Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation.** *Bioessays.* V 20 (11): 955-964, 1998.

STITES, DP; STOBO, JD; WELLS, VJ. **Basic and Clinical Immunology.** *Large Medical Books.* 6ª edição, 1987.

STURN, NR; DEGRAVE, W; MOREL, C; SIMPSON, L. **Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastide minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease.** *Mol Biochem Parasitol.* V 33: 205-214, 1989.

SUN, Y; WANG, Y; ZHANG, J; TAO, J; WANG, C; JING, N; WU, C; DENG, K; QIAO, S. **ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.** *Neurochem Res.* V 32 (7): 1217-1223, 2007.

TAKADA, H; IMOTO, I; TSUDA, H; NAKANISHI, Y; ICHIKURA, T; MOCHIZUKI, H; MITSUFUJI, S; HOSODA, F; HIROHASHI, S; OHKI, M; INAZAWA, J. **ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation.** *Oncogene.* V 24 (54): 8051-8060, 2005.

TEIXEIRA ARL, TEIXEIRA ML, SANTOS-BUCH CA. **The immunology of experimental Chagas' disease - IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man.** *Am J Path.* V 80: 163-180, 1975.

TEIXEIRA, AR; LACAVA Z; SANTANA, JM; LUNA,H. **Insertion of Trypanosoma cruzi DNA in the genome of mammal host cell through infection.** *Rev Soc Bra Med Tro.* V 24 (1): 55-58, 1991.

TEIXEIRA, AR; ARGAÑARAZ, ER; FREITAS, LH; LACAVA, Z; SANTANA, JM; LUNA, H. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mutat Res.* V 305 (2): 197-209, 1994.

TEIXEIRA, ARL; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (5): 463-491, 2006.

TRIAN, DA &DAEWOODY, JA. **Extensive mitochondrial DNA transfer in a rapidly evolving rodent has been mediated by independent insertion events and by duplications.** *Gene.* V 401: 61-70, 2007a.

TRIAN, DA &DAEWOODY, JA. **Molecular analyses of mitochondrial pseudogenes within the nuclear genome of arvicoline rodents.** *Genetica.* DOI 10.1007/s10709-007-9145-6, 2007b.

VEXENAT, AC. **Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por Trypanosoma cruzi, Leishmania (Viannia) braziliensis,**

***Leishmania chagasi* e outras doenças crônicas.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 1993.

VIRREIRA, M; TORRICO, F; TRUYENS, C; ALONSO-VEGA, C; SOLANO, M; CARLIER, Y; SVOBODA, M. **Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection.** *Am. J. Trop. Med.* V 68(5): 574-582, 2003.

VIRREIRA, M; TORRICO, F; TRUYENS, C; ALONSO-VEGA, C; SOLANO, M; CARLIER, Y; SVOBODA, M. **Comparison of PCR methods for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection.** *Rev Soc Bra Méd Trop.* V 38 (2): 65-67, 2005.

WILLIAMS, DL; SAYED, AA; RAY, D; MCARTHUR, AG. ***Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host.** *Molecular and Biochemical Parasitology.* V 150 (2): 359-363, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee.** *WHO Technical Report Series,* V 905, 2002.

YOSHIDA, K; NAKURAMA, A; YAZAKI, M; IKEDA, S; TAKEDA, S. **Insertional mutation by transposable element, L1, in the DMD gene results in X-linked dilated cardiomyopathy.** *Human Molecular Genetics*. V 7 (7): 1129-1132, 1998.

YOSHIYAMA, M; TU, Z; KAINOH, Y; HONDA, H; KIMURA, K. **Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid.** *Mol Biol Evol*. V 18 (10): 1952-1958, 2001.

ZINGLER, N; WILLHOEFT, U; BROSE, HP; JAHNS, T; HANSCHMANN, KM; MORRISH, TA; LÖWER, J; SCHUMANN, GG. **Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining.** *Genome Res*. V 15 (6): 780-9, 2007.

VII. Resumo

Neste estudo, nós confirmamos e estendemos o conhecimento sobre a transferência de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma humano. Foram analisadas cinco famílias cujos parentais (G_0) eram portadores da doença de Chagas. Foi possível observar a integração de kDNA de *T. cruzi* no genoma de todos os chagásicos estudados. Concomitantemente, investigamos a transferência gênica vertical (TGV) das seqüências integradas de kDNA para as progênies G_1 e G_2 . A TGV foi identificada em 45% dos descendentes de chagásicos. As análises das regiões do genoma humano que flanqueavam as seqüências de kDNA mostraram a integração de minicírculos de kDNA preferencialmente em retrotransposons LINE (71% dos clones). As integrações foram identificadas também em retroelementos não-autônômos (12%), em ilha CpG (1%) e em alguns genes (4%). Nos demais clones (12%), não foi possível determinar os *loci* de integração do kDNA no genoma. A análise da estrutura do kDNA integrado revelou duas seqüências consensos de minicírculos que são inseridas mais freqüentemente que as outras, sugerindo que suas características estruturais possam favorecer o processo de integração. Acreditamos que micro-homologias ricas em AC, presentes nos minicírculos do *T. cruzi* e no genoma humano, podem mediar a integração do kDNA por recombinação homóloga.

Os nossos achados sugerem remodelagem do genoma hospedeiro na região de justaposição das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma humano. As análises *in silico* sugerem que o fenômeno descrito aqui pode resultar no surgimento de novas proteínas ou na alteração de expressão de genes pré-existentes. O real significado de tais mutações não fica restrito à Doença de Chagas, mas, sim, estende-se ao longo do processo da evolução, onde a fixação dessas mutações ajudaria a impulsionar um fluxo genético introdutor de complexidade crescente às espécies.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; integração do kDNA; transferência gênica vertical (TGV); retrotransposon LINE-1; crescimento e evolução do genoma; Doença de Chagas.

VIII. Summary

In this study we showed the transference of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences into the human genome. All founders (G_0) of five families having the chronic *T. cruzi* infections had the kDNA integrated into retrotransposable elements. Additionally, we demonstrated the vertical gene transfer (VGT) of those kDNA mutations to their G_1 e G_2 progenies. Indeed, VGT was demonstrated in 45% of Chagas patients' descendents. The analyses of the juxtaposition regions of the kDNA to the human genome revealed that the minicircle sequences integrate preferentially into retrotransposable LINE in 71% of those mutations. These mutations were also present in non-athonomous retroelements (12%), CpG island (1%) and putatively in some genes (4%). The remaining mutations (12%) were present in undetermined *loci* in some chromosomes. The structure of the kDNA integrated into the host genome revealed main consensus types I and II sequences, which were found in the integration sites in high ratio than other minicircles integrated in defined *loci*. It appears that some particular feature in those consensus sequences favor their insertion in those *loci*. We believe that AC-rich micro-homologies present in the *T. cruzi* kDNA minicircles and in the human genome could mediate the parasite DNA integration by homologous recombination mechanism.

Our findings suggest that host DNA shuffling and recombination may occur at the integration site. It appears that the phenomenon of kDNA

integration may alter pre-existing genes expression or they may generate chimera proteins. The true meanings of those mutations appear not to be limited to Chagas disease. We understand that the observed genetic drift of 55% of the kDNA mutation in the progeny may help to propel a robust genetic flux possibly associated with genome growth and increasing complexity of species. We propose that the fixation of those mutations appear to influence the evolution process.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; kDNA integration, vertical gene transfer, LINE-1 retrotransposon, genome evolution, Chagas disease.

ANEXO I

Ficha de Consulta

Ficha nº _____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Sexo: ____ Data de nascimento: ____/____/____ Estado Civil: _____

Naturalidade: _____ Área: () Rural () Urbana

Residiu neste local durante quantos anos: _____

Data do Exame: ____/____/____

ANTECEDENTES:

1. Pessoais:

- Morou em casa com barbeiro? () Sim () Não
- Já foi picado pelo barbeiro? () Sim () Não
- Já fez exame para Chagas? () Sim () Não
- Se sim, deu positivo? () Sim () Não
- Transfusão Sangüínea? () Sim () Não
- Cirurgias Prévias? () Sim () Não

2. Familiares:

- Pais e/ou irmãos têm Chagas? () Sim () Não
- Pais e/ou irmãos têm alguma doença cardiovascular? Qual?

Dados Clínicos:

- Tem boa saúde? () Sim () Não
- Pratica exercícios físicos? () Sim () Não
- Tabagismo? () Sim () Não
- Tem palpitações? () Sim () Não
- Tem constipação? () Sim () Não

ANEXO II

	Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		<i>E-value</i>
						Cromossomo	Locus	
	129	101	1-325	310-360	GGAGATGCATAAATTT	5	CTD-2085F10 (Indeterminado)	2,0e ⁻¹⁴
		103	1-360	347-441	CCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻³¹
		104	1-256	244-574	CCCCTCCCAAAC	1	RP5-79K22 (LINE-1)	6,0e ⁻¹²⁰
		107	1-263	255-648	AATCGAACC	10	RP11-99I12 (LINE-1)	0
	275	112	1-360	346-438	CCCTCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	6,0e ⁻³⁶
	1287	37	1-602	588-727	AACCCCAATCGAACC	9	RP11-340N12 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁸
		40	54-479	1-53	AACCAATAACAGGC	11	RP11-460B17 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁴
		77	1-597	586-1221	CAATCGAACCCC	X	RP3-393P12 (LINE-1)	0
		78	1-288/ 502-765	283-506	AACCAA/ TGGTT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	9,0e ⁻⁴³
		79	1-281/ 729-1045	262-749	ACCAACCCCAATCGAACC/ ATCTCACCCGTACATTATT	12	RP11-626I20 (LINE-2)	0

	Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
						Cromossomo	Locus	
		82	1-654	642-1107	CCCAACCGAACCC	13, 7	RP11-209J19 CTD-2523K17 (LINE-1)	7,0e ⁻⁹⁷ 1,0e ⁻⁴⁹
		87	1-279/ 508-838	271-507	AATCGAACCC/ GGGTTTCGAT	14, 10	R-111A21, RP11-315M8 (LINE-1)	1,0e ⁻¹¹¹ 4,0e ⁻¹⁹
		89	1-286	275-393	CCCAATCGAACCC	7	CTD-2523K17 (LINE-1)	2,0e ⁻⁴⁷
	1288	44	1-286	271-1134	CAACCCCAATCGAACCC	5	RP11-198P15 (LINE-1)	0
		45	1-286/ 479-773	275-496	CCCAATCGAACCC/ GGTTCGATTGGGGTTGGT	7	CTD-2523K17 (LINE-1)	9,0e ⁻⁴⁹
		47	1-287	277-643	CCAATCGAACCC	22	SC22CB-1D7 (Indeterminado)	1,0e ⁻¹⁷⁹
		48	1-286	270-1230	CCAACCCCATCGAACCC	7	RP11-707F14 (LINE-1)	0
		49	1-295	278-979	ACCAACCCCAATCGAACCC	2	RP11-340F16 (MER)	0
		90	1-285	278-544	ATCGAACCC	3	RP11-312P21 (LINE-1)	7,0e ⁻¹⁰⁶
		91	1016- 1301	1-1031	GGTTCGATTGGGGTTG	4	RP11-176N15 (LINE-1)	0
		93	1-266/ 1381-1666	259-1389	AT CGAACCC/ GGTTCGATT	X, 10	RP11-322A17 RP11-315M8 (LINE-1)	0 5,0e ⁻²⁰
	412	P2-13	1-278	261-382	ACCAACCCCAATCGAACCC	5	RP11-541P9 (LINE-1)	2,0e ⁻⁴⁸
Família A	389	149	1-283	280-370	AACC	8	RP11-168F16 (LINE-1)	1,0e ⁻²⁴
		151	1-285	283-425	ACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻¹⁶

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
386	152	1-302/ 499-628	303-513/ 614-767	TCCTCCTGGTTTAGT/ GATTGGGGTTGGTGT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻⁴⁸
	154	1-244/ 680-733	227-683	ACCAACCCCAATCGAACC/ GGAG	7	CTA-317M2 (Indeterminado)	0
	155	1-275	255-593	CACACCAACCCCAATCGA ACC	2	RP11-553M15 (Indeterminado)	3,0e ⁻¹⁶¹
	156	1-286	275-419	CCCAATCGAACC	7	RP11-494A9 (ERV)	2,0e ⁻⁵³
	157	1-275	256-511	ACACCAACCCCAATCGAA CC	9	RP11-32M23 (LINE-2)	5,0e ⁻⁶³
	160	628-919	1-645	AGATGAGGTTTCGATTGGG	2	RP11-156A1 (Gene ADAM 23)	0
	161	1-456	434-571	CATACACCAACCCCAATC GAACC	3	RP11-649F12 (Indeterminado)	2,0e ⁻⁴⁹
	173	1-283	280-403	AACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	3,0e ⁻¹⁴
	174	1-283	250-445	TTCCCATCTATATTACCCA ACCCCAATCGAACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	3,0e ⁻²⁷
	175	1-344	343-506	CC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻⁵²
399	177	1-418	410-837	AATCGAACC	14	R-111A21 (LINE-1)	1,0e ⁻⁸⁵
	181	1-325	313-404	CCCTCCAAGAAC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	3,0e ⁻²⁶
	185	50-352	1-57	GGGAGGG	1	RP4-593M8 (Indeterminado)	3,0e ⁻¹⁹
	186	98-486	1-105	ACACCAAC	7	RP11-95A10 (LINE-1)	4,0e ⁻²⁶

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
	188	1-276	273-552	TTCA	6	RP11-546O15 (Indeterminado)	2,0e ⁻¹³⁷
	190	1-660	649-767	CCCAATCGAACC	7	CTD-2523K17 (LINE-1)	4,0e ⁻⁴⁷
385	195	1-324	310-500	GAGATGCATAAATTT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁶²
	199	1-286	284-570	TCA	8	RP11-677P13 (LINE-1)	8,0e ⁻¹³⁷
	200	1-479	478-521	GC	1	RP11-318L16 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁰
489	201	1-370	357-520	CCCTCCCAAGACTA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	6,0e ⁻⁵⁰
	203	1-376	362-454	CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	3,0e ⁻³⁴
387	225	1-388	370-534	CCCTCCCAAGACTAAAC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻⁵²
	226	1-392	373-467	CCCCTCCCAAGACTAAACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	3,0e ⁻³⁴
	229	1-306	290-1153	CAACCCCAATCGAACC	5	RP11-198P15 (LINE-1)	0
403	234	1-267/ 371-452	246-370	ACCAACCCCAATCGAACC AACC	12	RP11-626I20 (Alu)	2,0e ⁻⁴³
	235	1-387	375-494	CCCAATCGAACCC	7	CTD-2523K17 (LINE-1)	2,0e ⁻⁴⁸
	236	161-451	1-177	GACCCCCCTCCCAAAA	14	R-85K15 (LINE-1)	1,0e ⁻⁷⁶
	237	1-280	269-446	GGAGGGGCGTC	X	RP11-959H17 (MER)	1,0e ⁻⁷⁷

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
516	239	108-268	1-113	GCATCT	15	tripartite motif protein 69 (TRIM69) mRNA	2,0e ⁻⁴⁵
	240	83-200	1-97/ 195-401	TTAGTCTTGGGAGG/ GGTGTA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻⁵⁷
	243	1-106	100-578	TGGTGTA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	9,0e ⁻⁵⁵
400	247	358-475	1-357/ 461-663	CCCTCCCAACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	9,0e ⁻⁵⁵
	248	1-356/ 590-711	346-605/ 701-1177	CCCTCCCAAGA/ CTCTGAATACACCAA	15	RP11-420M1 (LINE-1)	0
474	250	1-405	395-1078	GGGGGAGATGC	16	CTD-2583P5 (Indeterminado)	0
	253	1-323	307-1268	CCAACCCCAATCGAACC	7	RP11-707F14 (LINE-2)	0
	255	1-427	412-517	GCCCCTCCCAAAACC	3	RP11-889D3 (LINE-2)	1,0e ⁻³³
493	258	1-287	259-373	TGAAGGCCCTCCCA AAAC	3	RP11-889D3 (LINE-2)	8,0e ⁻³⁴
	263	1-304	296-732	GGGAGGGGC	12	ABC10- 45521700B16 (LINE-1)	0
484	264	264-315/ 1646-1933	1-276/ 307-1657	GAACGCCCTCCC/ TAATTAACCTGT	7, 2	RP5-1178G13 (Alu) Theta 14-3-3 (Gene)	1,0e ⁻¹²⁶ 0
	268	140-257	1-145/ 243-534	TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁶

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
485	273	1-111	108-766	AACC	8, X	RP11-16M2 RP13-444K19 (LINE-1)	5,0e ⁻¹⁹ 5,0e ⁻⁵⁹
	274	1-246	241-728	CGAACC	1, X	olfactory receptor OR1-17 gene/ RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁶ 1,0e ⁻⁵⁴
486	280	1-296	289-566	ATCGAACC	11, 20	CTD-2383B20 RP3-322G13 (Indeterminado)	3,0e ⁻⁹⁰ 3,0e ⁻³³
	282	1-80/ 707-822	72-712	CCCTCCCA/ TACACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	7,0e ⁻⁵⁸
487	287	1-220	207-563	ACCCCAATCGAACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁶
	289	1-435	430-528	AATTT	11	RP11-573E11 (LINE-1)	5,0e ⁻²²
Família B 419	178	1-414	406-646	AATCGAACC	14	R-111A21 (LINE-1)	1,0e ⁻¹¹²
	180	1-280	277-384	AACC	5	RP11-95I19 (LINE-1)	5,0e ⁻⁵³
416	210	1-360	351-578	CCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁷
	211	55-199/ 597-915	1-54/ 188-599	CCCCTCCCAAAA/ TGA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻¹¹⁰
411	212	223-540	1-228	GACGGC	4	RP11-554E24 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁰⁷
	215	86-347	1-93	ATCGAACC	1	RP11-438I12 (Indeterminado)	3,0e ⁻³²
	217	158-360	1-160/ 351-590	TGA/ ACCCAAAACC	18, 4	RP11-813F20 (LINE-1) RP11-412P11 (Alu)	3,0e ⁻⁶¹ 1,0e ⁻⁸⁹

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
415	291	145-307	1-150	TACACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	6,0e ⁻⁵³
	295	1-267	246-391	ACCAACCCCAATCGAACC AACC	12	RP11-626I20 (Alu)	1,0e ⁻⁴³
420	297	1-639	637-716	CCC	1	RP11-223A3 (Indeterminado)	3,0e ⁻¹⁷
	299	1-258	241-509	CCAACCCCAATCGAACC	1, X	RP11-223A3 (Indeterminado) RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁵ 2,0e ⁻⁵⁷
	301	1-589	573-709	ATTACACCAACCCCAA	5	RP1-161J9 (Alu)	3,0e ⁻⁴⁶
	302	1-306	293-443	CCCCAATCGAACC	1, X	OR1-17 (Gene) RP13-444K19 (LINE-1)	7,0e ⁻¹⁷ 2,0e ⁻³⁰
	305	1-107	101-502	TACACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁸⁸
	409	310	1-205/ 459-752	206-463	TTTGA	6	RP11-388H7 (LINE-2)
	311	1-290	278-823	GGGGGTTTCATTC	4	RP11-454O15 (LINE-1)	0
	313	1-297	278-744	TGGGAGGGGGGGTCAAA TG	13	RP11-268K3 (LINE-1)	0
	314	1-427	422-1109	GGTCAA	4	RP11-19F13 (LINE-1)	0
408	315	1-289	269-560	ACACCAACCCCAATCGA ACC	10	RP11-288G11 (Indeterminado)	4,0e ⁻¹³⁵

	Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
						Cromossomo	Locus	
	407	321	1-78	62-528	CCCCAATCGAACCCCA	2	RP11-788A1 (ilha CpG)	0
		324	284-704	1-292	ATACACC	10	RP11-551P18 (LINE-1)	6,0e ⁻¹⁰²
		325	1-288/ 540-654	285-545	AACC/ TACACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	9,0e ⁻⁶⁸
	410	326	1-263	256-311	ATCGAACC	10	RP11-315M8 (Indeterminado)	4,0e ⁻¹⁷
	393	393	257-372	1-263/ 359-479	ACACCAA/ CCCTCCCAAACCA	X,8	RP13-444K19 RP11-16M2 (LINE-1)	1,0e ⁻³⁷
Família C	466	130	1-136	126-395	CCAATCGAACC	Y	RP11-292P9 (LINE-1)	4,0e ⁻¹³³
		131	1-414	406-832	AATCGAACC	14	R-111A21 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁰¹
	414	169	1-360	348-572	CTCGCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁷
	457	135	1-642	623-749	ACACCAACCCCAATCGAA CC	7	CTD-2523K17 (LINE-1)	2,0e ⁻⁴⁷
	461	140	1-286	274-416	CCCAATCGAACCC	7	RP11-494A9 (ERV1)	3,0e ⁻⁵⁸
		142	1-285	266-350	ACACCAACCCCAATCGAA CC	10	RP11-315M8 (Indeterminado)	6,0e ⁻¹⁹
		143	1-283	276-368	ATCGAACC	1	RP11-438I12 (MaLR)	3,0e ⁻³²
		146	1-353/ 504-786	344-508	CCCTCCCAA/ GGTT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻³¹
	470	117	1-360	346-446	CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻³¹

	Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
						Cromossomo	Locus	
Família D		119	1-325	311-562	GAGATGCATAAATTT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁶²
	471	126	1-285	270-341	CAACCCCAATCGAACC	1	olfactory receptor OR1-17 gene	2,0e ⁻²⁰
		128	1-360	346-438	CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	6,0e ⁻³⁴
	479	21	1-291	279-415	CCCAATCGAACCC	7	RP11-494A9 (Indeterminado)	4,0e ⁻⁵⁷
		22	1-274	263-312	CCAATCGAACCC	7	RP4-718N17 (MIR)	2,0e ⁻¹⁵
		25	1-281	267-723	CCCCAATCGAACCCC	9	RP11-55J24 (LINE-1)	0
	478	333	1-137/ 281-348	129-293	CCCTCCCAA/ TTGATGTTGGTTC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	7,0e ⁻³⁴
		334	1-41/ 86-470	38-97	CGGT/ GTAGGGTTCGAT	10	RP11-315M8 (MER)	5,0e ⁻¹⁸
		335	1-362	359-526	AACC	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻²³
	452	340	1-285/ 371-535	268-374	ACCAACCCCAATCGAACC/ TGGG	12	RP11-626I20 (Alu/LINE-2)	8,0e ⁻⁴²
	346	196-310	1-197/ 295-395	CT/ CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁵⁴	
454	351	1041-1295	1-1047/ 1289-1403	TTGGGAG/ TGGTGTA	6, X	RP11-593A16 (Alu) RP13-444K19 (LINE-1)	0 5,0e ⁻⁴²	
Família E	445	357	119-188	1-126/ 180-328	TACACCAA/ GAGATGCAT	X	RP13-444K19 (LINE-1)	2,0e ⁻⁴⁰
		360	1-284/ 344-395	277-350	ATCGAACCC/ CCGGAGA	10	RP11-315M8 (Indeterminado)	4,0e ⁻¹⁹

Paciente	Clone	kDNA	LINE-1	Micro-Homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
446	363	69-186	1-74/ 172-670	TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA	X, 8	RP13-444K19 KB1967D12 (LINE-1)	9,0e ⁻¹⁶ 5,0e ⁻¹²⁹
	364	1-436/ 538-591	419-541	ACCAACCCCAATCGAACC/ GGAG	12	RP11-626I20 (Alu/LINE-2)	3,0e ⁻⁴¹
441	369	1-76	68-302	CCCTCCCAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	5,0e ⁻⁵⁴
	370	1-73	66-123	CACCCTCC	5	RP11-478P10 (LINE-1)	4,0e ⁻¹⁸
442	371	1-383	369-532	CCCTCCCAAGACTAA	X	RP13-444K19 (LINE-1)	1,0e ⁻⁵¹
	379	1-275	266-493	GGGGGGTTCA	22	RP11-142N15 (LINE-1)	2,0e ⁻¹⁰⁷
433	381	1-279	277-834	GTC	2	RP11-580J2 (LINE-1)	0
	382	1-286	267-839	CACCAACCCCAATCGAAC C	6	RP3-495O10 (LINE-1)	0
	383	1-271	255-815	CCAACCCCAATCGAACC	10	RP4-576A20 (LINE-1)	0
	386	1-304	292-757	CCCCAATCGAACC	14	R-254P21 (Alu)	0
	392	1-326	325-516	CA	11	RP11-222N13 (LINE-1)	5,0e ⁻⁶³


```

Query 727      ACGCTACTATAAAGACACATGCACACGTATGTTTATGTGGCACTATTCACAATAGCAA 786
                |||
Sbjct 101626   ACGCTACTATAAAGACACATGCACACGTATGTTTATGTGGCACTATTCACAATAGCAA 101685

Query 787      GACTTGAACCAACCCAAATGTCCATCAGTGATAGACTGGATTAAGAAAATGTGGCACAT 846
                |||
Sbjct 101686   GACTTGAACCAACCCAAATGTCCATCAGTGATAGACTGGATTAAGAAAATGTGGCACAT 101745

Query 847      ATACACCATGGAATACTATGCAGCCACAAAAAGGATGAGAGTTCATGTCCCTTGTAGGG 906
                |||
Sbjct 101746   ATACACCATGGAATACTATGCAGCCACAAAAAGGATGAGAGTTCATGTCCCTTGTAGGG 101805

Query 907      ACATGGATGAAGCTGGAAACCATCATCTCGAGCAAGCTATCGCAAAGACAGAAAACAAA 966
                |||
Sbjct 101806   ACATGGATGAAGCTGGAAACCATCATCTCGAGCAAGCTATCGCAAAGACAGAAAACAAA 101865

Query 967      CACCACATGTTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAATAATGAGAGCACTTGGACACCAGGCA 1026
                |||
Sbjct 101866   CACCACATATTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAATAATGAGAGCACTTGGACACCAGGCA 101925

Query 1027     GGGAACATCACACACCAGGGCCTGTCGTGGGGTGTGAGGAGAGGGGAGGGACAGCATTAG 1086
                |||
Sbjct 101926   GGGAACATCACACACCAGGGCCTGTCGTGGGGTGTGAGGAGAGGGGAGGGACAGCATTAG 101985

Query 1087     GAGAAATACCTAATATAAATGATAAGTTAGTGGGTGCAGCACACCAACATGGCACATGTA 1146
                |||
Sbjct 101986   GAGAAATACCTAATATAAATGATAAGTTAGTGGGTGCAGCACACCAACATGGCACATGTA 102045

Query 1147     TACATATGTAACAAACCTGCACATTGTGCACATGTACCCTAGGACTTAAAGTATAATTTT 1206
                |||
Sbjct 102046   TACATATGTAACAAACCTGCACATTGTGCACATGTACCCTAGGACTTAAAGTATAATTTT 102105

Query 1207     aaaaaaaaaGAGAGGGAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAGCTCC 1266
                |||
Sbjct 102106   AAAAAAAGAGAGGGAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAACCTCC 102165

Query 1267     CA 1268
                ||
Sbjct 102166   CA 102167

```

Figura 14:

[gb|EU088388.1](#) Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone A8 minicircle, partial sequence; kinetoplast Length=328

Expect = 2e-121, Identities = 241/245 (98%), Gaps = 0/245 (0%)

```

Query 16      ACCCCAATTCCAACCAACATTCAACACAAACAACCCATACCTTACCTACAATAAGATTAT 75
                |||
Sbjct 84      ACCTCAATTCCAACCAACATTCAACACAAACAACCCATACCTTACCTACAATAAGATTAT 143

Query 76      AATATTGAACTTACACTAACTATAACAACATTAAACAatcatcatcacctcatttatcatc 135
                |||
Sbjct 144     AATATTGAACTTACACTAACTATAACAACATTAAACAATCATCATCACCTCACCTATCATC 203

Query 136     atcactgtataactaactatataatcactatcacctcaGTACATAACCACAAAATATAAAAAC 195
                |||
Sbjct 204     ATCACTGTATACTAACTATATATCACTATCACCTCAGTACATAACCATAAATATAAAAAC 263

Query 196     TATAAATACATTAAAACTGTATCTCTACCCACAGCCCTTATATTACCCAACCCCAATC 255
                |||
Sbjct 264     TATAAATACATTAAAACTGTATCTCTACCCACAGCCCTTATATTACCCAACCCCAATC 323

Query 256     GAACC 260
                |||
Sbjct 324     GAACC 328

```


[gb|EU088390.1|](#) Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone C5 minicircle
Expect = 9e-10; Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)

```
Query 216 CCCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 244
          |||
Sbjct 298 CCCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 326
```

Expect = 0.003; Identities = 19/20 (95%), Gaps = 0/20 (0%)

```
Query 1 GAAGGCCCTCCCAAACCA 20
        |||
Sbjct 45 GAAGGCCCTCCCAAACCA 64
```

Figura 17:

[emb|AL049875.2|CNS00000](#) **D** Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-111A21
of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens

Expect = 5e-109; Identities = 227/230 (98%), Gaps = 0/230 (0%)

```
Query 1 AATCGAACCAACATTGATTAAAGAGTTAAATCTAAGACCCAAAACCTATGAAACTACTAGA 60
          |||
Sbjct 99133 AATCAAACCAACATTGATTAAAGAGTTAAATCTAAGACCCAAAACCTATGAAACTACTAGA 99074

Query 61 AGAAAACATTGGGGAAACACTCCATGACATTTATCTGGGCAAACCTTTTTGTGCAAAATG 120
          |||
Sbjct 99073 AGAAAACATTGGGGAAACACTCCATGACATTTATCTGGGCAAACCTTTTTGTGTAATAATG 99014

Query 121 TCAAAAGCATACTCAACCAAAAACAAAATAGACAAATGGAATTATATCAAGTTACAAAGC 180
          |||
Sbjct 99013 TCAAAAGCATACTCAACCAAAAACAAAATAGACAAATGGAATTATATCAAGTTACAAAGC 98954

Query 181 TTCCGGGGGAGCAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAG 230
          |||
Sbjct 98953 TTCCGGGGGAGCAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAG 98904
```

[emb|AL450466.8|](#) **D** Human DNA sequence from clone RP11-315M8 on chromosome 10
Contains a CpG island,

Expect = 4e-19; Identities = 58/60 (96%), Gaps = 0/60 (0%)

```
Query 1 CTCCCATCAAAGTTCTTTTAAATAATGAACCTCCTTAGTGCATTTCAAGTAGGGTTCGAT 60
          |||
Sbjct 25826 CTCCCTACAAAGTTCTTTTAAATAATGAACCTCCTTAGTGCATTTCAAGTAGGGTTCGAT 25885
```

[gb|AF114153.1|AF114153](#) Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA

Expect = 1e-14; Identities = 38/38 (100%), Gaps = 0/38 (0%)

```
Query 242 CACCAAACCTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 279
          |||
Sbjct 109 CACCAAACCTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 146
```

Expect = 1e-14; Identities = 38/38 (100%), Gaps = 0/38 (0%)

```
Query 242 CACCAAACCTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 279
          |||
Sbjct 290 CACCAAACCTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 327
```

Figura 18:

[gb|AC004988.2](#)  Homo sapiens PAC clone RP5-1178G13 from 7

Expect = 1e-126; Identities = 267/275 (97%), Gaps = 0/275 (0%)

```
Query 1 ATCACACTCTGGGGACTGTGGTgggggtcgggggaggggggagggATAGCATTGGGAGATA 60
      |||
Sbjct 159455 ATCACACTCTGGGGACTGTGGTGGGGTGCGGGGAGAGGGGAGGGATAGCATTGGGAGAGA 159514

Query 61 TACCTAATGCTAGATGACGCGTTAGTGGGTGCAGCGCACCAGCATGGCACATGTATACAT 120
      |||
Sbjct 159515 TCCCTAATGCTAGATGACGAGTTAGTGGGTGCAGCGCACCAGCATGGCACATGTATACAT 159574

Query 121 ATGTAACTAACCTGCACAATGTGCACATGTACCCTAAAACCTAAAAGTATaaaaaaaaaaaa 180
      |||
Sbjct 159575 ATGTAACTAACCTGCACAATGTGCACATGTACCCTAAAACCTAAAAGTATAAAAAAAAAAAA 159634

Query 181 aagtaaaaaaaaaaaaaTATGATGTAAAATCCCAATATATTATCTGTCTACCCAAGTCA 240
      |||
Sbjct 159635 AAGTAAAAAAAAAAAAATATGATGTAAAATCCCAATATATTATCTGTCTACCCAAGTCA 159694

Query 241 TCTCTACCATAATTATGAAATGTGAACGCCCTCC 275
      |||
Sbjct 159695 TCTCTACCATAATTATGAAATGTGATCGCCCTCC 159729
```

[gb|BC001197.1](#) Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide, mRNA

Expect = 0.0; Identities = 1330/1332 (99%), Gaps = 1/1332 (0%)

```
Query 316 CTGAGAGATCCCCTCATAATTTCCCAAAGCGTAACCATGTGTGAATAAATTTTGTAGCTA 375
      |||
Sbjct 887 CTGAGAGATCCCCTCATAATTTCCCAAAGCGTAACCATGTGTGAATAAATTTTGTAGCTA 946

Query 376 GTAGGGTTGCAGCCACGAGTAAGTCTTCCCTTGTATTGTGTAGCCAGAATGCCGCAAAA 435
      |||
Sbjct 947 GTAGGGTTGCAGCCACGAGTAAGTCTTCCCTTGTATTGTGTAGCCAGAATGCCGCAAAA 1006

Query 436 CTTCCATGCCTAAGCGAACTGTTGAGAGTACGTTTCGATTTCTGACTGTGTTAGCCTGGA 495
      |||
Sbjct 1007 CTTCCATGCCTAAGCGAACTGTTGAGAGTACGTTTCGATTTCTGACTGTGTTAGCCTGGA 1066

Query 496 AGTGCTTGTCCCAACCTTGTTCCTGAGCATGAACGCCCGCAAGCCAACATGTTAGTTGAA 555
      |||
Sbjct 1067 AGTGCTTGTCCCAACCTTGTTCCTGAGCATGAACGCCCGCAAGCCAACATGTTAGTTGAA 1126

Query 556 GCATCAGGGCGATTAGCAGCATGATATCAAACGCTCTGAGCTGCTCGTTCGGCTATGGC 615
      |||
Sbjct 1127 GCATCAGGGCGATTAGCAGCATGATATCAAACGCTCTGAGCTGCTCGTTCGGCTATGGC 1186

Query 616 GTACGCCTAGTCCGTAGGCAGGACTTTTCAAGTCTCGGAAGGTTTCTTCAATCTGCATTC 675
      |||
Sbjct 1187 GTAGGCCTAGTCCGTAGGCAGGACTTTTCAAGTCTCGGAAGGTTTCTTCAATCTGCATTC 1246

Query 676 GCTTCGAAATAGATATTAACAAGTTGTTTGGGTGTTTCGAATTTCAACAGGTAAGTTAGTT 735
      |||
Sbjct 1247 GCTTCGAA-TAGATATTAACAAGTTGTTTGGGTGTTTCGAATTTCAACAGGTAAGTTAGTT 1305

Query 736 GCTAGAATCCATGGCTCCTTTGCCGACGCTGAGTAGATTTTAGGTGACGGGTGGTGACAA 795
      |||
Sbjct 1306 GCTAGAATCCATGGCTCCTTTGCCGACGCTGAGTAGATTTTAGGTGACGGGTGGTGACAA 1365

Query 796 TGAGTCCGTGTCGAGCGCTGATTTTTCGGCCTTTAGAGCGAGATTTATACAATAGAATT 855
      |||
Sbjct 1366 TGAGTCCGTGTCGAGCGCTGATTTTTCGGCCTTTAGAGCGAGATTTATACAATAGAATT 1425

Query 856 TGGCATGAGATTGGATTGCTTTTGTAGTCAGCCTCTTATAGCCTAAAAGTCTTTGAGTACTA 915
      |||
Sbjct 1426 TGGCATGAGATTGGATTGCTTTTGTAGTCAGCCTCTTATAGCCTAAAAGTCTTTGAGTACTA 1485
```

```

Query 916 GATGACATATCATGTAAGTTGCTGATAGGTTTCCAGTTTTCCGCTCCTAGGTCTGCATAT 975
          |||
Sbjct 1486 GATGACATATCATGTAAGTTGCTGATAGGTTTCCAGTTTTCCGCTCCTAGGTCTGCATAT 1545

Query 976 TGTACTTTTCTCTTACTCGACTTAACCAGTACCAACCCAGCTTCTCAACGGATTTATAC 1035
          |||
Sbjct 1546 TGTACTTTTCTCTTACTCGACTTAACCAGTACCAACCCAGCTTCTCAACGGATTTATAC 1605

Query 1036 CATGGCACTTTAAAGCCAGCATCACTGACAATGAGCGGTGTGGTGTACTCGGTAGAATG 1095
          |||
Sbjct 1606 CATGGCACTTTAAAGCCAGCATCACTGACAATGAGCGGTGTGGTGTACTCGGTAGAATG 1665

Query 1096 CTCGCAAGGTCGGCTAGAAAATTGGTCATGAGCTTTCTTTGAACATTGCTCTGAAAGCGGG 1155
          |||
Sbjct 1666 CTCGCAAGGTCGGCTAGAAAATTGGTCATGAGCTTTCTTTGAACATTGCTCTGAAAGCGGG 1725

Query 1156 AACGCTTTCTCATAAAGAGTAACAGAACGACCGTGTAGTGC GACTGAAGCTCGCAATACC 1215
          |||
Sbjct 1726 AACGCTTTCTCATAAAGAGTAACAGAACGACCGTGTAGTGC GACTGAAGCTCGCAATACC 1785

Query 1216 ATAAGCCGTTTTTGTCTCACGGATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTG 1275
          |||
Sbjct 1786 ATAAGCCGTTTTTGTCTCACGGATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTG 1845

Query 1276 CCCGAACAGATAAAGCTAGCATGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGA 1335
          |||
Sbjct 1846 CCCGAACAGATAAAGCTAGCATGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGA 1905

Query 1336 CGATTACCTAACAATCGGTCGATTCGTTTGATGTTATGTTTGTCTCGCTTTGGTTGGC 1395
          |||
Sbjct 1906 CGATTACCTAACAATCGGTCGATTCGTTTGATGTTATGTTTGTCTCGCTTTGGTTGGC 1965

Query 1396 AGGTTACGGCCAAGTTCGGTAAGAGTGAGAGTTTTACAGTCAAGTAAGGCGTGGCAAGCC 1455
          |||
Sbjct 1966 AGGTTACGGCCAAGTTCGGTAAGAGTGAGAGTTTTACAGTCAAGTAAGGCGTGGCAAGCC 2025

Query 1456 AACGTTAAGCTGTTGAGTCGTTTTAAGTGTAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGAGTCG 1515
          |||
Sbjct 2026 AACGTTAAGCTGTTGAGTCGTTTTAAGTGTAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGAGTCG 2085

Query 1516 TGTAAAATATCGAGTTCGCACATTTTGTGTCTGATTATTGATTTTGGCGAAACCATT 1575
          |||
Sbjct 2086 TGTAAAATATCGAGTTCGCACATTTTGTGTCTGATTATTGATTTTGGCGAAACCATT 2145

Query 1576 GATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACCTAATGATTTTGATAAAAAATCATTAGGG 1635
          |||
Sbjct 2146 GATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACCTAATGATTTTGATAAAAAATCATTAGGG 2205

Query 1636 GATTCATCAGTA 1647
          |||
Sbjct 2206 GATTCATCAGTA 2217

```

[emb|AJ748073.1](#) Trypanosoma cruzi marinkellei kinetoplast minicircle, strain B3, isolate Tm_04

Expect = 8e-07; Identities = 39/42 (92%), Gaps = 0/42 (0%)

```

Query 198 TCCTTAAACCACCCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 239
          |||
Sbjct 42 TCCTAATAACCACAATCTATATTACACCAACCCCAATCGAACC 1

```

ANEXO IV

Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
129	101	MHLPRTLFWDFRGA FMGGVRLGLV	Não possui similaridade significativa	--
287	40	MHLPRTLYKGISPVHYTSP PPYIMHLPRTL CISPV HYACYWFIEGFTSSWFSL	Não possui similaridade significativa	--
	78	MLRSVYSVLR CWF DWGWCNI CRNS	gb AAB59368.1 ORF2 contains a reverse transcriptase domain. [Homo sapiens]	6,0e ⁻⁶
405	79	MSILQPTPIEPT YQLSINFLQFLNYQPGIVVHAW NPSTLGGQSRKTAWWQEFKNSLGNIAREHLLK	gb EAX08712.1 hCG2020499 [Homo sapiens]	7,0e ⁻⁴
	87	MNL LSAFQ VGF DWGWCNI GCVD LGYI	Não possui similaridade significativa	--
	89	METKAVRIFKFP GIVYPESFLGFD DWGWCNI GCVD LGYT	Não possui similaridade significativa	--
	44	MYPKSTHPILHQPQSN PVFLHIHGTQCCHALIRP GSALHPLIQSFHWTQHTYTSQDLTP	Não possui similaridade significativa	--
	47	MYPKSHPI LHQPPIEPT TASSREGWAKAQKCLAD LKTGGGYSRESH	Não possui similaridade significativa	--
48	MEIASVRFYTRDNQKTPVVYSKFLFLCLEFSAD LGGVRLISGGFVRESKGS MGVGI	Não possui similaridade significativa	--	
91	MYPKSTHPILHQPQSN QNKTYKGMLS SLNPRGEKL NRTVL	Não possui similaridade significativa	--	
93	MYPKSTHPISHQPQSN QEEIENLNETIMNN	Não possui similaridade significativa	--	

Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value	
Família A	389	152	1) MHLTRTLYGRKMGGGLFTGGEVRLGLVYVYQSL LLVYSEIQLLPGLVVLGGCMCIRACYWSIQ	Não possuem similaridade significativa	--
		2) MCPGIYPFLNFLVRLGLVYVYQSLLLVYSE TQLPPGLVVLGGGFKFGPEKSCISPVHYMAEKWGV CLREVRFDWGWCMCIRACYWSIQRFNFFLV			
	386	156	MYPKSTHPILHQPQSNPVL PFLSASQNFHGRGAK NPVFS	Não possui similaridade significativa	--
		160	MYPKSTHPILHQPQSNLILQRVTMPREKKSFS QKQI	Não possui similaridade significativa	--
	385	161	1) MIFRAQIWPLPRLNQEVEESLNRPI TGSDTHT PTPIEPYCLILH	Não possuem similaridade significativa	--
		177	2) MENQAIRFDWGWCMCIRACYWSIQRLN FLLV	Não possui similaridade significativa	--
	399	185	MEGFPPCFPPSSFISFWFLDLTLFNGFDWGCN IKKVS GISRIMVDITYGICLG	Não possui similaridade significativa	--
		186	MVKIGKWWFWEHDFSGPNLNAPKTKPGRS	Não possui similaridade significativa	--
	385	186	1) MCRGATSAKSQDTKSMYKNHKHSYTPTPIEPH LP	Não possui similaridade significativa	--
		195	2) MHLPRTL FGRKGGCLREVRFDWGCNIRMLVI FVH		
199		MHKFLDTHNL PRLNQEVEESLNRPI TGSDTHTPSQ D	pir B34087 hypothetical protein (L1H 3' region) - human	3,0e ⁻⁶	
	200	MLVVLGGGVIRDIGLKFSFFAVSLPGFGFRMMLAS	Não possui similaridade significativa	--	
		MVGVVVYGGWLRGWC GIRNCWFEGGSTSSWFSLG RGVQIWAGKIMHLTRTLCISPVHYTSPPYIMHLT RTLYKGISPVHYTSPPYIMHL PRTL CISP VHYAC YWFIEGFNFFLV	Não possui similaridade significativa	--	

Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
387	229	MSAQHWVPWMC RNTGFDWGCNIRRLVD	Não possui similaridade significativa	--
403	235	METKAVRIFKFP GIVYPESFLGFDWGCNIRRLVD	Não possui similaridade significativa	--
	236	MRKKQIDICKTKTKKKKILKATDPPSQNQIS	Não possui similaridade significativa	--
516	239	MYSCYTDIASPPYIIVLGGAFKFGPENSCISPVH YGFGRGGQIWAGKFMHLPRTLWFWEGP	Não possui similaridade significativa	--
	240	1) MAENGGCLREVRFDWGC MCIRACYWSIQRLN FFLV	Não possuem similaridade significativa	--
	243	2) MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSL LVYSEQLLPGLVVLGGCMCIRACYWSIQRFNFFLV	Não possui similaridade significativa	--
400	247	MAENGGCLREVRFDWGC IQRNFFLV	Não possui similaridade significativa	--
	248	MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSLILV YSEIQLPPGLVVLGGCMCIRACYWSIQRFNFFLV MCIRACYWSIQRLNFFLLFSLGRVYVYQSLLLVYS EIQLPPLVVLGGAFKFGPEKSCISPVHYMAENGG CLREVRFDWGCNIGGCWVEFIDL MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSLLLV	Não possui similaridade significativa	--
484	268	MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSLLLV YSEIQLLPGLVVLGGCMCIRACYWSIQRLNFFLLV GGA	Não possui similaridade significativa	--
485	273	MHEFPPQKLTPTPTLGLQLPSPYMTPTPIEPTSK NTINTST	Não possui similaridade significativa	--
486	280	MQDVKHSLMSASYNIKYYYWIGDNLFVGSIGVGV I	Não possui similaridade significativa	--
	282	MAENGGCLREVRFDWGC MCIRACYWSIQRFNSI LV	Não possui similaridade significativa	--

Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value	
Família B	487	287	MHEFPPQKLTPTPTLSGLQLPPPYITPTPIEPNI HFVQHYTNPNRNTNIGEHCKHF	Não possui similaridade significativa	--
		289	MSQYIYTCYLIFKPKQSLILHQPQSNRIYILFSTT PTPIEPNIHFVQHYTNPNRTSPPVNNPHFRPYNV RVRCINF ^W TH ^T TS ^Q D	Não possui similaridade significativa	--
	416	211	MCQGIYPFLLDFLAYLHRGVCSILQHLLLNRESF PYCWFWEGRSNLGRKNQASHPYIIQGHLTRTL ^Y I APVHYASPPYIMHLTRTL ^{CLLSVY}	Não possui similaridade significativa	--
		212	MVTEYEVWKFVKYWFWEGPSLNELGRRPFFQLFG IVSEGMVPAPL	Não possui similaridade significativa	--
	411	217	1) <u>MHLTRTLWFWEGRSTFGVEIHASHPYIMVLGG</u> AFNFWGGNSCISPVHYGFGRGVQSGVRDPLKEA VCPFSDLQLRAGR ^T TALFKAQMEMQKSPVFCVAH AGDCRP 2) <u>MHLTRTLWFWEGRSTFGVEIHASHPYIMVLGG</u> GFRGQ ^G SG ^T HLRRQSARSQISSCVLGEPLLSKSL RWKCRNHPSSASLT ^{LG} TVD	Não possuem similaridade significativa	--
	415	291	MYIRFDWGC ^{MCIRACYWSIQRFN} FLLV	Não possui similaridade significativa	--
	420	297	MGAVDRRVSGAPKTKP ^{GLTEERMDKNVAVGSIG} V	Não possui similaridade significativa	--
		299	MHEFPPQKLTSTPTLSGLQLPSPYITPTPIEPTA TFLSILSSVSPGLVVLGG ^{MCIRACYWSIQRFN} FF LV	Não possui similaridade significativa	--
		301	MHEFPPQKLTPTPTLSGLQLPSPYITPTPIEPLN KSL ^{LKQ}	Não possui similaridade significativa	--
		302	MYGEMHEFPPQKLTPTPTLSGLQLPSPYITPTPI EPPFRSLSSP ^{LSLIPGLVVLGECM} GIRACYWSIQ ^R LN ^{FL} LV	Não possui similaridade significativa	--

Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value	
409	311	MGAVDRRTWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMVLGGG FIHDLALCLSIVGVKGC	Não possui similaridade significativa	--	
	314	MQIKTTMRYHLTPVRMAIIKKSGNNRCWRGCGEI GTLLEHCWWDCKVVQPLWKTWVQFLKDLELEIPFD RPSQNQIPPDFLTSKFHRQISNPHYFNHHP	pir B34087 hypothetical protein (L1H 3' region) - human	4,0e ⁻³⁶	
408	315	MHSCLWGSIGGCWNIGLVRMDTDKMKYRMCIDSL IGMYCMDLNM	Não possui similaridade significativa	--	
407	324	MYLPRTLFGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSLLLV YSEIQLLPGLVVLGGCMCPGMHLFLLDLFLVYVHID IYNIL	Não possui similaridade significativa	--	
	325	MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSPLL YSKIQLLPGLVVLGGCMCIRACYWSVQRLNFFLV	Não possui similaridade significativa	--	
393	393	M CIRACYWSIQRLNFLVLGGAFKFGPEKSCISP VQYMAENGGCLREVRFDWGWCIQRFNFFLV	Não possui similaridade significativa	--	
Família C	466	MVRLGLVYVYQSLLLVYSETQLPPGLVVLGGGFKF GPEKSCISPVH	Não possui similaridade significativa	--	
	457	METKAVRIFKFPGIVYSPESFLGFDWGCN	Não possui similaridade significativa	--	
	461	140	MNMNLYYITPTPIEPCLTIQIVCEPKFSWTWKE PRL	Não possui similaridade significativa	--
		142	MNMNLYYITPTPIEPLYKCTKEVHYLKELCWGL	Não possui similaridade significativa	--
	143	MYTILTTSTHTKNMNMNLYYITPTPIEPKSSRI VSFD	Não possui similaridade significativa	--	
Família D	478	MNFRAQITPLPRLNQEVEESLNRPIITGSDTHTPS QD	gb AAC51264.1 putative p150 [Homo sapiens]	0.013	
	334	MHEFPPQKLTPTPTLSGLQLPSYITPTPIEPLY KCTKEVHYLKELCWEL	Não possui similaridade significativa	--	

	Paciente	Clone	Proteína Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
Família E	452	346	<u>MA</u> ENGDCLEVRFDWGC <u>SL</u> LLLVYSETQLLPGLV <u>LGGCMCIRACYWSIQRFNFFLV</u>	Não possui similaridade significativa	--
	445	357	<u>MHLTR</u> TLTCGRKWGLFTGGEVRLGLVY <u>SEIQ</u> LLPG <u>LVLGGYGMVCFVS</u>	Não possui similaridade significativa	--
		360	<u>MNLLSAFQVG</u> FDWGC <u>RVRLGWCNIRRLVD</u>	Não possui similaridade significativa	--
	446	363	<u>MHLPR</u> LYGRKWGLFTGGEVRLGLVY <u>VYQS</u> LLLV <u>SEIQ</u> LPPGFGRGL	Não possui similaridade significativa	--
		364	<u>MPVILSTLGA</u> VDRRIHASHPYVMVLGGGVN	Não possui similaridade significativa	--
	442	381	<u>MEKEGILPNSFY</u> EASIIILIPKPGRDTTKKNFRA ISLMNIDAKIFNKILANRIQQHIKKLIHHDQVGF IPGMQSWFNIRKSINVIQHITRTKDKNHMIISID <u>AEKAFDKIQ</u> QPFMLKTLNKL <u>GIDPPSQNQSNRIF</u> <u>NTEY</u> LLLLYQIRKTN	gb AAC51269.1 putative p150 [Homo sapiens]	4,0e ⁻⁶³
	433	383	<u>MSSTLFNHMPNITPTPIEP</u> ICVFNVARFYPTRED TKQNHAWSLPSRN	Não possui similaridade significativa	--
		392	<u>MYTYVTNLHNV</u> KPPPKTKIFGGPNLKPTPKTTIS DNFRPLNTP	Não possui similaridade significativa	--

(*) Os aminoácidos oriundos da seqüência de kDNA estão em azul, e os oriundos da seqüência humana estão em verde. Motivos comuns de nossas seqüências encontram-se sublinhados.