



FACULDADE DE MEDICINA
LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR



Marina Dias Marques

**Impacto da Ativação do Retroelemento LINE-1 na Resposta
Imune Durante a Infecção por *Trypanosoma cruzi***

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Brasília - DF

2025

MARINA DIAS MARQUES

**Impacto da Ativação do Retroelemento LINE-1 na Resposta
Imune Durante a Infecção por *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como pré-requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Mariana Machado Hecht

Brasília - DF

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D541i Dias Marques, Marina
Impacto da Ativação do Retroelemento LINE-1 na Resposta Imune Durante a Infecção por Trypanosoma cruzi / Marina Dias Marques; orientador Mariana Machado Hecht. -- Brasília, 2025.
88 p.

Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2025.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Retroelemento LINE-1. 4. Inflamação. 5. Resposta autoimune. I. Machado Hecht, Mariana, orient. II. Título.

MARINA DIAS MARQUES

**Impacto da Ativação do Retroelemento LINE-1 na Resposta Imune
Durante a Infecção por *Trypanosoma cruzi***

Banca Examinadora

Dra. Mariana Machado Hecht (Orientadora)
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Enrique Roberto Argañaraz (Membro Interno)
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Rinaldo Wellerson Pereira (Membro Externo)
Universidade Católica de Brasília (UCB)

Amandda Evélin Silva de Carvalho (Suplente)
Universidade de Brasília (UnB)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC), Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

A Pedra

O distraído nela tropeçou.
O bruto a usou como projétil.
O empreendedor, usando-a, construiu.
O camponês, cansado da lida, dela fez assento.
Para meninos, foi brinquedo.
Drummond poetizou.
Já David matou Golias.
E Leonardo extraiu-lhe a mais bela escultura...

Em todos estes casos, a diferença não está na pedra, mas no homem!

(Autor desconhecido)

Aos meus pais, Maria Custódia e Marcos Wilson, por todo amor, apoio e dedicação que sempre me deram. Este trabalho é também um reflexo do que aprendi com vocês: a importância do esforço, da persistência e do amor em tudo o que fazemos. Obrigada por acreditarem em mim, por estarem ao meu lado em cada etapa e por me ensinarem tanto sobre a vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Mariana Hecht, que me acolheu desde o início da minha trajetória acadêmica, ainda na graduação, com meu projeto de iniciação científica. Sou profundamente grata por enxergar meu potencial e investir em mim. Crescer e aprender ao lado de alguém que admiro tanto é um privilégio imensurável. Obrigada por todo o apoio e por ser uma inspiração constante.

Às professoras Nadjar Nitz, Luciana Hägstrom, Dora Rabello e Juliana Lott, que sempre estiveram disponíveis para me orientar, esclarecer dúvidas e, acima de tudo, me confortar quando necessário. É um enorme privilégio fazer parte de um laboratório liderado por mulheres tão fortes e admiráveis, que me inspiram diariamente e em quem procuro me espelhar em cada passo da minha jornada.

Ao Bruno Dallago, que não apenas me auxiliou nas inúmeras análises estatísticas, mas também foi um amigo prestativo ao longo dessa jornada. Obrigada por todo o suporte e pela parceria. Que essa colaboração se estenda por muitos anos.

À banca examinadora, Enrique Argañaraz, Rinaldo Pereira e Amandda Evélin, agradeço por terem aceitado o convite de participar da construção deste sonho. Obrigada por contribuírem de forma tão significativa para a realização e conclusão dessa etapa tão importante da minha vida.

À Nayra Suélen, minha mãe científica, que tanto me ensinou ao longo desses anos. À Aline Silva, por toda a paciência e dedicação ao me auxiliar nas etapas de cultura celular. À Tatiana Shiroma, que me acompanhou na rotina do laboratório durante seus últimos meses no Brasil. À Tamires Vital, que sempre esteve pronta para ajudar em cada etapa dos experimentos, sem qualquer ressalva. Sem vocês, eu não teria adquirido a experiência e expertise que possuo hoje. Grande parte do conhecimento que detenho se deve à valiosa contribuição de cada uma de vocês.

À equipe excepcional do LabIBC — Peter Lee, Fábio William, Ananda Taba, Filipe Barbalho, Elias Luiz, Andressa Ribeiro, Marina Barcelos, Emañuella Garcez e Moisés Wesley —, que, além de serem parceiros de trabalho incríveis, sempre estiveram dispostos a me ajudar em qualquer desafio. Minha gratidão por tudo que fizeram!

À minhas incríveis amigas cientistas, Ludmilla Melanie, Maria Victória Souto, Ilana Mazzoleni, Vitória Pessoa e Stephani Barcelos. Quando decidi fazer o mestrado, nunca imaginei que ganharia um presente tão precioso quanto a amizade de vocês. Além de sempre me ajudarem com qualquer questão de trabalho, vocês estiveram ao meu lado em momentos

personais, oferecendo apoio e carinho incondicionais. Vocês se tornaram pessoas que quero levar para toda a vida. Amo muito cada uma e mal posso esperar pelas nossas próximas aventuras juntas!

Ao meu IC, Antonio Vitor, que rapidamente se tornou uma parte essencial da minha vida. Além de ser extremamente competente em tudo o que faz, você é aquele amigo para qualquer momento. Nossa conexão foi quase instantânea, e me sinto privilegiada por poder contar com você. Ao meu amigo de longa data, desde a graduação, e agora companheiro de mestrado, Edson Aliel. Você nunca deixou de me motivar e tornar os dias mais leves e divertidos. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

À FAPDF pela concessão da bolsa de estudos.

À minha melhor amiga, Giovana Kim, membro honorário do laboratório e peça fundamental nessa jornada. Obrigada por sempre apoiar minhas ideias mais loucas e planos mirabolantes, por consolar meu choro, incentivar meus sonhos e, ao mesmo tempo, me ajudar a manter os pés no chão. Essa conquista também é sua, não apenas pelas vezes que você me ajudou a pipetar amostras, mas principalmente porque você sempre me motiva a ser uma pessoa melhor. Eu te amo.

Ao meu namorado, Gabriel Balduino, que tem me ensinado que o amor pode ser leve e carinhoso, mas também arrebatador. Obrigada por ser um parceiro tão generoso e presente, e por sempre me valorizar de maneira tão genuína. Tenho muita sorte em te ter ao meu lado.

Aos meus queridos amigos – Tainá Moura, Ana Beatriz Sousa, Giovanna Vilasboa e Franco Diniz. Obrigada por estarem ao meu lado e me apoiarem do jeito que sou. Sem essa rede de apoio incrível, a jornada seria muito mais difícil e longa.

Por fim, mas não menos importante, ao meu grande alicerce: minha família, com destaque à minha mãe Maria Custódia e ao meu pai Marcos Wilson. Vocês sempre me deram tudo o que precisei, desde recursos até apoio emocional. Quero que este trabalho seja visto como um reflexo de vocês também, pois sem todo o carinho imensurável que recebi – não só durante a pós-graduação, mas desde o meu nascimento – nada disso seria possível. Meu amor por vocês é incondicional e inesgotável. Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja diretamente ou indiretamente. E agradeço a mim mesma por não ter desistido e por ter mantido o foco (nem sempre perfeito) até a conclusão dessa jornada.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é um importante problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas na América Latina. Apesar dos avanços em sua compreensão, aspectos fundamentais de sua patogênese ainda não estão totalmente elucidados. Um dos principais enigmas é que suas manifestações clínicas mais severas frequentemente ocorrem na fase crônica da doença, muitas vezes, décadas após a infecção inicial, em um contexto de baixa concentração de parasitos circulantes e de surgimento de respostas autoimunes. Neste estudo, investigamos a influência da ativação de retroelementos LINE-1 (L1) na promoção de respostas pró-inflamatórias e autoimunes durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Conduzimos experimentos *in vitro* para avaliar, por qPCR, a expressão de genes moduladores de L1 e indutores de produção de interferons em células HEK-293, tanto em sua forma competente quanto transfectadas para subexpressão de L1 pelo sistema CRISPR/dCAS-9. Além disso, foram realizados experimentos em modelo murino, incluindo análises de expressão gênica (qPCR), produção de autoanticorpos (ELISA) e inflamação em órgãos específicos (histopatologia). Os resultados obtidos indicam que a infecção por *T. cruzi* está associada a um aumento progressivo na expressão de L1. Esse aumento está correlacionado com a elevação na expressão de MOV-10, um forte inibidor de L1, em uma provável tentativa de controle do retroelemento. Observou-se também regulação por vias de reparo, com a inativação inicial de L1 mediada por XPA e MSH-2, seguida pela ativação subsequente promovida por ATM. Além disso, houve aumento na expressão de vias de detecção de RNA, como MDA-5 e RIG-1, que ativam a sinalização de interferons, levando à elevação na expressão de IFN- α e IFN- β . Paralelamente, a produção de IFN- γ também foi observada. No modelo murino, verificou-se um aumento na expressão de IFNs e TNF- α , associados à forte ativação de L1 no coração e intestino, órgãos frequentemente afetados pela DC. Esses fatores também se correlacionam com a produção de autoanticorpos, reforçando uma resposta imune relacionada à ativação de L1, independentemente da carga parasitária. Os achados reforçam a hipótese de que a patogênese da DC não se limita à persistência do parasito, mas também envolve mecanismos autoimunes que são ativados pelo patógeno durante a infecção. Esses fatores autoimunes desempenham um papel crucial nas manifestações clínicas tardias da doença, sugerindo que o autorreconhecimento do hospedeiro pode contribuir para a gravidade dos sintomas. Ademais, nossos achados abrem novas possibilidades para identificar alvos terapêuticos que poderiam ser explorados em investigações futuras, potencialmente melhorando a abordagem no tratamento desta complexa patologia.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, retroelemento LINE-1, interferons, inflamação, resposta autoimune

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a major public health concern, affecting millions of people in Latin America. Despite advancements in its understanding, fundamental aspects of its pathogenesis remain unresolved. One of the main enigmas lies in the fact that its most severe clinical manifestations often occur in the chronic phase of the disease, decades after the initial infection, in the context of low circulating parasite concentrations and the emergence of autoimmune responses. In this study, we investigated the influence of LINE-1 (L1) retroelement activation in promoting pro-inflammatory and autoimmune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. We conducted *in vitro* experiments to evaluate, via qPCR, the expression of genes that modulate L1 activity and induce interferon production in HEK-293 cells, both in their competent form and transfected to downregulate L1 expression using the CRISPR/dCas9 system. Additionally, *in vivo* experiments were performed using a murine model, including gene expression analyses (qPCR), autoantibody production (ELISA), and inflammation in specific organs (histopathology). The results obtained indicate that *T. cruzi* infection is associated with a progressive increase in L1 expression. This increase correlates with elevated MOV-10 expression, a potent L1 inhibitor, likely as an attempt to control the retroelement. Regulation via DNA repair pathways was also observed, with initial L1 inactivation mediated by XPA and MSH-2, followed by subsequent activation promoted by ATM. Furthermore, there was an increase in the expression of RNA-sensing pathways, such as MDA-5 and RIG-1, which activate interferon signaling, leading to elevated IFN- α and IFN- β expression. Parallely, IFN- γ production was also observed. In the murine model, increased expression of immune response genes and TNF- α was detected, particularly in the heart and intestine, organs commonly affected by CD. These factors also correlated with the production of autoantibodies, reinforcing an immune response linked to L1 activation, independent of parasite burden. These findings support the hypothesis that CD pathogenesis is not solely linked to parasite persistence but also involves autoimmune mechanisms triggered by the pathogen during infection. These autoimmune factors play a critical role in the late clinical manifestations of the disease, suggesting that self recognition mechanisms may contribute to symptom severity. Moreover, our findings open new avenues for identifying therapeutic targets that could be explored in future investigations, potentially improving the approach to treating this complex pathology.

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, LINE-1 Retroelement, Interferons, Inflammation, Autoimmune Response

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica da doença de Chagas
- Figura 2.** Mecanismos de patogênese da doença de Chagas
- Figura 3.** Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*
- Figura 4.** Danos ao DNA e vias de reparo em células de mamíferos
- Figura 5.** Resposta imunológica contra o *Trypanosoma cruzi*
- Figura 6.** A relação entre LINE-1 e o sistema de sinalização de interferon
- Figura 7.** Expressão gênica do retroelemento L1 *in vitro* ao longo do tempo
- Figura 8.** Expressão de genes inibidores da atividade de L1 *in vitro* ao longo do tempo
- Figura 9.** Expressão de genes associados à ativação de vias de reparo de DNA e capazes de modular a atividade de L1 *in vitro* ao longo do tempo
- Figura 10.** Expressão de genes associados à expressão de interferons *in vitro* ao longo do tempo
- Figura 11.** Expressão gênica de interferons *in vitro* ao longo do tempo
- Figura 12.** Avaliação da expressão gênica de LINE-1 *in vitro* após transfecção com o sistema CRISPR/dCas-9
- Figura 13.** Expressão de genes associados à atividade de LINE-1 *in vitro* em 48h
- Figura 14.** Quantificação absoluta de *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de camundongos Balb/C
- Figura 15.** Expressão gênica de L1 em diferentes tecidos de camundongos Balb/C, infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*
- Figura 16.** Expressão de genes associados à resposta imune em diferentes tecidos de camundongos Balb/C, infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*
- Figura 17.** Porcentagem de animais infectados que produziram anticorpos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*, baço, fígado, coração e intestino
- Figura 18.** Avaliação histopatológica em porcentagem de animais para detecção de infiltrado inflamatório
- Figura 19.** Cortes histológicos do tecido intestinal e cardíaco com imagens representativas dos diferentes grupos experimentais
- Figura 20.** Correlações entre carga parasitária, expressão gênica de TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ e LINE-1 e produção de autoanticorpos nos órgãos avaliados
- Figura 21.** Análise de componentes principais mostrando a associação entre a ativação do L1, a indução da resposta imune, a produção de autoanticorpos e a carga parasitária em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na reação de qPCR para células HEK-293, juntamente com a temperatura de anelamento utilizada no programa de reação

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na reação de qPCR para *Mus musculus*, juntamente com a temperatura de anelamento utilizada no programa da reação

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGES** – produtos de glicação avançada
- BER** – reparo por excisão de base (do inglês *base excision repair*)
- CCC** – cardiomiopatia chagásica crônica
- cDNA** – DNA complementar
- DC** – doença de Chagas
- DSB** – quebra de fita dupla (do inglês *double strand break*)
- dsRNA** – RNA de fita dupla (do inglês, *double strand RNA*)
- Et** – elemento transponível
- GIPL** – glicoinositolfosfolípídeo
- GPI** – glicosilfosfatidilinositol
- gRNA** – RNA guia
- HE** – hematoxilina e eosina
- HR** – recombinação homóloga (do inglês, *homologous recombination*)
- IFN** – interferon
- Ig** – imunoglobulina
- IL** – interleucina
- kDNA** – DNA do cinetoplasto
- L1** – LINE-1
- LES** – lúpus eritematoso sistêmico
- MMR** – reparo por erro no pareamento (do inglês *methylation mismatch repair*)
- NER** – reparo por excisão de nucleotídeo (do inglês *nucleotide excision repair*)
- NHEJ** – união de extremidades não homólogas (do inglês *non-homologous end joining*)
- NK** – células NK (do inglês, *natural killer*)
- PAMP** – padrão molecular associado a patógeno
- piRNA** – RNA que interage com Piwi
- RNP** – ribonucleoproteínas
- RNS** – espécie reativa de nitrogênio
- ROS** – espécie reativa de oxigênio
- RRP** – receptor de reconhecimento de padrão
- SS** – síndrome de Sjögren
- ssRNA** – RNA de fita simples (do inglês, *single strand RNA*)
- TGF** – fator de crescimento transformante (do inglês, *transforming growth factor*)

TLRs – receptor *Toll-Like*

TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, *tumoral necrosis factor*)

XPA – proteína xeroderma pigmentoso A (do inglês *xeroderma pigmentosum group A*)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	16
1. Aspectos gerais	16
2. Patogênese	18
2.1 Teorias da patogênese	18
2.2 Persistência do parasito.....	19
2.3 Autoimunidade	20
3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.1 Ciclo de vida	22
3.2 Interação patógeno-hospedeiro	24
3.2.1 Danos ao DNA.....	24
3.2.2 Genes de resposta imune	26
4. Retroelementos.....	30
4.1 Características e funcionamento.....	30
4.2 Associação com outros genes.....	32
4.3 Envolvimento com resposta imune	33
II. JUSTIFICATIVA	36
III. OBJETIVOS.....	37
1. Objetivo geral.....	37
2. Objetivos específicos.....	37
IV. METODOLOGIA.....	38
1. <i>In vitro</i>	38
1.1 Cultura de células e parasitos	38
1.2 Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
1.3 Grupos experimentais	39
1.4 Extração de RNA e RT-PCR.....	40
1.5 PCR quantitativa.....	40
1.6 Análise estatística	43
2. <i>In vivo</i>	43
2.1 Grupos experimentais	43
2.2 Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
2.3 Coleta de material.....	44
2.4 Extração de RNA e RT-PCR.....	44
2.5 PCR quantitativa.....	45
2.6 Quantificação de <i>Trypanosoma cruzi</i> a partir de Tc40s	46
2.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto.....	46
2.8 Análise histopatologia.....	48
2.9 Análise estatística	48
V. RESULTADOS.....	50

1. Aumento da expressão de LINE-1 <i>in vitro</i> ao longo do tempo.....	50
2. Avaliação <i>in vitro</i> dos genes associados a atividade de L1 ao longo do tempo	50
3. Inibição da expressão de L1 e seu impacto em genes associados à sua regulação e na resposta imune mediada por interferon durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	54
4. Avaliação <i>in vivo</i> da expressão de L1 em tecidos infectados e controle e sua repercussão na ativação de genes associados a resposta imune	56
5. Análise da produção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> e autoanticorpos contra órgãos alvo.....	60
6. Análise histopatológica do grau de inflamação nos órgãos alvo	61
7. Análise de correlação e componentes principais.....	62
VI. DISCUSSÃO	65
VII. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	72
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais

Em 1909, o médico sanitariano e parasitologista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas descobriu e descreveu a doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana. Sua pesquisa pioneira não apenas elucidou a progressão clínica da doença, mas também identificou seu agente causador, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e o inseto vetor, um triatomíneo popularmente conhecido como "barbeiro". Além disso, Chagas conduziu estudos epidemiológicos na área e destacou o impacto significativo da DC na saúde pública (CHAGAS, 1909). No entanto, apesar dessas contribuições marcantes, a doença continua a ser uma grande preocupação na saúde coletiva devido à falta de investimento governamental, o que a faz ser classificada como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2024).

A DC é endêmica em 21 países da América Latina, onde observa-se um cenário alarmante com cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*, resultando em aproximadamente 12 mil mortes anuais (DE SOUSA et al., 2024; HOCHBERG; MONTGOMERY, 2023). Além disso, estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas residam em áreas onde estão expostas e podem contrair o parasito (WHO, 2024). Além dessas regiões, casos da doença foram relatados em outras partes do mundo, como nos Estados Unidos da América (EUA), na Europa e na região do Pacífico Ocidental, devido sobretudo ao fluxo migratório de pessoas infectadas (LIDANI et al., 2019; SANGENITO; BRANQUINHA; SANTOS, 2020) (**Figura 1**).

Distribuição geográfica da doença de Chagas

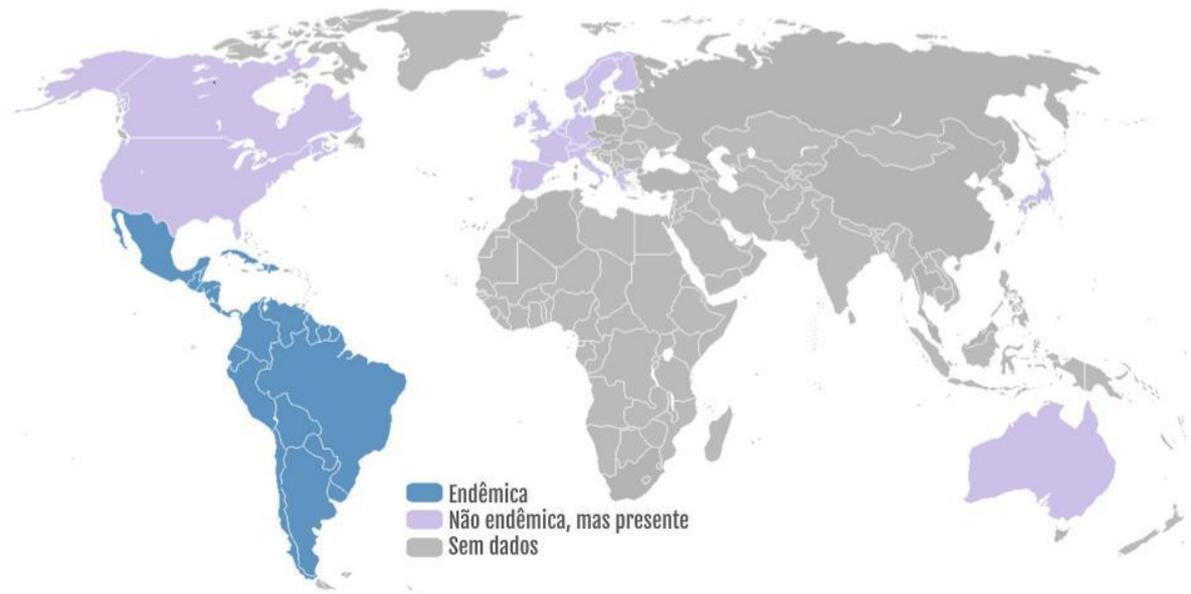


Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas. Padrão de ocorrência epidemiológica da doença de Chagas em diferentes regiões do mundo. Nota-se que a América Latina é uma área endêmica para tal enfermidade. Fonte: Adaptado de Sengenito et al., (2020).

A transmissão da DC pode ocorrer de várias maneiras, sendo a via vetorial a via primária e mais comum forma de infecção (ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005). Esta via acontece quando fezes contaminadas dos insetos triatomíneos ("barbeiros") entram em contato com o interior do organismo do hospedeiro vertebrado. Além da transmissão vetorial, existem também vias secundárias de transmissão que ocorrem fora do ciclo biológico natural do parasita (DIAS; NETO; DE ALBUQUERQUE LUNA, 2011).

Essas vias secundárias de transmissão incluem a transmissão oral, que ocorre através de bebidas e alimentos contaminados com o parasito; a transmissão congênita, em que a mãe transmite o parasito ao feto através da placenta ou do cordão umbilical; a transmissão por transfusão de sangue e por transplante de órgãos, que pode ocorrer se o sangue/órgão doado for de um indivíduo infectado (DIAS; NETO; DE ALBUQUERQUE LUNA, 2011; PIERROTTI et al., 2018). Além disso, há comprovação experimental de transmissão sexual do parasito, conforme demonstrado em estudos com modelo murino (ARAUJO et al., 2017; GOMES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016; RIOS et al., 2018).

Após a infecção inicial, inicia-se a fase aguda da doença, a qual, dura de 6 a 8 semanas. Apesar de ser caracterizada por uma alta parasitemia, na maioria dos casos, é assintomática, ou ainda, em alguns pacientes, pode apresentar-se de maneira leve e inespecífica, o que torna o diagnóstico precoce desafiador (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). No entanto,

manifestações locais e específicas, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, podem ocorrer, embora sejam mais raras e restritas a casos de transmissão vetorial (FORSYTH et al., 2016).

Subsequentemente, a doença entra na fase crônica, que geralmente é assintomática (forma indeterminada). Estima-se que aproximadamente 30-40% dos pacientes desenvolvam sintomas mais graves após várias décadas da infecção inicial. Nessa fase, embora haja uma redução significativa na parasitemia, podem surgir as chamadas “megassíndromes”, que são complicações que impactam órgãos vitais para o funcionamento do organismo, como o coração e o trato gastrointestinal. Em casos mais raros, o sistema nervoso também pode ser afetado (GUARNER, 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; PIERROTTI et al., 2018).

Atualmente, o tratamento envolve o uso de dois medicamentos principais: o benznidazol e o nifurtimox. No entanto, a eficácia dessas drogas na fase crônica da infecção é limitada, e ambas podem causar reações adversas significativas (ALDASORO et al., 2018; ZREIN et al., 2018). Diante da ausência de opções terapêuticas eficazes para a forma avançada da doença, torna-se crucial o diagnóstico e a intervenção precoce para melhorar os resultados e prevenir complicações graves (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

2. Patogênese

2.1 Teorias da patogênese

Atualmente, a patogênese da DC não está completamente elucidada. Em busca de aprofundar a compreensão de seus mecanismos, duas teorias principais são consideradas: a teoria da persistência parasitária e a teoria da autoimunidade. A teoria da persistência parasitária sugere que a lise das células parasitadas, acompanhada da liberação de antígenos do próprio parasito, desencadeia um processo inflamatório no hospedeiro vertebrado (GUTIERREZ et al., 2009; TARLETON RL, 1999). Em contrapartida, a teoria da autoimunidade propõe que o surgimento das manifestações clínicas da doença ocorre devido à rejeição autoimune de células-alvo, mediada pelas células efetoras inflamatórias do sistema imunológico (BONNEY; ENGMAN, 2008; SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974; TEIXEIRA et al., 2006a).

Embora distintas, essas teorias não se excluem mutuamente. É provável que a DC resulte de interações complexas entre o parasito, o sistema imunológico e fatores genéticos. Nesse contexto, Wesley et al. (2019) propuseram uma teoria integrativa que relaciona a reação

inflamatória, a carga parasitária e a transferência horizontal de moléculas de DNA do parasito (kDNA ou DNA do cinetoplasto).

De interesse, análises de correlação realizadas em camundongos infectados revelaram que a produção de anticorpos contra o *T. cruzi* está associada positivamente à produção de autoanticorpos contra proteínas cardíacas e intestinais, na ausência de correlação com a carga parasitária nesses tecidos. Além disso, observou-se que altas taxas de integração de kDNA no coração e na medula óssea estão ligadas ao aumento de anticorpos IgG contra *T. cruzi* e proteínas cardíacas (WESLEY et al., 2019). Os resultados também destacam a relação entre a lesão tecidual e os mecanismos de autoimunidade, evidenciada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e pela produção de autoanticorpos.

2.2 Persistência do parasito

A teoria da persistência parasitária é uma das hipóteses centrais que busca explicar a inflamação e o dano tecidual característicos da DC. O parasito consegue evadir o sistema imunológico, replicar-se de forma intermitente e se alojar em células como adipócitos e no trato gastrointestinal, garantindo sua sobrevivência no hospedeiro ao longo da vida (BONNEY et al., 2019; ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024; TEIXEIRA et al., 2011). A presença constante do *T. cruzi* nos tecidos é corroborada pela detecção de seu DNA por técnicas como PCR quantitativa e por imagens de bioluminescência que mostram a dinâmica da infecção *in vivo* (FRANCISCO et al., 2022; MARCON, 2011; SILBERSTEIN et al., 2018). Estudos indicam que o intestino pode atuar como reservatório do parasito, permitindo migrações ocasionais para o miocárdio, o que contribui para miocardite e fibrose cardíaca, mesmo na ausência de parasitas no coração (LEWIS et al., 2014; SILBERSTEIN et al., 2018).

Além do dano tecidual direto causado pela lise celular, a resposta imunológica adaptativa frente aos antígenos do parasito desempenha um papel central na patogênese. A inflamação crônica resultante gera fibrose e disfunção tecidual, principalmente no miocárdio. A correlação entre a detecção de antígenos e a gravidade da inflamação foi evidenciada em amostras de pacientes com miocardite severa, nas quais a positividade para antígenos do parasito foi de 100% (HIGUCHI et al., 1999; TARLETON RL, 1999). Esses achados reforçam a relevância da persistência do *T. cruzi* na manutenção da inflamação tecidual na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC).

Adicionalmente, o *T. cruzi* induz estresse oxidativo, agravando o dano cardíaco. A disfunção mitocondrial em murinos e humanos infectados resulta no aumento de espécies

reativas de oxigênio (ROS) no coração, levando à apoptose de cardiomiócitos, e esse processo estaria associado à gravidade da CCC (DHIMAN et al., 2013). Outros mecanismos incluem a regulação de microRNAs cardíacos pelo parasito, que afetam processos celulares fundamentais (NAVARRO et al., 2015). Em conjunto, essas evidências consolidam a hipótese de que a persistência do parasito é um fator determinante na patogênese da DC, tanto pela lesão direta quanto pela resposta inflamatória prolongada.

2.3 Autoimunidade

Durante a fase crônica da DC, é possível notar uma diminuição dos parasitos circulantes coincidente com o surgimento das manifestações clínicas mais graves. Associado ao fato de que os medicamentos tripanocidas têm efeito limitado nesse estágio, não contribuindo para a redução dos sintomas (MORILLO, 2015), esses fatores levam à hipótese de que a resposta autoimune desempenha um papel fundamental no surgimento das manifestações clínicas da doença. Com isso, acredita-se que ocorra o rompimento da tolerância imunológica, levando ao reconhecimento inadequado do que é próprio e não próprio, desencadeando eventos pró-inflamatórios que causam danos significativos aos tecidos-alvo, desde comprometimento funcional grave até o desenvolvimento de processo inflamatório crônico (GUIMARO et al., 2014; LA CAVA, 2011; TEIXEIRA et al., 2011).

A hipótese da autoimunidade surgiu na década de 1970, quando Santos-Buch e Teixeira (1974) demonstraram que linfócitos de coelhos chagásicos crônicos eram capazes de destruir fibras cardíacas de fetos de coelho *in vitro*, ao contrário dos linfócitos de coelhos saudáveis, que não possuíam essa atividade. Desde então, vários estudos mostraram fenômenos autorreativos em indivíduos infectados, mas identificar a influência dessa autorreatividade na fisiopatologia da doença continua sendo um desafio, assim como em outras doenças autoimunes relacionadas a infecções (GUTIERREZ et al., 2009).

A fim de explicar a autoimunidade, diversos mecanismos foram propostos, sendo um deles o mimetismo molecular. Nesse processo, um patógeno pode desencadear uma resposta imunológica cruzada contra células do hospedeiro devido a semelhanças moleculares estruturais (BONNEY; ENGMAN, 2015; DE BONA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2011b). Por exemplo, a proteína flagelar de tripomastigotas (FL-160) contém epítomos que mimetizam aqueles encontrados em tecidos do hospedeiro (VAN VOORHIS et al., 1993). Além disso, a proteína ribossomal L27 de *T. cruzi* é similar a proteínas ribossomais de várias espécies, incluindo a humana (PERONE et al., 2003). Pacientes chagásicos apresentam autoanticorpos

contra uma glicoproteína tecido muscular cardíaco e esquelético normal (MCCORMICK, 1993). O reconhecimento específico de anticorpos contra a miosina cardíaca foi observado em camundongos inoculados com extrato de *T. cruzi* (LEON; ENGMAN, 2001). Moléculas como o antígeno B13 (ABEL et al., 2005) e a cruzipaina (AOKI et al., 2004), que são moléculas específicas do *T. cruzi*, também foram identificadas como responsáveis pela ativação da resposta imunológica.

Outro mecanismo da autoimunidade é a ativação *bystander*, que sugere que a exposição contínua a antígenos em tecidos danificados pode levar à autorreatividade dos linfócitos (GIRONÈS; CUERVO; FRESNO, 2005). Nesse contexto, o dano mecânico causado pelo *T. cruzi*, aliado a respostas imunes específicas e não específicas contra o parasito, resulta na liberação de grandes quantidades de autoantígenos em um ambiente rico em mediadores inflamatórios. Citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), e quimiocinas ativam células T autorreativas, promovendo sua intensa multiplicação. Ademais, esse processo inflamatório pode modificar os padrões de migração dos linfócitos e ativar células apresentadoras de antígenos (WEN et al., 2008).

Por fim, há a hipótese da integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro, que sugere que esse parasito é capaz de realizar transferência horizontal de segmentos de DNA (HECHT et al., 2010; TEIXEIRA et al., 1994, 2011a; WESLEY et al., 2019). Vários estudos já demonstraram que os minicírculos de kDNA estão associados a retrotransposons do hospedeiro, e sua integração ocorreria por meio de microhomologias em um mecanismo de reparo de DNA (MMEJ, do inglês *Microhomology-mediated end joining*). De interesse, sabe-se que o DNA exógeno, especialmente o mitocondrial e os elementos móveis, pode auxiliar na reparação do DNA nuclear, restaurando a integridade genômica (MORRISH et al., 2002; YANG et al., 2023).

Assim, a transferência horizontal de kDNA poderia estar relacionada a respostas autoimunes na DC crônica, uma vez que a inserção desses minicírculos no genoma poderia levar à formação de proteínas quiméricas, à alteração da expressão gênica e/ou ao silenciamento de genes existentes (HECHT et al., 2010; SIMÕES-BARBOSA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2011). A **Figura 2** ilustra os diferentes mecanismos relacionados à patogênese da doença.

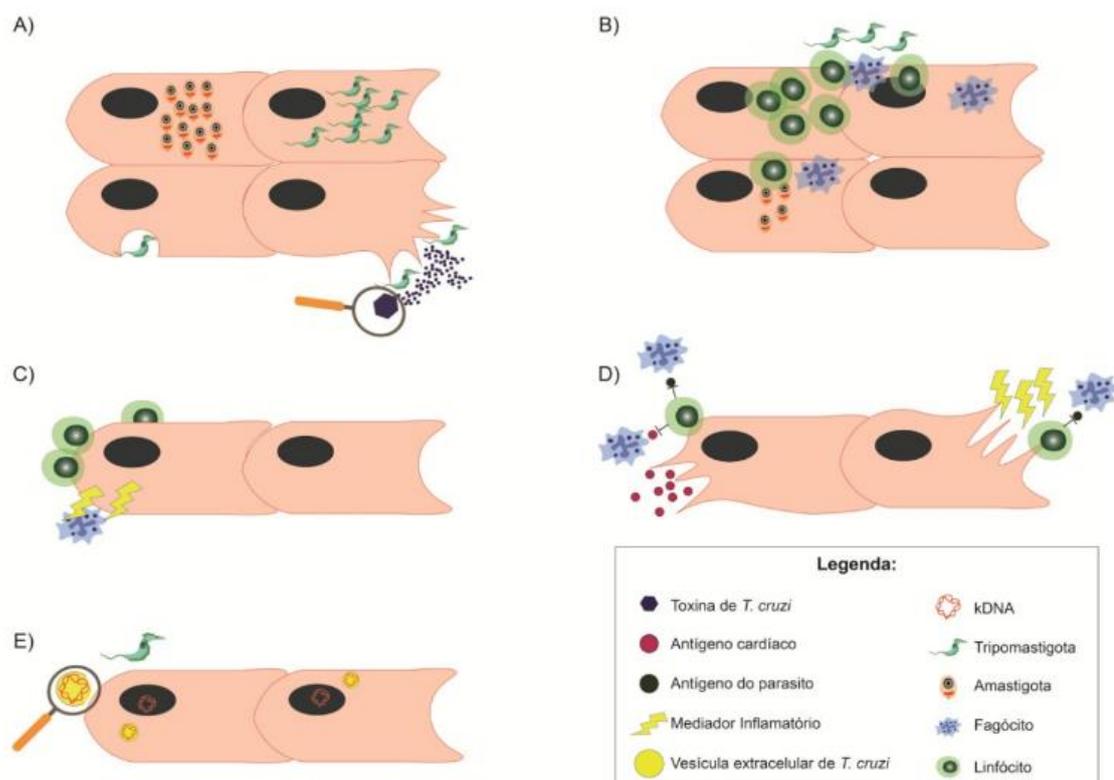


Figura 2. Mecanismos de patogênese da doença de Chagas. a) A persistência do parasito leva ao rompimento celular durante sua diferenciação e multiplicação. b) A ativação da imunidade específica contra *T. cruzi* contribui para a destruição de células cardíacas. c) A ativação exagerada da imunidade inata leva ao reconhecimento inespecífico por meio da ativação *bystander*. d) A autoimunidade promovida por parasitas pode ocorrer por mimetismo molecular entre o parasito e autoantígenos (à esquerda da imagem) ou pela ativação de células T autorreativas após rompimento da célula provocada pelo *T. cruzi* (à direita da imagem). e) A transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma da célula hospedeira. Fonte: Moraes (2022).

3. *Trypanosoma cruzi*

3.1 Ciclo de vida

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, pertencente à família Trypanomastidae (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2020). Possui um ciclo de vida heteroxênico (**Figura 3**), alternando entre diferentes formas evolutivas nos hospedeiros invertebrados e vertebrados (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ZINGALES et al., 2012). No hospedeiro vertebrado, pode se apresentar como amastigota (forma intracelular e replicativa) ou tripomastigota (forma extracelular circulante). No vetor triatomíneo, assume as formas epimastigota (multiplicativa) e tripomastigota metacíclico (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) (TEIXEIRA et al., 2012). Uma característica morfológica importante desse protozoário é a presença de uma mitocôndria tubular única, que abriga o cinetoplasto — uma estrutura em formato de disco que contém uma rede de DNA extranuclear, conhecida como DNA do cinetoplasto (kDNA).

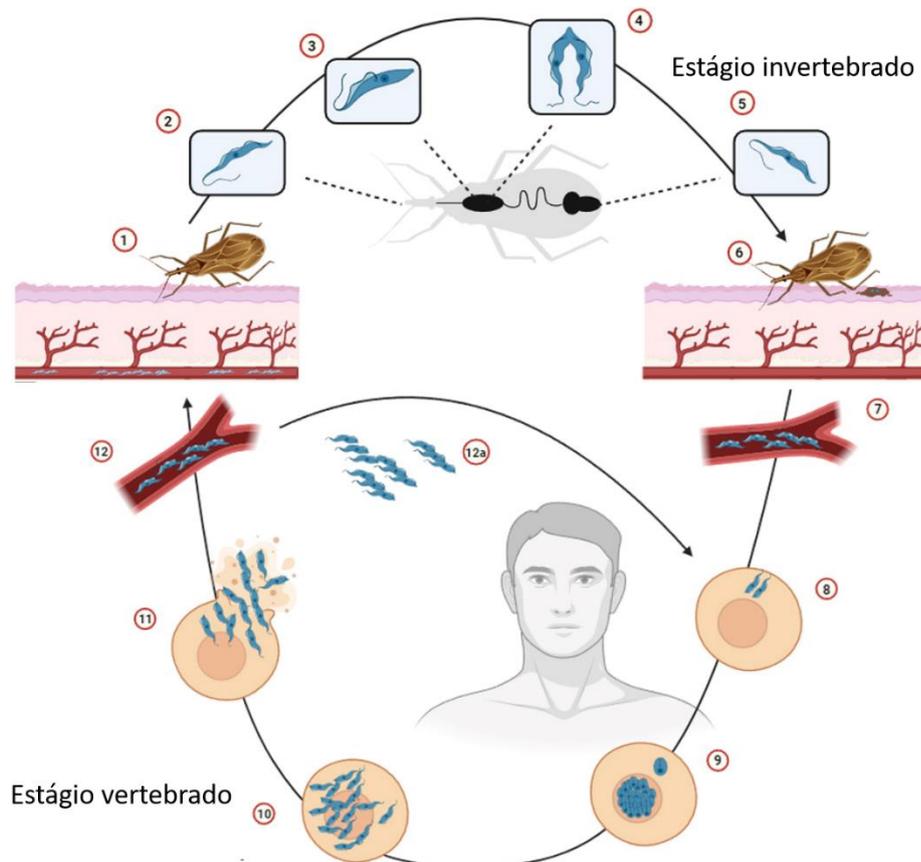


Figura 3. Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*. (1) Durante a hematofagia em um hospedeiro mamífero infectado, o vetor triatomíneo ingere formas tripomastigotas metacíclicas presentes no sangue. (2) Os tripomastigotas ingeridos se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do vetor. (3) Os parasitos se multiplicam e se transformam em tripomastigotas metacíclicos. (4) Esses tripomastigotas infecciosos se alojam na porção final do intestino do vetor. (5) Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o vetor libera tripomastigotas metacíclicos em suas fezes, próximo ao local da picada. (6) Os tripomastigotas entram no hospedeiro através da lesão da picada ou de mucosas intactas e/ou feridas prévias. (7) Uma vez na corrente sanguínea, os tripomastigotas infectam células nucleadas. (8) Dentro dessas células, eles se diferenciam em amastigotas se multiplicam por fissão binária. (9) Os amastigotas, por sua vez, se transformam em tripomastigotas. (10) Esses tripomastigotas causam a lise celular e invadem a corrente sanguínea, podendo infectar novas células. (11) Se o inseto vetor realizar um repasto sanguíneo novamente, o ciclo é reiniciado. (12) Os tripomastigotas no hospedeiro vertebrado infectam células de diversos tecidos, transformando-se em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. Fonte: Pessoa (2024)

O ciclo de vida desse parasito começa durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, quando os insetos vetores ingerem a forma tripomastigota do *T. cruzi*. No trato digestivo do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam por fissão binária. Na porção final do intestino do inseto, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Esses tripomastigotas são excretados nas fezes do inseto e a infecção do hospedeiro vertebrado ocorre pelo contato com essas fezes. Isso pode acontecer por meio da picada, que causa lesões na pele, ou pelo contato com mucosas e feridas previamente abertas. Assim, o *T. cruzi* invade células próximas ao local da infecção inicial por um mecanismo mediado por lisossomos, onde se diferenciam em amastigotas e se replicam por fissão binária (BURLEIGH; ANDREWS, 1995). Quando as células estão repletas de amastigotas, o parasito se transforma

novamente em tripomastigota, causando a lise celular e liberando essas formas circulantes na corrente sanguínea (TEIXEIRA et al., 2006). Esses parasitos liberados podem invadir células mais distantes da lesão inicial, propagando a infecção, ou reiniciar seu ciclo se forem ingeridos por um novo vetor saudável (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

3.2 Interação patógeno-hospedeiro

3.2.1 Danos ao DNA

Nos mamíferos, o DNA pode ser danificado por fatores endógenos, como subprodutos do metabolismo, incluindo espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de oxigênio (ROS). Além disso, fatores exógenos, provenientes do ambiente, como radiação ionizante e agentes alquilantes, também contribuem para o dano ao DNA. Destacam-se ainda as doenças infecciosas, que podem causar danos diretos ao material genético, ampliando o impacto desses fatores exógenos (MARKKANEN, 2017; MASLOWSKA; MAKIELA-DZBENSKA; FIJALKOWSKA, 2019).

Quando esses danos ocorrem, existem mecanismos de reparo que visam mitigá-los. Os principais são: recombinação homóloga (HR), união de extremidades não homólogas (NHEJ), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por excisão de base (BER) e reparo por erro de pareamento (MMR) (LIU; LI; LU, 2016).

Geralmente, as quebras de fita dupla do DNA (DSBs) são reparadas por HR e NHEJ, que possuem mecanismos distintos (NATARAJAN; PALITTI, 2008). Um dos principais diferenciais é que a HR é um mecanismo livre de erros, utilizando a fita homóloga de DNA como molde durante o reparo. A ataxia-telangiectasia mutada (ATM) desempenha um papel crucial nesse processo, iniciando o reparo da DSB ao estimular a atividade nucleolítica de outras moléculas para remover as extremidades da quebra (BAKR et al., 2015; JIN; OH, 2019; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018). Em contrapartida, a NHEJ é mais suscetível a erros e pode induzir mutações no genoma, sendo ativada na ausência de fitas homólogas. Este processo ocorre em todo o ciclo celular e é concluído quando a DNA Ligase IV, junto com a proteína XRCC-4, liga as fitas (CHANG et al., 2017; V. SHARMA, 2016).

As demais vias de reparo são ativadas em resposta a diferentes tipos de danos ao DNA. A NER, por exemplo, é responsável pela correção de adutos de DNA e dímeros de pirimidina, enquanto os erros de pareamento são corrigidos pelo MMR. A correção de bases danificadas individualmente ou em pequenas quantidades é realizada pelo BER (LIU; LI; LU, 2016). Cada

via de reparo envolve diversos genes e proteínas que desempenham funções específicas para garantir o sucesso do processo. Destacam-se a proteína XPA no NER, que é crucial para a interação entre o DNA e outros complexos; a OGG-1 no BER, que atua como um modulador de transcrição; e a MSH2 no MMR, que é um gene responsável pela reparação de incompatibilidade de DNA (LIU; LI; LU, 2016).

A **Figura 4** ilustra as vias específicas para cada tipo de dano ao DNA e as principais proteínas envolvidas.

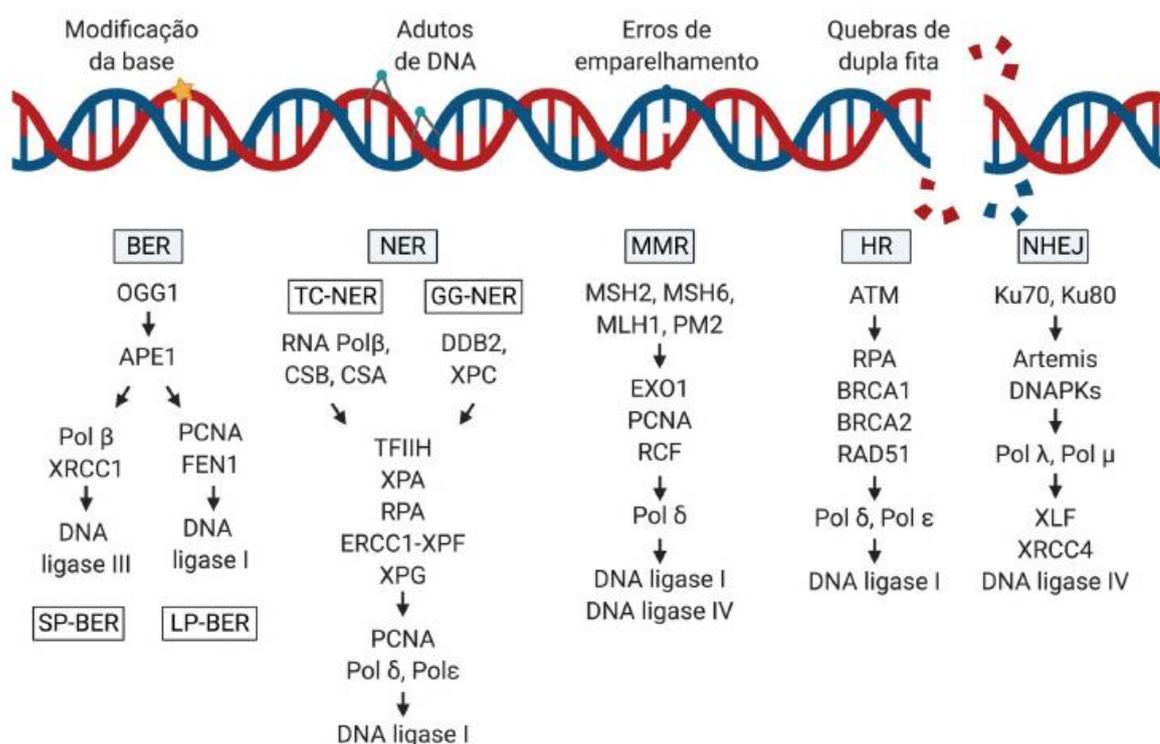


Figura 4. Danos ao DNA e vias de reparo em células de mamíferos. Os danos ao DNA em células de mamíferos são reparados por diferentes vias. Bases modificadas são corrigidas pela via BER, que se divide em dois tipos: SP-BER e LP-BER. Adutos de DNA são reparados pela via NER, que pode ser classificada como NER conjugado a transcrição (TC-NER) e NER no genoma global (GG-NER). Erros de pareamento de bases são reconhecidos e corrigidos pela via MMR. Já as quebras de fita dupla podem ser reparadas pela via HR, que é livre de erros, ou pela via NHEJ, que é propensa a erros. Fonte: Rose (2020).

Além das vias de reparo conhecidas, há evidências de que retrotransposons, especialmente o LINE-1 (L1), podem se integrar em regiões danificadas do DNA, promovendo um reparo mediado por retrotransposon. Nesse processo, o L1 se insere no local da lesão, unindo as duas fitas da DSB de forma independente de endonuclease. Curiosamente, esse tipo de reparo parece competir com a via NHEJ, sendo menos frequente em células competentes para essa última (MORRISH et al., 2002).

O L1 também pode se beneficiar das vias de reparo para facilitar sua inserção no genoma, interagindo indiretamente com proteínas como RAD51, que desempenha um papel

importante na HR. Esse mecanismo permite ao L1 aproveitar ambientes celulares favoráveis para promover sua integração no DNA (GASIOR et al., 2006). Sensores de danos no DNA, como a proteína ATM, também podem influenciar a atividade de L1 ao criar condições favoráveis para sua retrotransposição (COUFAL et al., 2011).

De igual modo, o L1 é capaz de se inserir em regiões íntegras do genoma, e para isso é necessária a clivagem de ambas as fitas de DNA. O L1 codifica as proteínas ORF1 e ORF2; esta última possui atividade endonuclease e é capaz de induzir DSBs, logo, a ativação de genes das vias de reparo estão associados à inserção e atividade do L1 (BELGNAOUI et al., 2006; GASIOR et al., 2006). Sendo assim, as vias de reparo de DNA desempenham um papel duplo na modulação da atividade de L1: facilitando a inserção desses elementos através de mecanismos de reparo e restringindo sua mobilidade para preservar a integridade do genoma.

Entender os mecanismos de reparo é fundamental, pois estudos indicam que *T. cruzi* pode interferir no ciclo celular do hospedeiro e em vários genes relacionados ao metabolismo do DNA, incluindo aqueles das vias BER e MMR (COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009). Durante a infecção, o parasito gera estresse oxidativo no ambiente intracelular, resultando na produção de ROS, que causam danos no DNA, incluindo DSBs. Em resposta, a célula hospedeira ativa a via de BER para corrigir esses danos, enquanto o parasito pode manipular essa resposta para criar um ambiente favorável à sua replicação e sobrevivência. Ademais, a infecção induz a interrupção do ciclo celular, o que beneficia o parasito ao evitar a morte celular prematura e assegurar um ambiente estável e rico em nutrientes para sua replicação. No entanto, essa manipulação do ciclo celular e a alteração do ambiente celular podem comprometer a integridade do DNA, resultando em danos adicionais ao genoma do hospedeiro (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020).

3.2.2 Genes de resposta imune

A regulação adequada da resposta imune do hospedeiro, tanto inata quanto adaptativa, é crucial para a sobrevivência do *T. cruzi* durante sua infecção. Células do sistema imune inato, como macrófagos, células NK e dendríticas, realizam a endocitose dos parasitos, ajudando no controle inicial da replicação (ESPER et al., 2015). Estudos com imuno-histoquímica em modelos de cardiomiopatia chagásica em camundongos mostram uma produção persistente de citocinas como TNF- α , TGF- β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ e IL-10 no tecido miocárdico (ZHANG et al., 1996). Contudo, é vital que a resposta imune esteja equilibrada: enquanto citocinas pró-inflamatórias são necessárias para ativar linfócitos T, um excesso pode estar ligado à patogênese

tardia da cardiomiopatia chagásica, influenciando a intensidade da inflamação e as lesões teciduais (TEIXEIRA et al., 2006b; ZHANG et al., 1996).

A susceptibilidade à DC na fase aguda depende do tipo de resposta que é ativada, podendo ser Th1 ou Th2. Já durante a fase crônica, as citocinas plasmáticas parecem ter relação com a gravidade da doença de forma independente do aparecimento dos sintomas. Caso a infecção não seja cessada, o sistema imunológico ativa uma resposta específica contra *T. cruzi* mediada por anticorpos (DE BONA et al., 2018).

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e responde rapidamente a agressões sem necessidade de exposição prévia, funcionando como a primeira linha de defesa do organismo. Seus mecanismos incluem barreiras físicas, químicas e biológicas, além de células especializadas e moléculas solúveis (DE MELO CRUVINEL et al., 2010). A resposta imune inata envolve processos como fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação do sistema complemento e síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Esses processos são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), estruturas microbianas ausentes no organismo humano, como lipopolissacarídeos. O reconhecimento dessas moléculas ocorre por meio de receptores de reconhecimento de padrões (RRP), incluindo os *toll-like receptors* (TLRs), que iniciam a resposta imunológica inata (DE MELO CRUVINEL et al., 2010; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, TLRs como TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 detectam componentes do parasito, ativando a resposta imune. O TLR2 reconhece âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de tripomastigotas, enquanto o TLR4 responde ao glicoinositolfosfolípídeo (GIPL) de epimastigotas, ambos induzindo citocinas inflamatórias. O TLR7 é ativado por RNA parasitário, e o TLR9 por DNA rico em CpG não metilado, estimulando a imunidade inata (BARTHOLOMEU et al., 2008; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

Na fase aguda da doença, a resposta imune inata (**Figura 5**) é essencial no combate ao parasito através da estimulação do processo inflamatório envolvendo a ação de mediadores como IL-12, IL-18, IFN- γ e óxido nítrico. No entanto, uma inflamação excessiva pode causar danos aos tecidos do hospedeiro. Por isso, a ação de TGF, IL-4 e IL-10 são essenciais, pois controlam a atividade das citocinas pró-inflamatórias e promovem a expansão das células Th2 e de IL-10 (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; BASSO, 2013). Além disso, a IL-4 também estimula o TGF, que regula as células apresentadoras de antígenos (CARDILLO et al., 2015).

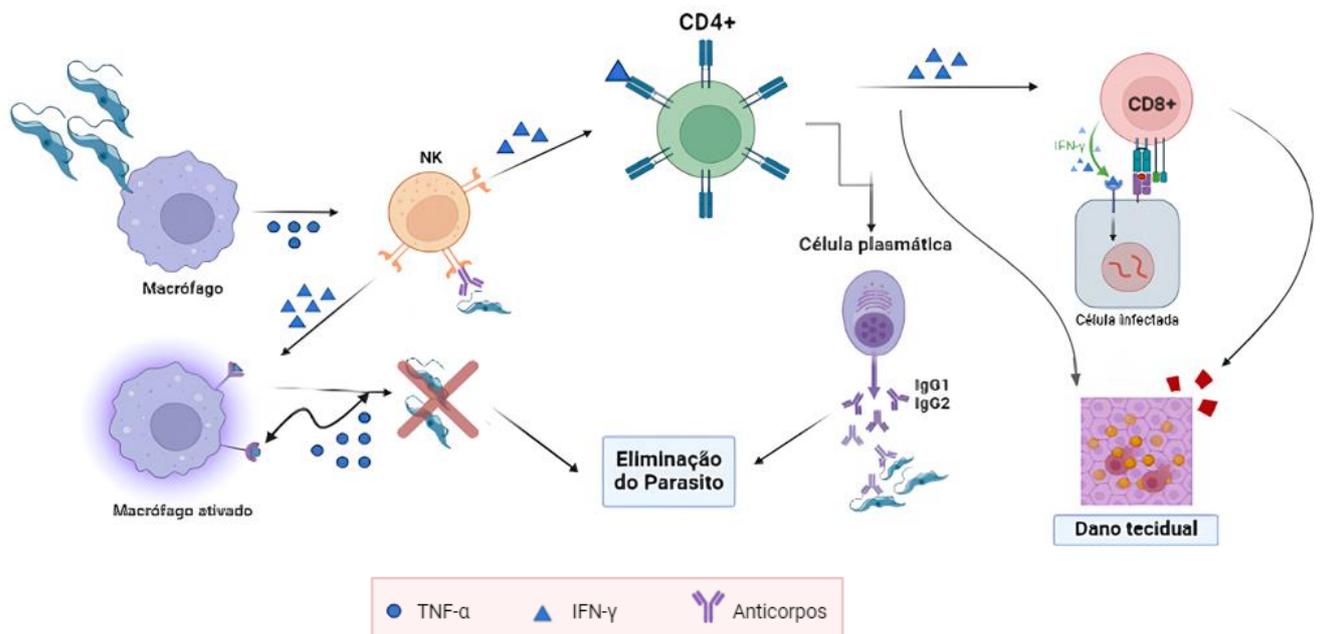


Figura 5. Resposta imunológica contra o *Trypanosoma cruzi*. Antígenos do parasito induzem macrófagos a produzir IL-12, que estimula células NK a liberarem IFN- γ . Essa citocina, junto com TNF- α , ativa macrófagos e controla a replicação do parasito. Intermediários reativos de nitrogênio (IRN) derivados de macrófagos também ajudam no controle. A IL-12, derivada de células dendríticas e NK, induz a diferenciação e expansão de células TCD4+ e CD8+, promovendo a citotoxicidade e a resposta das células B. Na fase aguda, ocorre o recrutamento de células T, com IFN- γ induzindo a produção de quimiocinas. Embora a inflamação seja essencial para a resistência à infecção, pode causar dano tecidual. Fonte: Adaptado de Wesley (2019).

Os macrófagos e neutrófilos desempenham papéis cruciais nesse processo: produzem IL-12, que estimula células NK a secretar IFN- γ (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; BASSO, 2013). Este, por sua vez, aumenta a produção de IL-12, TNF e óxido nítrico, ajudando na eliminação do *T. cruzi*. Essas células são ativadas por antígenos, assim como as células dendríticas, que, na presença de moléculas secretadas pelo *T. cruzi*, diminuem a produção de IL-12 e TNF, comprometendo sua capacidade de apresentar antígenos. Ao interagir com o parasito, as células dendríticas promovem a ativação de linfócitos Treg, inibindo os linfócitos TCD8+ (ERSCHING et al., 2016; ZINGALES et al., 2009).

Além disso, estudos indicam que níveis elevados de IFN- γ estão associados a uma resposta imune mais eficaz contra o *T. cruzi*, embora sua produção exacerbada possa contribuir para a inflamação crônica observada em pacientes com cardiopatia chagásica (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). Portanto, o equilíbrio na produção de IFN- γ é essencial para uma resposta imune eficaz, evitando danos teciduais decorrentes de uma resposta inflamatória excessiva.

Já os interferons do tipo I (IFN- α/β) desempenham um papel complexo na infecção pelo *T. cruzi*. Embora tradicionalmente associados à defesa antiviral, há evidências de que, durante a infecção, a produção de IFNs tipo I pode aumentar a suscetibilidade do hospedeiro ao parasito.

Em modelos experimentais, camundongos deficientes no receptor de IFN tipo I apresentaram melhor controle da infecção e maior sobrevivência em comparação com camundongos não modulados, sugerindo que esses IFNs podem ter um efeito prejudicial na resposta imunológica contra o parasito (CHESSLER et al., 2011). Além disso, a produção de IFNs tipo I durante a infecção por *T. cruzi* pode modular negativamente a produção de IFN- γ (KAYAMA et al., 2009). Essa modulação pode comprometer a eficácia da resposta imune, permitindo a persistência do parasito no hospedeiro.

As células NK, além de eliminar invasores intracelulares, ajudam na diferenciação de linfócitos TCD4 em células de memória, direcionando-os para um perfil Th1. A destruição das células NK resulta em menor produção de IFN e aumento da IL-10, levando a uma maior tolerância do sistema imunológico ao *T. cruzi* (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; CARDILLO et al., 2015).

Com a persistência da infecção, a resposta imune adaptativa é caracterizada por respostas Th1 e Th2. A resposta Th1 produz citocinas inflamatórias, enquanto a Th2 exerce ação anti-inflamatória e mediada por anticorpos (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; BASSO, 2013). Células apresentadoras de antígenos ativam linfócitos T efetores. Na fase crônica da DC, observa-se um aumento de linfócitos T circulantes, que liberam citocinas pró e anti-inflamatórias, ressaltando seu papel no controle da inflamação (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018).

Os linfócitos TCD4+ liberam citocinas que podem estimular ou inibir a atividade de macrófagos, células dendríticas e outros linfócitos, além de favorecer a seleção de linfócitos B específicos e a produção de anticorpos. Em modelo murino, uma resposta combinada de Th1 e Th2 mostrou melhores resultados no controle do *T. cruzi*, com predominância de Th1 (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; HOFT; EICKHOFF, 2005; PETRAY et al., 1993; RODRIGUES et al., 1999). Durante a infecção, também há alta produção de células TCD8+, que são direcionadas aos locais onde o parasito se encontra, contribuindo para o controle da carga parasitária nos tecidos.

Os linfócitos B desempenham uma resposta específica no final da fase aguda, produzindo anticorpos essenciais para o controle da infecção. No início da infecção pelo *T. cruzi*, as células B são cruciais para a resposta Th1, ajudando a conter o parasito (BASSO, 2013; BERMEJO et al., 2010; KUMAR; TARLETON, 1998). Na fase crônica, os linfócitos B regulam a resposta imunológica pela liberação de IL-10. Embora a inibição dessa citocina ajude a controlar a infecção, também pode aumentar a inflamação crônica no tecido cardíaco (CARDILLO et al., 2015).

Estudos em modelos experimentais mostraram elevação dos níveis de imunoglobulina IgM na fase aguda da DC, além de um aumento significativo de IgG ao longo da infecção, com correlação positiva entre os níveis desse anticorpo e a intensidade das lesões tissulares (ANDRADE et al., 1985; Wesley et al., 2019).

4. Retroelementos

4.1 Características e funcionamento

Elementos transponíveis (Ets) são sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma, podendo ou não se duplicar durante o processo (WESSLER, 2006). Eles se dividem em duas classes: Ets autônomos, que codificam genes que promovem sua replicação independentemente do cromossomo hospedeiro; e Ets não autônomos, os quais dependem da maquinaria da célula hospedeira para realizar a transposição (CHUONG; ELDE; FESCHOTTE, 2017).

O sequenciamento do genoma humano revelou que cerca de 45% dele é derivado de elementos transponíveis, incluindo transposons de DNA, retrotransposons de repetição terminal longa (*Long Terminal Repeat* - LTR) e retrotransposons não-LTR. Assim, metade do nosso DNA é oriundo de elementos transponíveis antigos, principalmente retroelementos (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). Os retroelementos humanos se classificam em duas classes principais: os Longos Elementos Nucleares Intercalados (*Long Interspersed Nuclear Elements* - LINEs), representado pelos elementos L1 e L2, e os Elementos Nucleares Intercalados Curtos (*Short Interspersed Nuclear Elements* – SINEs), que incluem os elementos Alu e SVA (MEDSTRAND; VAN DE LAGEMAAT; MAGER, 2002).

A esse respeito, os retroelementos L1 representam cerca de 17 % do genoma humano, com aproximadamente 6 kb de comprimento. Eles possuem uma região 5' não traduzida (UTR), três regiões de leitura de fase aberta (ORFs - *Open Reading Frames*) e uma região 3' UTR com uma cauda poli-A. A 5' UTR abriga um promotor interno de RNA polimerase II que direciona a transcrição das extremidades 5' do elemento. As ORFs são classificadas em ORF0, ORF1 e ORF2. A ORF2 codifica a proteína ORF2p, que possui atividade de endonuclease e transcriptase reversa, enquanto a ORF 1 codifica a ORF1p, proteína com atividade de chaperona de ácido nucleico. A função da ORF0 ainda é incerta, mas acredita-se que possa modular a mobilidade do L1 (BECK et al., 2011; ZHANG; ZHANG; YU, 2020).

Quando amplamente ativado, o L1 pode causar efeitos prejudiciais ao organismo. Esse retroelemento ativa a imunidade inata por meio das vias de detecção de DNA e RNA. Durante sua replicação, o L1 induz cortes e danos no genoma do hospedeiro, sendo o DNA genômico danificado um alvo de reconhecimento pelo cGAS. Assim, a maquinaria de L1 promove a liberação de grandes quantidades de ssDNA (DNA fita simples) no citosol, amplificando a resposta inflamatória mediada por IFN-I (GARCÍA PÉREZ; ALARCÓN-RIQUELME, 2017; THOMAS et al., 2017). Também podem ser reconhecidos RNAs atípicos, como híbridos de DNA-RNA, transcritos anômalos ou RNAs de fita simples ou dupla exógenos. Esses ácidos nucleicos são detectados por sensores de RNA, como RIG-1 e MDA-5 (ZHAO et al., 2021).

A ativação persistente de mecanismos pró-inflamatórios está associada à patogênese de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome de Sjögren (SS), devido à desregulação do equilíbrio imune Th1/Th2 (IMGENBERG-KREUZ; SANDLING; NORDMARK, 2018; KARAGIANNI et al., 2021; UKADIKE et al., 2023). Além disso, a atividade de L1 pode estar associada com a senescência celular. DE CECCO et al., 2019 observaram que fibroblastos em senescência apresentaram maior quantidade de L1, correlacionando-se com a expressão da citocina inflamatória INF-I.

Por isso, o controle da expressão do L1 é fundamental para a homeostase celular e sistêmica. Para prevenir os efeitos prejudiciais da atividade do L1, diversos mecanismos regulatórios atuam em diferentes etapas para inibir sua retrotransposição. Um importante mecanismo de controle da mobilidade do L1 é a metilação desse retroelemento em células somáticas ou a via de piRNA na linhagem germinativa (ARORA et al., 2022; BELANCIO; HEDGES; DEININGER, 2006; KLOYPAN et al., 2015). Estudos mostram que o L1 é mais frequente em células-tronco embrionárias e células da linha germinativa devido ao apagamento temporal da metilação do DNA (LI et al., 2013). Somado a isso, sinais de poliadenilação prematura são mecanismos secundários que limitam a expressão do L1, já que o splicing alternativo altera significativamente a diversidade de formas de RNA expressas e influencia seu impacto na expressão gênica após a inserção no genoma. A poliadenilação prematura pode resultar em variantes de L1 com remoção da sequência 5'UTR ou até mesmo em RNAs que não codificam ambas as ORFs, gerando variantes funcionalmente incompletas (BELANCIO; HEDGES; DEININGER, 2006).

4.2 Associação com outros genes

A regulação da expressão dos elementos L1 desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase celular e na integridade do genoma. Assim, ao mesmo tempo que existem genes relacionados à inibição desses elementos para minimizar danos relacionados à instabilidade genômica resultante da retrotransposição, também participam do processo genes que podem fazer uma ativação controlada de L1 em contextos específicos, como no desenvolvimento embrionário, na reprogramação epigenética e em respostas ao estresse celular causado por infecções, conferindo vantagens adaptativas e regulatórias (DIRUSSO; CLARK, 2023; KOHLRAUSCH et al., 2022; ZHANG; ZHANG; YU, 2020). De interesse, dados recentes de nosso grupo de pesquisa (Rose, 2020; Moraes, 2022) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* é capaz de induzir o aumento da expressão de L1 no genoma hospedeiro.

Dentre os genes inibitórios, podemos destacar APOBEC-3, MOV-10, SAMHD-1 e TREX-1, além de alguns genes envolvidos em vias de reparo de DNA. A família de proteínas APOBEC-3 desempenha um papel crucial nos mecanismos de defesa celular contra a propagação descontrolada do L1 em nível pós-transcricional, atuando por meio de mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de desaminação (KINOMOTO et al., 2007; ORECCHINI et al., 2018). Por outro lado, a RNA helicase MOV-10, que inibe de forma robusta o L1, atua em múltiplas frentes para suprimir a sua atividade. Esta helicase se liga ao RNA e às proteínas de L1, formando complexos ribonucleoproteicos direcionados para degradação. Além disso, MOV-10 recruta a enzima DCP2, que remove o cap do RNA de L1, promovendo sua degradação, e sequestra L1 em agregados citosólicos, limitando sua mobilidade (ARORA et al., 2022; LIU et al., 2023)

A proteína SAMHD-1 é um dos principais fatores de proteção da imunidade inata, inibindo a replicação viral e contribuindo para a repressão do L1 e de outros retroelementos. O mecanismo pelo qual o SAMHD-1 inibe o L1 é particularmente relevante em células em divisão: essa proteína interage com o ORF2 do L1, embora os detalhes dessa repressão ainda não sejam totalmente compreendidos, com diferentes estudos propondo várias abordagens de inibição (DEUTSCHMANN; GRAMBERG, 2021; ZHAO et al., 2013). A exonuclease de reparo 3' (TREX-1), ativada em resposta ao interferon tipo 1, atua na clivagem de ácidos nucleicos. Sua inibição do L1 ocorre por meio da ligação à proteína ORF1, alterando sua localização intracelular e facilitando sua posterior remoção (LI et al., 2017).

Na maioria das células, a atividade do L1 é inibida em todas as etapas do processo de retrotransposição por várias vias: diminuição da disponibilidade de DNA através de metilação

(LIAO et al., 2015; MUOTRI et al., 2005; SANCHEZ-LUQUE et al., 2019), modificações nas histonas e formação de heterocromatina (HATANAKA et al., 2015; HE et al., 2019; SANCHEZ-LUQUE et al., 2019); através da inibição pós-transcricional pela degradação de novas cópias de RNA do L1 (SILVERMAN, 2007; YAO et al., 2018); repressão da tradução de ORF1 e ORF2; bloqueio do transporte de ribonucleoproteínas (RNPs) do L1 para o núcleo (GOODIER et al., 2015; GUO et al., 2014; ORECCHINI et al., 2018); e, na fase final da integração de uma nova cópia do elemento L1 no genoma, utilização mecanismos de reparo do DNA (GOODIER et al., 2015; MITA et al., 2020; PIZARRO; CRISTOFARI, 2016). Contudo, em alguns tecidos, como no cérebro, a supressão do L1 não é total, permitindo que as retrotransposições desse elemento sejam ativadas (BAILLIE et al., 2011; KANO et al., 2009).

Genes de vias de reparo de DNA apresentam um papel dúbio quanto à modulação de retroelementos, podendo tanto inibir quanto ativar a expressão L1 (BONA; CROSSAN, 2023). Esses genes são de especial interesse para nosso estudo, pois sabe-se que *T. cruzi* modula diferentes vias de reparo de DNA da célula hospedeira (GONZÁLES-CÓRDOVA et al., 2024). As vias de reparo de DSBs, como HR e NHEJ, podem facilitar a inserção do DNA complementar (cDNA) de L1 no DNA do hospedeiro após a geração de quebras no genoma pela endonuclease do L1. Quando as vias de reparo são ativadas, proteínas respondem ao dano induzido pelo L1, promovendo a reparação do DNA, que também pode facilitar a retrotransposição desse elemento sob certas condições. Assim, esses genes atuam como reguladores cuja influência na atividade do L1 varia conforme o contexto celular e as circunstâncias específicas de sua ativação, apesar de, em algumas situações, proteger o genoma dos efeitos prejudiciais da retrotransposição (ARIUMI, 2016; PROTASOVA; ANDREEVA; ROGAEV, 2021).

4.3 Envolvimento com resposta imune

A ativação do L1 está ligada à atividade de genes da resposta imune, sendo sua expressão associada à ativação da resposta imune inata. Existe um mecanismo de feedback negativo entre os IFNs tipo 1, como IFN α e β , e o L1 (YU et al., 2015; ZHAO et al., 2021). A regulação do L1 parece ocorrer de maneira semelhante à supressão viral mediada pelo IFN, embora esses interferons não apresentem atividade de supressão viral isoladamente; em vez disso, promovem a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) (WALTER, 2020; ZHAO et al., 2021).

Dentre as moléculas responsáveis pela regulação da resposta mediada por IFNs, destacam-se os sensores de RNA MDA-5 e RIG-I, que detectam RNA exógeno, incluindo genomas virais e transcritos. A MDA-5 reconhece preferencialmente RNA de fita dupla (dsRNA), enquanto a RIG-I é responsável por detectar RNA de fita simples longo não encapsulado (ssRNA) ou dsRNAs curtos (KATO et al., 2006; LI; WU, 2021). Além disso, já foi demonstrado que o RIG-I é capaz de ativar a expressão de um gene repórter na região promotora do IFN- β , confirmando sua função antiviral (YONEYAMA et al., 2004). Já com relação à detecção de DNA, a proteína GMP-AMP cíclico sintase (cGAS) atua como um sensor de DNA de fita dupla (dsDNA) de diversas origens, incluindo DNA genômico danificado (COQUEL et al., 2018; SUN et al., 2013). Na regulação de L1, sua ativação resulta em alta expressão de MDA-5 e RIG-1 no início da transcrição reversa e de cGAS durante a síntese do cDNA e na sua transposição, devido ao dano ao DNA. Isso leva a um aumento na expressão de IFNs e outras proteínas, como ilustrado na **Figura 6**.

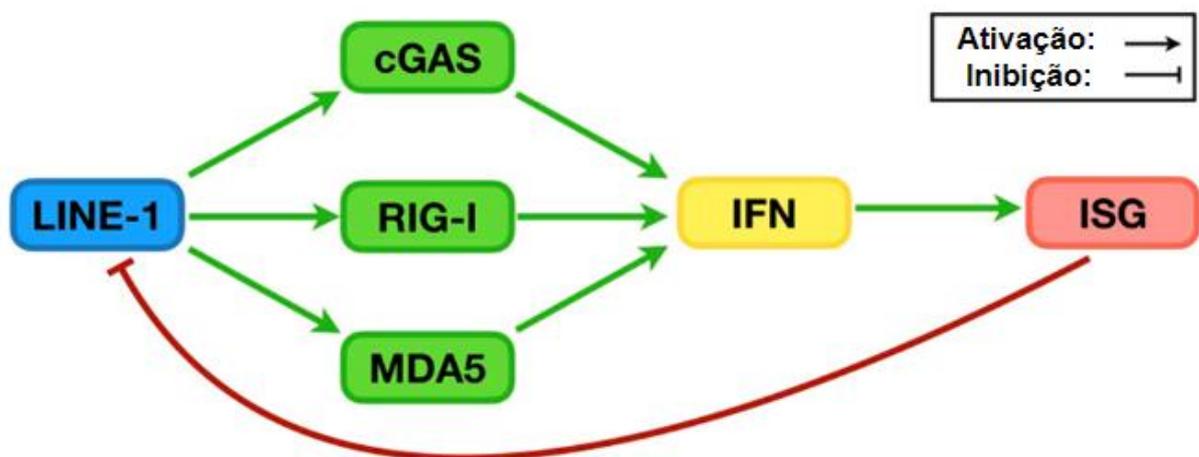


Figura 6. A relação entre LINE-1 e o sistema de sinalização de interferon. Essa regulação ocorre por meio de um mecanismo de feedback negativo: 1) o LINE-1, junto com seu RNP e cDNA sintetizado, ativa o sistema de sinalização de IFNs; 2) essa ativação imune inata eleva os níveis de IFN, aumentando a expressão de genes ISGs; e 3) os altos níveis de proteína ISG exercem um efeito supressor sobre a retrotransposição de LINE-1, reduzindo sua capacidade de ativar a resposta imune inata. Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2021).

Embora as células HEK-293 apresentem defeito na via de detecção de cGAS, foi observado que L1 ainda aumenta a produção de IFNs nessas células. Isso sugere um mecanismo alternativo, independente de cGAS, para ativação da resposta imune, possivelmente via detecção de RNA por MDA-5 e RIG-1 (ZHAO et al., 2021).

O IFN- γ tipo II é um produto da imunidade adaptativa que exerce um papel fundamental nas células da imunidade inata, especialmente nos macrófagos. Considerado um potente ativador de macrófagos, o IFN- γ é essencial na defesa contra micobactérias e outros patógenos

intracelulares (WALTER, 2020). Embora tenha uma atividade antiviral específica inferior, suas propriedades imunomodulatórias se destacam em comparação com os interferons do tipo I (FARRAR; SCHREIBER, 1993).

A ativação constante de fatores pró-inflamatórios no organismo pode resultar em inflamação crônica e no desenvolvimento de doenças autoimunes, devido ao desequilíbrio na resposta Th1/Th2. Se o L1 apresentar uma ativação persistente, é esperado um aumento na expressão de moléculas pró-inflamatórias e uma redução nas moléculas anti-inflamatórias.

II. JUSTIFICATIVA

A DC constitui um grave problema de saúde pública, especialmente na América Latina, onde impõe um considerável ônus econômico sobre os países afetados. Estima-se que aproximadamente sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*, e, entre elas, cerca de um terço deverá apresentar manifestações clínicas da doença, muitas das quais podem ser incapacitantes e até fatais. Infelizmente, as opções de tratamento disponíveis mostram-se ineficazes na fase crônica da enfermidade. Ademais, a dificuldade em desenvolver medicamentos ou vacinas eficientes para o tratamento da DC está fortemente ligada ao desafio de identificar os fatores determinantes para o surgimento dos sintomas.

Portanto, na falta de dados que possam identificar com precisão o fator desencadeador da DC, é fundamental aprofundar a investigação sobre a patogênese dessa enfermidade, especialmente em relação ao papel do retroelemento LINE-1 na promoção de uma resposta imune deletéria. Nossos resultados podem contribuir para a identificação de elementos centrais na relação parasito-hospedeiro, além de reforçar a ligação entre a atividade de L1 e o desencadeamento de respostas autoimunes no hospedeiro, facilitando a descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos inovadores destinados ao tratamento da DC.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Verificar a influência do *T. cruzi* na ativação de retroelementos LINE-1 e sua repercussão na resposta autoimune.

2. Objetivos específicos

- Determinar se há aumento da expressão de LINE-1 durante a infecção por *T. cruzi*;
- Verificar se a infecção por *T. cruzi* altera a expressão de genes inibidores/ativadores de LINE-1;
- Avaliar as vias envolvidas na alteração da expressão de IFN na infecção por *T. cruzi*;
- Investigar o impacto da inibição da expressão de LINE-1 durante a infecção por *T. cruzi*, utilizando o sistema CRISPR/dCas9;
- Correlacionar a carga parasitária, expressão de genes associados à resposta imune e à produção de auto-anticorpos na infecção *in vivo* com a expressão de LINE-1 em diferentes tecidos.

IV. METODOLOGIA

Nosso estudo comparou grupos infectados com *T. cruzi* e grupos não infectados (controle) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Para maior clareza, as diferentes etapas experimentais serão apresentadas e descritas de forma separada.

1. IN VITRO

1.1. Cultura de células e parasitos

Neste trabalho, foram utilizadas células de rim embrionário humano (HEK-293) e células de mioblasto de rato (L6). As células HEK-293 compuseram os grupos experimentais, enquanto as L6 foram usadas para obter formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Ambas as linhagens foram cultivadas em Dulbecco Meio Mínimo Essencial (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) a pH 7.2 e 1% de Penicilina/Estreptomicina, incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas e as células foram repicadas semanalmente, quando atingiam 60-70% de confluência, com acompanhamento em microscópio invertido.

Já as formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana foram mantidas em meio *Liver Infusion Triptose* (LIT) 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, a 25°C. Os repiques foram realizados a cada 15 dias.

1.2. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Para obtenção das formas tripomastigotas, foi inoculado cerca de 10⁶ parasitos da cultura de epimastigota da cepa Colombiana em cultura de células L6, previamente crescidas. Após 72 horas de infecção, todo o sobrenadante foi retirado e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X, pH 7.4, duas vezes, para a retirada das formas epimastigotas presentes no sobrenadante. Após aproximadamente 15 dias, as formas tripomastigotas foram coletadas do sobrenadante e centrifugadas a 300g para infecção das células HEK.

A infecção das células foi realizada inoculando-se formas tripomastigotas de *T. cruzi* em HEK-293 previamente aderidas em garrafa T75. O número de formas tripomastigotas foi obtido por contagem em Câmara de Neubauer, tendo sido inoculado 5 vezes mais parasitos em

relação ao número de células cultivadas (proporção 5:1). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, seguindo as condições de manutenção descritas anteriormente.

1.3. Grupos experimentais

Para esta etapa, foram considerados três grupos experimentais: células controle, células infectadas e células transfectadas para silenciamento de L1 e posteriormente infectadas. Todos os grupos foram cultivados em triplicatas em meio DMEM com 2% de SFB durante os tempos de coleta de 12h, 24h, 48h e 96h (pós-infecção e controle).

As células transfectadas foram obtidas a partir de um estudo anterior do grupo (Shiroma, 2023), no qual a inibição do L1 foi realizado utilizando o sistema CRISPR/dCas9. Esse sistema é uma versão modificada do CRISPR-Cas9 tradicional, na qual a enzima Cas9 perde a capacidade de clivar seu alvo, mas mantém a habilidade de se ligar a sequências específicas do genoma. Portanto, a sequência de interesse não é removida, mas sua capacidade de ser expressa é inibida.

O sistema CRISPR/dCas9 SunTag utilizado neste estudo é composto por três plasmídeos: um para expressar a enzima dCas9 fundida a peptídeos GCN4, outro para expressar anticorpos anti-GCN4 marcados com GFP, e um vetor de clonagem de RNA guia (gRNA). Os plasmídeos empregados foram pHRdSV40-NLS-dCas9-24xGCN4_v4-NLS-P2A-BFP-dWPRE (Addgene #60910), pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-dWPRE (Addgene #60907) e gRNA_Cloning Vector (Addgene #41824), todos adquiridos da Addgene (Cambridge, MA, EUA). A extração e purificação dos plasmídeos foram realizadas utilizando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen™, catálogo K210004), conforme o protocolo recomendado.

O vetor de clonagem de gRNA (Addgene #41824) foi linearizado com a enzima de restrição AfIII, e os oligonucleotídeos foram inseridos no vetor em uma proporção molar de 10:1 (oligo:vetor), utilizando o NEBuilder™ HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs), seguindo as orientações do fabricante. RNAs guias de fita dupla (sgRNAs) foram projetados para direcionar as regiões ORF-2 das sequências LINE-1 (sgLINE1: 5' CTTATTTTAACTTAAGAACCAAAAAGAGCCCACATTAAGATATATAAAG 3') e uma sequência controle não relacionada ao genoma humano (sgGAL4: 5' CTTATTTTAACTTAAGGAACGACTAGTTAGGCGTGTACTTAAGATATATAAAG 3').

As células foram transfectadas com os plasmídeos utilizando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Um dia antes da transfeção, 4×10^4 células foram semeadas em lamínulas de 12 mm em placas de 24 poços para permitir a adesão. Cada reação de transfeção continha 600 ng de DNA total, com a proporção molar de 5:1:1 (gRNA_Cloning Vector #41824: dCas9-GCN4 #60910: scFv-GCN4-GFP #60907). Os volumes dos reagentes foram ajustados para 1 µg de DNA: 2 µL de P3000: 3 µL de Lipofectamine 3000.

Após 48 horas de transfeção, as células foram infectadas e mantidas por mais 48 horas antes de serem fixadas com paraformaldeído a 4%. A coloração nuclear foi realizada com DAPI a 300 mM, e as amostras foram montadas em lâminas de microscópio utilizando o ProLong™ Glass Antifade Mountant (Invitrogen™). As imagens de fluorescência foram capturadas com um microscópio Olympus BX51, utilizando um tempo de exposição de 200 ms. Após cada tempo, as amostras foram armazenadas em 1 mL de solução TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) a -80°C, até a extração do RNA.

1.4. Extração de RNA e RT-PCR

A extração de RNA foi realizada com TRIzol™ Reagent (Invitrogen™), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi quantificado usando o NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C para uso posterior.

Para a síntese de cDNA, padronizou-se a quantidade de RNA com base na amostra de menor concentração, que foi de 30 ng/µL. O protocolo e as condições da reação foram feitos seguindo as orientações do kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™). A síntese de cDNA foi realizada em um termociclador T100™ (Bio Rad), e as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização de qPCR para avaliação da expressão gênica.

1.5. PCR quantitativa

Para avaliar a expressão de genes de *Homo sapiens* inibidores de L1 (APOBEC-3, MOV-10, SAMDH-1, TREX-1), relacionados à atividade de L1 (ORF2), vias de reparo (ATM, MSH-2, OGG-1, XPA, XRCC-4), ativação de IFN (RIG1 e MDA-5), resposta imune (IFN-α, IFN-β, IFN-γ) e gene constitutivo (TBP), foi realizada qPCR no equipamento QuantStudio 3 (Thermo Scientific). A relação de genes e as temperaturas de anelamento estão na **Tabela 1**. A análise de *Blastn* não indicou reconhecimento cruzado entre as sequências dos primers para o hospedeiro e o parasito. Curvas padrão foram determinadas para cada par de primers,

apresentando eficiências entre 90 e 110%, conforme recomendações MIQE (TAYLOR et al., 2019).

Para cada reação, usou-se 2µL (60ng) de cDNA, 0,4µM de cada iniciador e 10µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega), em um volume final de 20µL, exceto para as reações específicas para RIG-1, INF-α e IFN-γ, onde utilizou-se 0,8µM de primer.

O programa de reação para os genes inibidores de L1, de vias de reparo, de ativação de IFN, de resposta imune e o constitutivo consistiu em:

50°C – 2 minutos
95°C – 10 minutos
95°C – 15 segundos
T°C de anelamento (Ver tabela 1) – 1 minuto
72°C – 10 segundos
95°C – 15 segundos
50°C – 15 segundos
95°C – 15 segundos

} 40 x

E para LINE-1, o programa foi:

50°C – 2 minutos
95°C – 10 minutos
95°C – 5 segundos
T°C de anelamento (Ver tabela 1) – 20 segundos
72°C – 30 segundos
95°C – 5 segundos

} 35 x

Gene	Sentido	Sequência do Primer	Temperatura de Anelamento
APOBEC-3	<i>Foward</i>	5'GAGAAGGGACAAGCACATGG3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'TGGATCCATCAAGTGTCTGG3'	
MOV-10	<i>Foward</i>	5'GGCAAGACTGTCACGTTAGTGG3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GGAGCCTTTGACAGAGTAGGTC3'	
SAMDH-1	<i>Foward</i>	5'CTCGCAACTCTTTACACCGTAGA3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'TTTCCTCCAGCACCTGTAATCTC3'	
TREX-1	<i>Foward</i>	5'CCACTCCTTTCCTTACCACATC3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'CCACTCCGCCAAACAGAT3'	
LINE-1	<i>Foward</i>	5'ACACCTATTCCAAAATTGACCAC3'	63°C
	<i>Reverse</i>	5'TTCCCTCTACACACTGCTTTGA3'	
ATM	<i>Foward</i>	5'TGTTCCAGGACACGAAGGGAGA3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'CAGGGTTCTCAGCACTATGGGA3'	
MSH-2	<i>Foward</i>	5'CAGCAGTCAGAGCCCTTAACCT3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GAGAGGCTGCTTAATCCACTGG3'	
OGG-1	<i>Foward</i>	5'GGCTCAACTGTATCACCCTGG3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GGCGATGTTGTTGTTGGAGGAAC3'	
XPA	<i>Foward</i>	5'GAAGTCCGACAGGAAAACCGAG3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GATGAACAATCGTCTCCCTTTTCC3'	
XRCC-4	<i>Foward</i>	5'ATGGCTCCTCAGGAGAATCAGC3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GAGGTCTTCTGGGCTGCTGTTT3'	
RIG-1	<i>Foward</i>	5'GGTTTAGGGAGGAAGAGGTGC3'	58°C
	<i>Reverse</i>	5'AAGTGTGGCAGCCTCCATTG3'	
MDA-5	<i>Foward</i>	5'GCTGAAGTAGGAGTCAAAGCCC3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'CCACTGTGGTAGCGATAAGCAG3'	
IFN-α	<i>Foward</i>	5'TGGGCTGTGATCTGCCTCAAAC3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'CAGCCTTTTGGAAGTGGTTGCC3'	
IFN-β	<i>Foward</i>	5'CTTGGATTCTTACAAAGAAGCAGC3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'TCCTCCTTCTGGAAGTGGTGA3'	
IFN-γ	<i>Foward</i>	5'ACTGTCGCCAGCAGCTAAAA3'	56°C
	<i>Reverse</i>	5'TATTGCAGGCAGGACAACCA3'	
TBP	<i>Foward</i>	5'TGTATCCACAGTGAATCTTGGTTG3'	60°C
	<i>Reverse</i>	5'GGTTCGTGGCTCTTATCCTC3'	

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na reação de qPCR para células HEK-293, juntamente com a temperatura de anelamento utilizada no programa de reação.

A reação de qPCR de cada amostra foi feita em triplicata. O cálculo para normalização e quantificação relativa foi feito segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados da expressão dos genes foram representados em gráficos no formato $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando média e desvio padrão.

1.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS® (v9.4, Cary, Carolina do Norte), considerando um nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A expressão gênica *in vitro* foi analisada por meio de um teste ANOVA para verificar medidas repetidas no tempo, com o objetivo de avaliar os níveis de expressão ao longo do período em amostras coletadas de forma contínua, além de investigar possíveis interações entre os fatores grupo e tempo.

Para as amostras infectadas pós-transfecção, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para identificar diferenças na expressão em comparação aos grupos controle e infectado com *T. cruzi*, considerando o tempo de coleta fixo de 48h.

2. IN VIVO

2.1. Grupos experimentais

Foram utilizados 13 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, uniformes quanto ao peso e idade (4 a 5 semanas), separados em dois grupos: controle (n=6) e infectado por *T. cruzi* (n=7). Os animais foram mantidos em rack ventilado (Alesco, Viracopos, SP) no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM/UnB), com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, além de acesso livre à alimento e água. O projeto seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UnB (CEUA/UnB) sob os protocolos 23106.082680/2017-45 e 122/2019 (Anexos I e II).

2.2. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Para a infecção dos camundongos, foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana, mantidas em cultura de células L6 em DMEM (pH 7.2) com 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sob 5% de CO₂ a 37°C, após duas

passagens em camundongos C57BL/6. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 5×10^5 parasitas diluídos em DMEM, após contagem em câmara de Neubauer. A infecção ocorreu na quinta semana de vida.

Para confirmar o sucesso da infecção, a parasitemia no sangue periférico foi verificada a partir do 8º dia pós infecção (dpi), utilizando uma gota de sangue obtida pela secção da cauda do camundongo, colocada em uma lâmina com 10µL de anticoagulante (Citrato de Sódio; Sigma-Aldrich) e coberta com lamínula. A lâmina foi observada ao microscópio óptico com objetiva de 40X, conforme metodologia de Brener (BRENER, 1962).

2.3. Coleta de material

Após 90 dpi (ou tempo equivalente para os animais não infectados), os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2%, de acordo com o peso corporal (Nobre et al., 2022). Em seguida, foi realizada a colheita de sangue por punção cardíaca para obtenção do soro.

Os camundongos foram eutanasiados com superdosagem anestésica (cetamina/xilazina), e um corte ventral foi feito para retirada do coração, intestinos, fígado e baço. Parte dos órgãos foi macerada em gelo com bisturis e colocada em tubos de microcentrífuga com 1mL de solução RNeasy Lysis Buffer (Invitrogen™), armazenada a -80°C para extração de RNA. Outra porção foi fixada em formol tamponado a 10% para posterior análise histopatológica.

2.4. Extração de RNA e RT PCR

A extração de RNA foi realizada com TRIzol™ Reagent (Invitrogen™), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi quantificado usando o NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C para uso posterior.

Para a síntese de cDNA, padronizou-se a quantidade de RNA com base na amostra de menor concentração, que foi de 50ng/µL. O protocolo e as condições da reação foram feitos seguindo as orientações do kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™). A síntese de cDNA foi realizada em um termociclador T100™ (Bio Rad), e as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização de qPCR para avaliação da expressão gênica.

2.5. PCR quantitativa

Para avaliar a expressão de genes de *Mus musculus* de resposta imune (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α), relacionados à atividade de L1 (A_ORF2_2) e gene constitutivo (β -actina), foi realizada qPCR no equipamento QuantStudio 3 (Thermo Scientific). A relação dos genes e as temperaturas de anelamento estão na **Tabela 2**. A análise de *Blastn* não indicou reconhecimento cruzado entre as sequências dos primers para o hospedeiro e o parasita. Curvas padrão foram determinadas para cada par de primers, apresentando eficiências entre 90 e 110%, conforme recomendações MIQE (TAYLOR et al., 2019).

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na reação de qPCR para *Mus musculus*, juntamente com a temperatura de anelamento utilizada no programa da reação.

Gene	Sentido	Sequência do Primer	T. de Anelamento
IFN- α	Foward	5'GGATGTGACCTTCCTCAGACTC3'	60°C
	Reverse	5'ACCTTCTCCTGCGGGAATCCAA3'	
IFN- β	Foward	5'GCCTTTGCCATCCAAGAGATGC3'	58°C
	Reverse	5'ACACTGTCTGCTGGTGGAGTTC3'	
IFN- γ	Foward	5'GCCCAATATCTCGGATGCTTC3'	60°C
	Reverse	5'GCCAAAATAGCTTCGGTAATCCT3'	
TNF- α	Foward	5'TCTACCGGAACAAACAGTTCAGT3'	60°C
	Reverse	5'AGAGAGCACATTCGTATCAAAGG3'	
	Foward	5'TTGGCGTGACTIONACTAAGGAG3'	58°C
A_ORF2_2	Reverse	5'CCTAGGTTTTTTGTTATTCCAGACA3'	
β -actina	Foward	5'CGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC3'	60°C
	Reverse	5'ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG3'	

Para cada reação, usou-se 2 μ L (100ng) de cDNA, 0,4 μ M de cada iniciador e 10 μ L de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega), em um volume final de 20 μ L, exceto para as reações específicas para β -actina, onde utilizou-se 0,8 μ M de primer.

O programa de reação para IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , A_ORF2_2 e β -actina consistiu em:

50°C – 2 minutos	} 40 x
95°C – 10 minutos	
95°C – 15 segundos	
T°C de anelamento (Ver tabela 2) – 30 segundos	
72°C – 45 segundos	
95°C – 5 segundos	
50°C – 15 segundos	
95°C – 5 segundos	

A reação de qPCR de cada amostra foi feita em triplicata. O cálculo para normalização e quantificação relativa foi feito segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados da expressão dos genes foram representados em gráficos no formato $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando média e desvio padrão.

2.6. Quantificação de *Trypanosoma cruzi* a partir de Tc40S

Também foi determinada a quantidade de parasitos nas amostras de órgãos de camundongos infectados a partir da quantificação do gene Tc40S de *T. cruzi* (Forward: 5'TGCGAAGACGAGGAGTACAA3'; Reverse: 5'GCCACACACGAGCACTTAAA3'), um gene de cópia múltipla no genoma do parasita, cuja expressão é constitutiva e codifica uma proteína associada à subunidade 40S do ribossomo, essencial para sua sobrevivência, crescimento e proliferação.

A quantificação absoluta utilizou como referência os valores calculados a partir da diluição seriada (1: 10) quantidade de cDNA na curva padrão (Eficiência = 91,93% e $R^2 = 0,993$).

2.7. Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA)

Para avaliar a produção de anticorpos (Ac) anti-*T. cruzi*, bem como contra proteínas cardíacas, intestinais, hepáticas e esplênicas durante a fase crônica da infecção (autoanticorpos), foram utilizadas amostras de soro dos animais infectados e não-infectados, que foram analisadas por meio da técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA).

Para obter o antígeno de *T. cruzi* para sensibilizar placas na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, foram centrifugados 200µL das formas epimastigotas (concentração de 10⁵ parasitos/mL) a 4.500 rpm por 10 minutos. As amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7.4) e, em seguida, ressuspensas em 3mL de água Milli-Q. Para a preparação do antígeno das placas anti-proteínas teciduais, as células de cada órgão foram lisadas por ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento à temperatura ambiente, repetidos três vezes, seguidos de nova centrifugação a 14.000rpm por 10 minutos. Após esse procedimento, a concentração proteica do antígeno foi quantificada por espectrofotometria utilizando o NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Science, UK).

As placas foram sensibilizadas com 50µL de antígeno diluído em tampão de carbonato de sódio (Na₂CO₃ - 50mM, pH 9.6) a 15µg/mL (para antígenos teciduais) ou a 8µg/mL (para antígenos de *T. cruzi*), e incubadas em uma câmara úmida a 4°C *overnight*. Para remover o excesso de antígeno, as placas foram lavadas com PBS-Tween 1X (PBS com 0,05% de Polissorbato 20). Em seguida, foram adicionados 100µL de PBS-Leite 1X (pH 7.4, com 5% de leite desnatado) para bloquear a adesão inespecífica das proteínas aos sítios de ligação. Após essa etapa, as placas foram incubadas novamente por 1 hora à 37°C e lavadas três vezes com PBS-Tween.

Para a incubação do anticorpo primário, os soros foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-Leite 1X (pH 7.4, com 2% de leite desnatado) e adicionados 50µL por poço, em triplicata. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após descartar o excesso, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 1X. Em seguida, o anticorpo secundário foi diluído a 1:1000 em PBS-Leite 1X e adicionado também em 50µL por poço, seguindo as mesmas condições de incubação do primeiro anticorpo. Para a revelação da reação, foi adicionada uma solução reveladora de 50µL por poço, que foi incubada de 20-30 minutos na ausência de luz. A leitura foi realizada a 405nm no espectrofotômetro (BioTek®-Synergy HT). Utilizou-se o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (Sigma-Aldrich®), conjugado com a enzima fosfatase alcalina, diluído a 1:2000 em PBS com 2% de leite desnatado. A solução reveladora continha o cromógeno p-nitrofenol fosfato (pnPP), diluído em tampão de dietanolamina (pH 9,8).

Para estabelecer o ponto de corte das amostras, utilizou-se a fórmula $[\bar{X}CN + (3 \times DP)]$ sendo $\bar{X}CN$ a média dos controles negativos e DP o desvio padrão das leituras, a partir de um total de 10 amostras controle. Considerou-se positivas as amostras com densidade óptica (DO) 10% acima do valor e negativa aquelas com DO 10% abaixo do ponto de corte. Esse cálculo foi realizado para cada antígeno (*T. cruzi*, coração, intestino, baço e fígado).

2.8. Análise histopatológica

Secções dos órgãos coletados (coração, intestinos, baço e fígado) foram destinadas à análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, seguidos de desidratação por meio de uma série de concentrações crescentes de etanol, diafanização com xileno e incorporação em parafina. Três cortes seriados de 5µm foram realizados com o micrótomo Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Nubloch, Alemanha). As lâminas resultantes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e, em seguida, examinadas pelo mesmo pesquisador utilizando o microscópio óptico Olympus CX41 modelo 3D (TurboSquid, New Orleans, EUA) com objetiva de 40X. O ScanScope (Aperio®) foi utilizado para o registro das imagens.

A avaliação da resposta tecidual envolveu uma análise detalhada, tanto qualitativa quanto semi-quantitativa. Durante esse processo, foi atribuída uma pontuação à intensidade do processo inflamatório nos tecidos, levando em consideração o infiltrado mononuclear perivascular multifocal cardíaco e o infiltrado mononuclear intersticial multifocal no coração, intestino, baço e fígado. As pontuações variaram de 0 (ausência), 1 (leve - correspondendo a 2 a 15% da secção total), 2 (moderado - correspondendo a 16 a 60% da secção total) e 3 (grave - correspondendo a mais de 60% da secção). Para análise estatística, foram utilizados os valores numéricos atribuídos a cada um desses parâmetros em cada animal dos diferentes grupos experimentais.

2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS® (v9.4, Cary, Carolina do Norte), considerando um nível de significância de 5%. A normalidade dos dados coletados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados de expressão gênica não apresentaram distribuição normal, optou-se por métodos estatísticos não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para identificar diferenças na expressão de camundongos infectados com *T. cruzi* e os animais controle nos órgãos avaliados. Além disso, o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparações intragrupo entre diferentes órgãos. Ambos os testes permitiram a identificação de possíveis diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Para a análise da produção de resposta imunitária humoral, o teste de Shapiro-Wilk indicou que os dados apresentaram distribuição normal. Assim, os resultados foram avaliados

por meio do teste T de Student, a fim de comparar a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e autoanticorpos contra baço, fígado, coração e intestino nos grupos controle e infectado.

Por fim, para agrupar e comparar os resultados, foi realizada uma análise de correlação de Pearson e uma análise de componentes principais (PCA). A análise de correlação foi utilizada para investigar nos animais infectados a relação entre as variáveis de carga parasitária, expressão gênica e produção de autoanticorpos. A força e a direção da relação entre essas variáveis foram avaliadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson, que varia entre -1 e 1. Já a PCA foi aplicada para reduzir a dimensionalidade dos dados e identificar padrões subjacentes.

V. RESULTADOS

1. A infecção por *Trypanosoma cruzi* promove o aumento da expressão de LINE-1

Inicialmente, avaliamos a expressão de L1 em células HEK-293 nos grupos infectado e não infectado por *T. cruzi* em tempos distintos de coleta por meio de qPCR. Foi observado um aumento significativo na expressão de L1 com interação entre tempo e grupo infectado nos tempos de 48h e 96h, nos quais foram registradas diferenças estatísticas em comparação ao controle no mesmo intervalo de tempo ($p < 0.0001$; **Figura 7**), com um aumento de 37,57 e 136,75, respectivamente. Vale destacar que, embora a expressão de L1 tenha diminuído no grupo infectado por 24h em comparação ao de 12h, ambos valores permaneceram equivalentes aos dos controles. Esse resultado sugere que o aumento da expressão de L1 ao longo do tempo é uma consequência da infecção por *T. cruzi*, já que comportamento semelhante não foi observado no grupo controle.

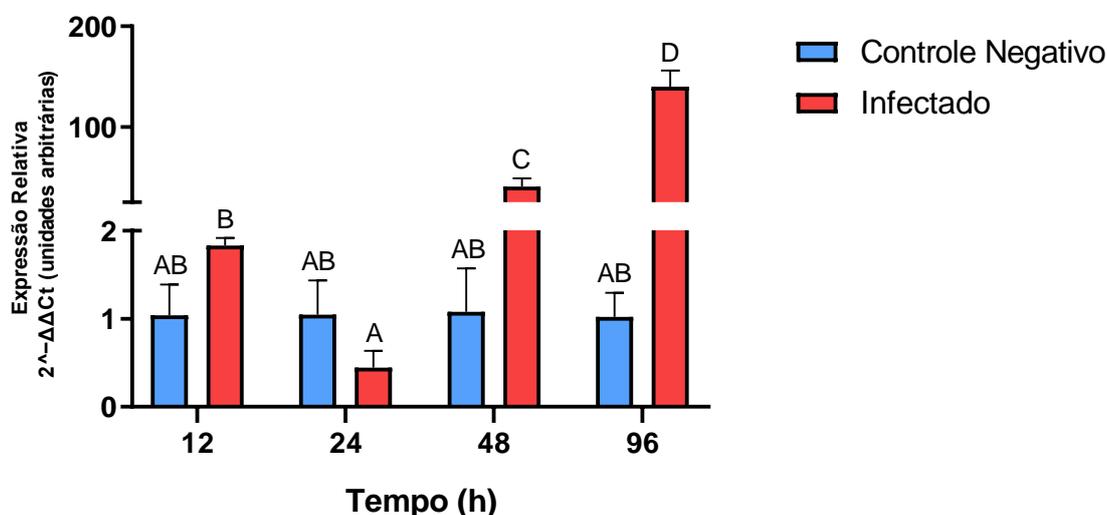


Figura 7. Expressão gênica do retroelemento L1 *in vitro* ao longo do tempo. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão nos tempos de coleta em 12h, 24h, 48h e 96h. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$).

2. Avaliação *in vitro* dos genes associados à atividade de LINE-1

Em seguida, avaliamos a expressão dos genes associados à atividade de L1 ao longo do tempo, nos diferentes grupos e nos mesmos intervalos de coleta citados anteriormente. Os genes foram agrupados conforme sua influência na expressão e ação de L1, incluindo: genes associados à inibição de L1 (APOBEC-3, MOV-10, SAMHD-1 e TREX-1), genes envolvidos

em vias de reparo e moduladores de L1 (ATM, MSH-2, OGG-1, XPA e XRCC-4), genes relacionados à expressão de IFN (RIG-1 e MDA-5), e genes da resposta imune (IFN- α , IFN- β e IFN- γ).

Primeiramente, avaliamos o comportamento dos genes relacionados à inibição de L1. Foi observado um aumento significativo na expressão de MOV-10, com elevações de 3,39 e 7,05 vezes nos tempos de 48h e 96h, respectivamente, em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$; **Figura 8A**). Um aumento com relevância estatística também foi identificado na expressão de APOBEC-3, porém restrito ao ponto de coleta de 96h ($p < 0,0001$; 3,84 vezes maior). Nos tempos anteriores, é possível observar que há uma subexpressão desse gene nos tempos de 12h e 24h e uma normalização no tempo de 48h (**Figura 8B**).

Em contrapartida, SAMHD-1, apesar de seu papel relevante no controle da propagação de L1, não apresentou aumento significativo longo do tempo (**Figura 8C**), assim como foi observado para TREX-1 (**Figura 8D**).

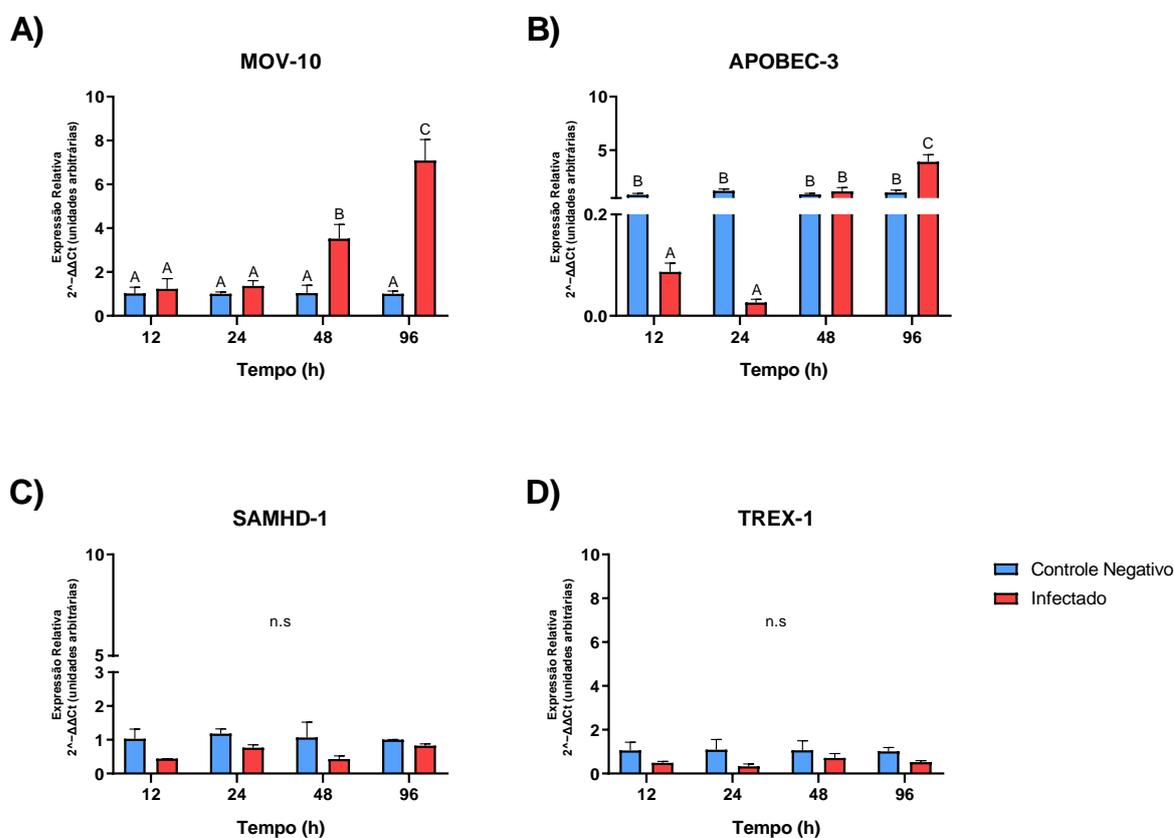


Figura 8. Expressão de genes inibidores da atividade de L1 *in vitro* ao longo do tempo. Valores calculados por meio da fórmula de 2^{-ΔΔCt} para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão nos tempos de coleta em 12h, 24h, 48h e 96h. Os genes avaliados foram: (A) MOV-10, $p < 0,0001$; (B) APOBEC-3, $p < 0,0001$; (C) SAMHD-1, $p < 0,0001$; (D) TREX-1. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes. N.s – não significativo.

Com relação aos genes associados às vias de reparo de DNA, observou-se que para o gene XRCC-4 o grupo infectado teve aumento relativo da expressão de 1,67 e 1,74 vezes nos tempos de coleta de 48h e 96h ($p=0,0195$) (**Figura 9A**). Também foi identificado um aumento estatisticamente significativo nos genes ATM (12h e 96h), MSH-2 (48h e 96h) e XPA (12h e 24h) em comparação ao controle (**Figura 9B, C e D**, respectivamente). Para ATM, o grupo infectado teve aumento relativo de 2,03 vezes no tempo de 12h e de 2,68 vezes no tempo de 96h ($p=0,0091$). Para MSH-2, o aumento relativo foi de 1,61 vezes no tempo de 48h e de 1,82 vezes no tempo de 96h ($p<0,0001$). Para XPA o aumento foi de 5,28 e de 3,2 nos tempos de 12h e 24h, respectivamente ($p<0,0001$). Ademais, os níveis de expressão do gene OGG-1 não mostraram variação significativa ao longo do tempo (**Figura 9E**).

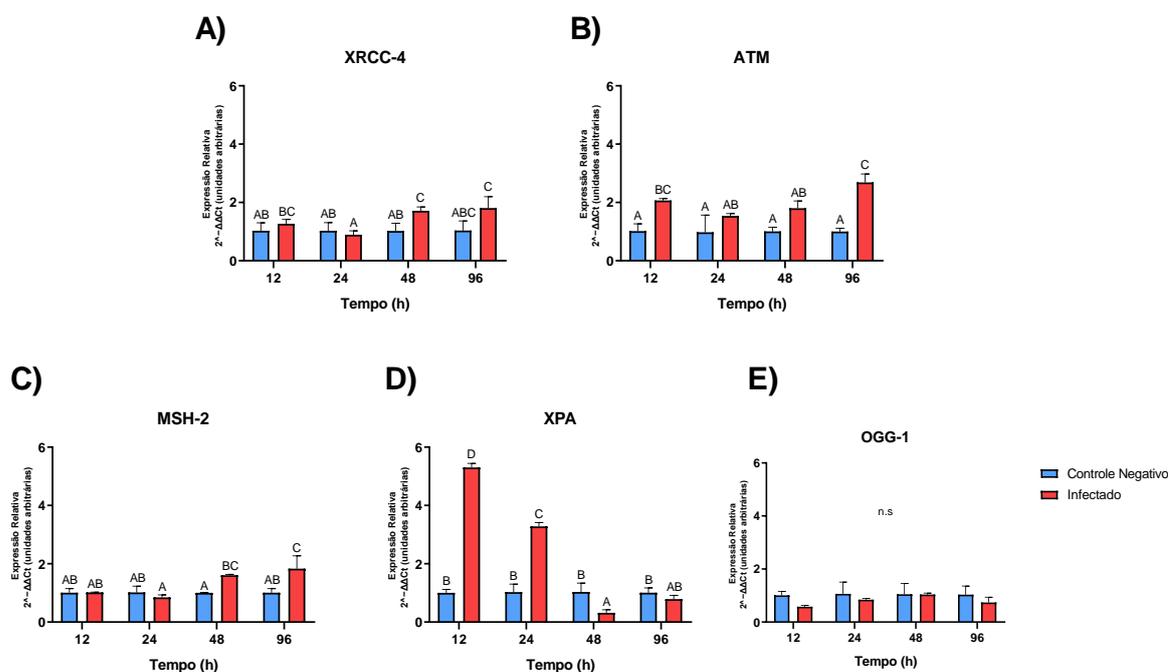


Figura 9. Expressão de genes associados à ativação de vias de reparo de DNA e capazes de modular a atividade de L1 *in vitro* ao longo do tempo. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão nos tempos de coleta em 12h, 24h, 48h e 96h. Os genes avaliados foram: (A) XRCC-4 (componente da via de reparo de NHEJ), $p=0,0195$; (B) ATM (componente de via de reparo de HR), $p=0,0091$; (C) MSH-2 (componente da via de reparo de MMR), $p<0,0001$; (D) XPA (componente da via de reparo de NER), $p<0,0001$; (E) OGG-1 (componente da via de reparo de BER), n.s. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes. N. s – não significativo.

Em relação aos genes ativadores de interferons e associados à resposta imune, foi observada uma maior expressão de MDA-5, um ativador de interferons do tipo I, nos tempos de 24h, 48h e 96h em células infectadas com *T. cruzi* quando comparadas aos grupos controle nos mesmos períodos ($p<0,0001$; **Figura 10A**). Os aumentos relativos na expressão foram de 2,54; 18,98 e 2,49 vezes nos tempos de 24h, 48h e 96h, respectivamente. Com relação a RIG-

1, observou-se aumento de sua expressão em 1,91 vezes apenas no tempo de 96h ($p < 0,0001$; **Figura 10B**).

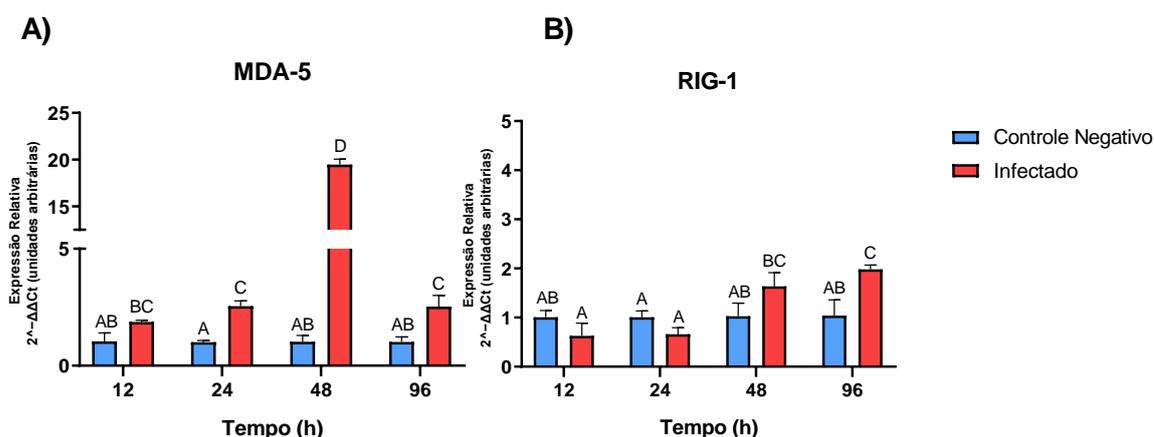


Figura 10. Expressão de genes associados à expressão de interferons *in vitro* ao longo do tempo. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão para os genes (A) MDA-5, $p < 0,0001$; e (B) RIG-1, $p < 0,0001$. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

No que concerne a expressão de interferons, observou-se que a infecção por *T. cruzi* resultou em um aumento significativo de IFN- α , IFN- β e IFN- γ ao longo do tempo, quando comparados ao grupo controle. A expressão de IFN- α também exibiu uma elevação nos tempos finais nas células infectadas em comparação ao controle, com aumentos relativos de 2,3 vezes em 48h e 2,06 vezes em 96h. ($p = 0,0009$; **Figura 11A**). Para IFN- β , as células infectadas mostraram maior expressão no tempo de 12h (aumento de 4,28 vezes), seguida por uma equivalência com o controle no tempo de 24h, e, posteriormente, nova elevação nos tempos finais, com aumentos relativos de 11,33 vezes em 48h e 4,66 vezes em 96h em comparação ao controle (**Figura 11B**; $p < 0,0001$). Já para IFN- γ , o tempo de 48h foi o que mais se destacou, com expressão 8,09 vezes superior ao controle, enquanto em 96h, o grupo infectado manteve um aumento de 6,03 vezes em comparação ao controle. Porém, vale destacar que nos tempos iniciais de 12h e 24h há uma subexpressão desse gene no grupo infectado em comparação ao controle (**Figura 11C**; $p < 0,0001$).

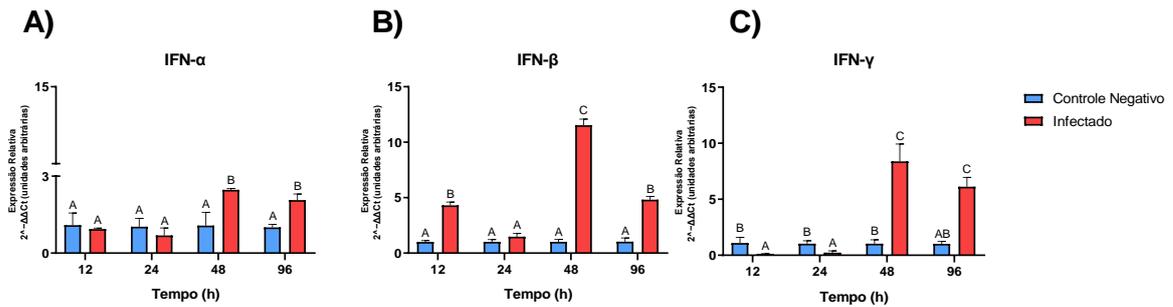


Figura 11. Expressão gênica de interferons *in vitro* ao longo do tempo. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão para os genes de (A) IFN- α , $p=0,0009$; (B) IFN- β , $p<0,0001$; e (C) IFN- γ , $p<0,0001$. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

3. Inibição da expressão de L1 e seu impacto em genes associados à sua regulação e na resposta imune mediada por interferon durante a infecção por *T. cruzi*

Para confirmar se a ativação de L1 por *T. cruzi* é determinante para manutenção da resposta imune mediada por INF, utilizamos células transfectadas nas quais a inibição do L1 foi realizada utilizando o sistema CRISPR/dCas9. Inicialmente, conforme mostrado na **Figura 12A**, as células transfectadas expressando um RNA guia direcionado à região ORF2 do LINE-1 (gLINE-1) apresentaram focos nucleares brilhantes distintos, enquanto as amostras de controle negativo transfectadas com gGAL4 exibiram apenas fluorescência nuclear difusa de GFP, indicando a especificidade da abordagem de direcionamento. Em seguida, avaliou-se a expressão gênica de L1 em células HEK-293 no tempo de 48h, considerando os seguintes grupos: controle, apenas infectado e transfectado e infectado (**Figura 12B**). A análise revelou uma diminuição de 5,46 vezes na expressão de L1 nas células transfectadas comparadas ao grupo infectado ($p=0,0273$), confirmando o sucesso da inibição desse gene nas amostras avaliadas.

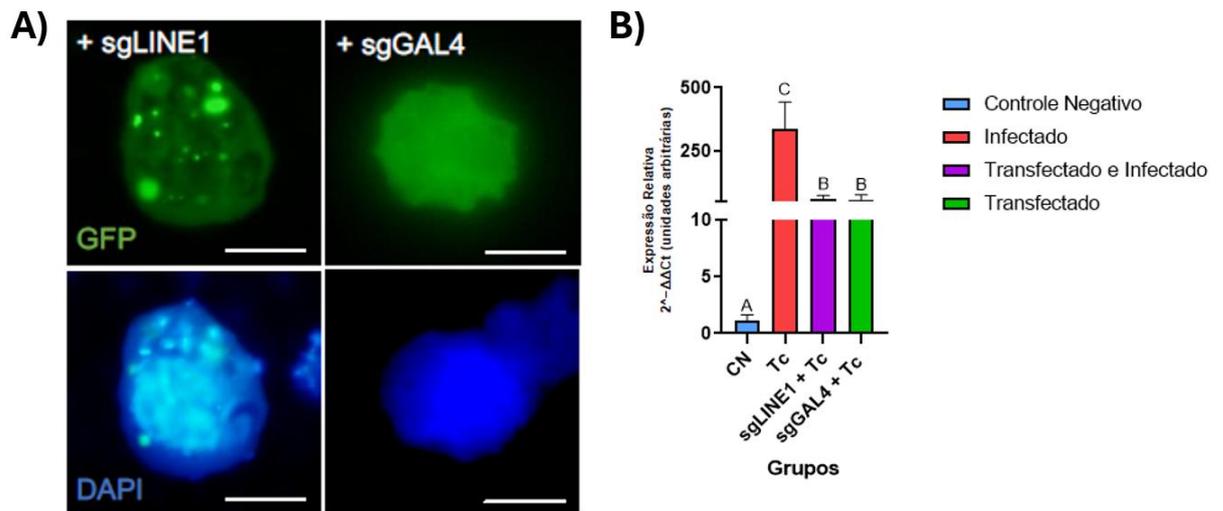


Figura 12. Avaliação da expressão gênica de LINE-1 *in vitro* após transfecção com o sistema CRISPR/dCas-9. Células HEK-293 transfectadas com o sistema CRISPR/dCas9 para inibição de L1, utilizando plasmídeos do sistema SunTag contendo gRNA direcionada à sequência de ORF2 de L1, foram infectadas 24 horas após a transfecção, e amostras foram coletadas 48 horas após a infecção. (A) Células HEK-293 transfectadas com RNAs guias direcionados ao LINE-1 (gLINE1) ou a uma sequência não relacionada ao genoma humano (gGAL4) foram analisadas 48 horas após a infecção. As imagens foram capturadas com aumento de 100× e tempo de exposição de 200 ms. Barra de escala: 10 μ m. (B) Expressão relativa de L1. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: controle negativo (barra azul), infectado com *T. cruzi* (barra vermelha), transfectado com CRISPR/dCas-9 para silenciamento de L1 e posteriormente infectado com *T. cruzi* (barra roxa) e transfectado com CRISPR/dCas-9 para silenciamento de L1 (barra verde). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão no tempo fixo de coleta de 48h, $p=0,0273$. Diferença estatística, * $p\leq 0,05$.

O próximo passo foi avaliar o comportamento de genes associados à inibição de L1 (MOV-10), à ativação da resposta imune (MDA-5) e à expressão de IFNs (α , β e γ) após a inibição de L1. Foi observada uma tendência a redução da expressão de MOV-10 ($p=0,09$) no grupo transfectado quando comparado ao grupo infectado por *T. cruzi* (**Figura 13A**). Em contraste, MDA-5 apresentou uma redução de expressão de 10,15 vezes no grupo transfectado em relação ao grupo infectado ($p=0,039$), alcançando níveis comparáveis aos do grupo controle (**Figura 13B**). Com relação aos IFNs do tipo 1, o IFN- α mostrou uma tendência à redução de expressão no grupo IPT em relação ao grupo infectado ($p=0,06$), enquanto o IFN- β apresentou uma redução significativa na expressão no grupo IPT comparado ao infectado ($p=0,05$; **Figuras 13C e 13D**, respectivamente). Já com relação ao IFN- γ , foi observada uma diferença significativa em sua expressão entre os grupos transfectado e infectado, sendo 5,4 vezes mais expresso no infectado ($p=0,05$; **Figura 13E**).

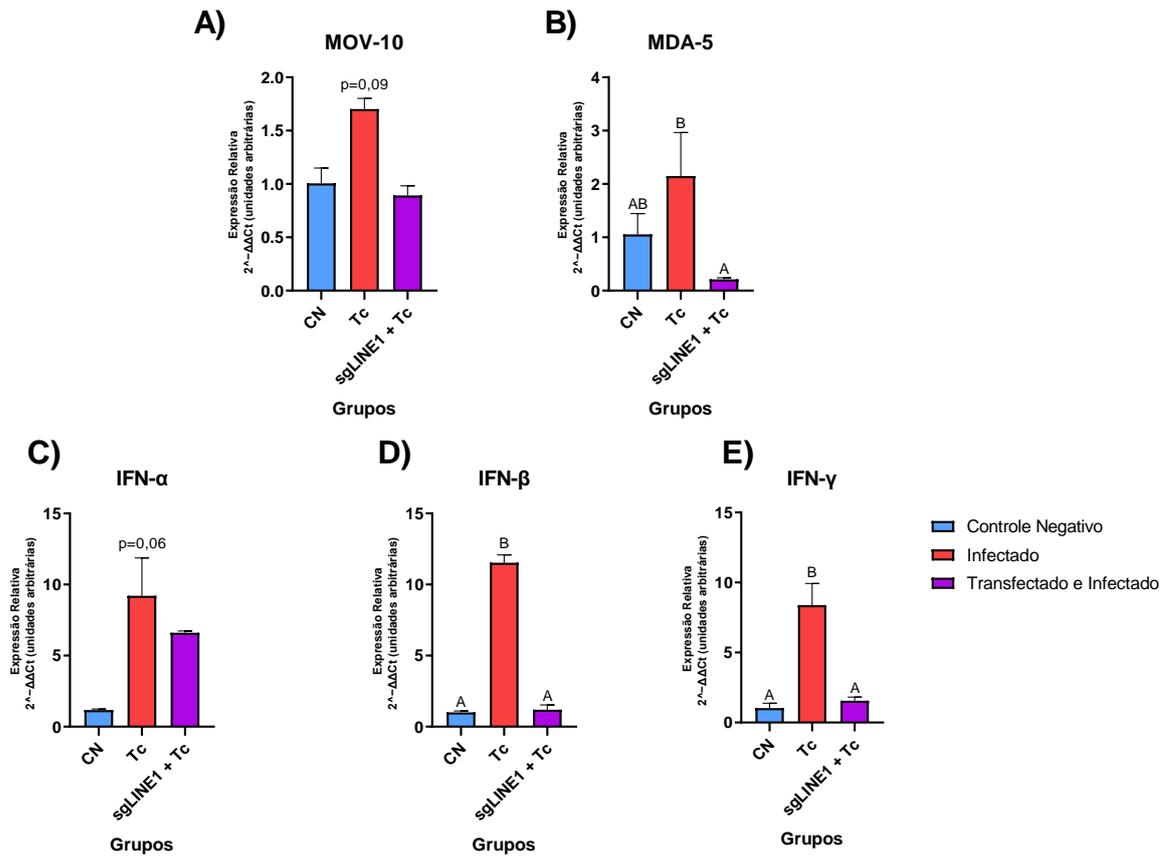


Figura 13. Expressão de genes associados à atividade de LINE-1 *in vitro* em 48h. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para avaliação da expressão gênica analisados nos seguintes grupos: infectado com *T. cruzi* (barra vermelha), transfectado com CRISPR/Cas-9 para silenciamento de L1 (barra roxa) e controle negativo (barra azul). Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão no tempo fixo de coleta de 48h para os genes (A) MDA-5, $p=0,039$; (B) MOV-10, $p=0,09$; (C) IFN- α , $p=0,06$; (D) IFN- β , $p=0,05$; (E) IFN- γ , $p=0,05$. Diferença estatística, $*p\leq 0,05$.

4. Avaliação *in vivo* da expressão tecidual de L1 e sua repercussão na ativação de genes associados à resposta imune

Dando sequência ao estudo, avaliamos a expressão de L1 em diferentes órgãos de camundongos Balb/C, infectados ou não com *T. cruzi*, na fase crônica da infecção. Primeiramente, foi realizada uma avaliação da carga parasitária nos tecidos dos animais infectados (**Figura 14**). A análise estatística detectou variabilidade na carga de *T. cruzi* apenas entre coração e intestino ($p=0,05$). Vale ressaltar que não foi detectado DNA de *T. cruzi* nos tecidos dos animais não infectados.

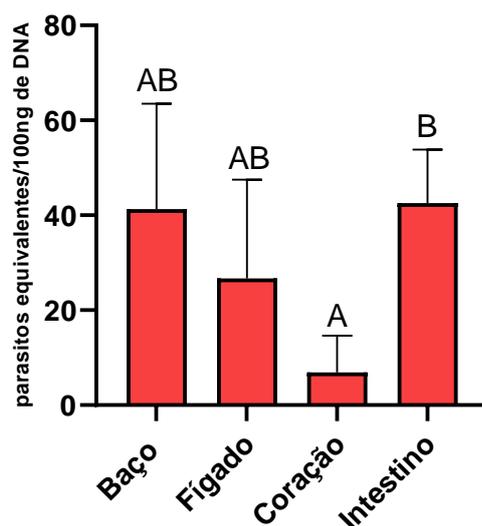


Figura 14. Quantificação absoluta de *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de camundongos Balb/C. Valores obtidos por meio de qPCR para o alvo Tc40s do *T. cruzi*. Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão nos tecidos infectados (baço, fígado, coração e intestino). Diferença estatística, * $p \leq 0,05$.

Em seguida, a expressão de L1 foi avaliada nos tecidos de camundongos controles e infectados (**Figura 15**). Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) tanto entre os grupos de animais (infectados e controle) quanto entre os órgãos analisados nos animais infectados (baço, fígado, coração e intestino). Foi observada maior expressão nos animais infectados em relação ao controle em todos os órgãos analisados, com aumentos de 79,22 vezes no baço ($p=0,0122$), 3,28 vezes no fígado ($p=0,0336$), 682,34 vezes no coração ($p=0,0377$) e 269,44 vezes no intestino ($p=0,0377$). Esses resultados indicam que a infecção por *T. cruzi* aumenta a expressão de L1 *in vivo*, corroborando os dados obtidos nos experimentos *in vitro*.

Ademais, essa figura ilustra as diferenças de expressão de L1 entre os órgãos dos animais infectados. Os órgãos com maior expressão foram o coração e o intestino, que foram estatisticamente equivalentes entre si. No coração, a expressão foi 7,08 vezes maior que no baço ($p=0,0167$) e 108,03 vezes maior que no fígado ($p=0,0242$). No intestino, a expressão foi 2,39 vezes maior que no baço ($p=0,0377$) e 36,43 vezes maior que no fígado ($p=0,0499$). Observou-se também que o fígado apresentou a menor expressão de L1 entre os órgãos analisados, com o baço exibindo uma expressão 15,27 vezes maior em comparação ao fígado ($p=0,0242$).

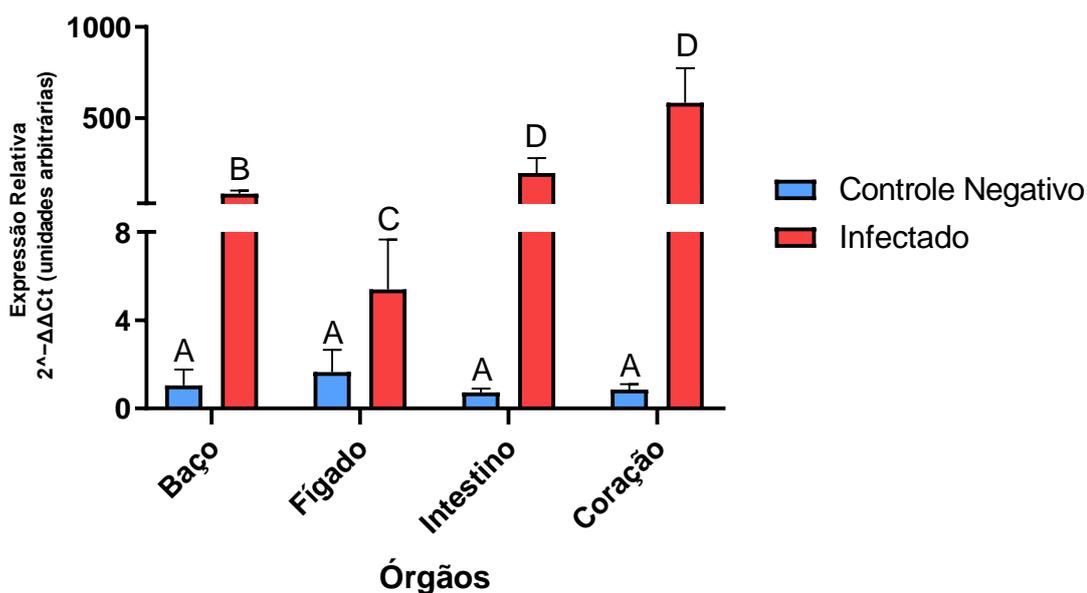


Figura 15. Expressão gênica de L1 em diferentes tecidos de camundongos Balb/C, infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para avaliação da expressão gênica. Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão, tanto para o grupo infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) quanto para o controle negativo (barra azul) para os tecidos do baço ($p=0,0122$), fígado ($p=0,0336$), intestino ($p=0,0377$) e coração ($p=0,0377$). Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

Na sequência, foi analisada a expressão *in vivo* de genes relacionados à produção de diferentes tipos de interferons, bem como de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que também atua como um regulador de L1. Observou-se que diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) ocorreram apenas no intestino e no coração, quando comparados os camundongos infectados com *T. cruzi* aos animais controle, ao passo que baço e fígado apresentaram expressão semelhante ao grupo controle. Porém, quando comparados dentro do grupo infectado, essa diferença foi observada em todos os órgãos (**Figura 16**).

A análise feita apontou diferenças entre grupo infectado e controle apenas no coração e intestino. Para IFN- α (**Figura 16A**), a expressão foi 2,51 vezes maior no grupo infectado em comparação ao controle no intestino ($p=0,0242$) e 6,67 vezes maior no coração ($p=0,0183$). No caso de IFN- β , a expressão foi 3,95 vezes maior no intestino ($p=0,0377$) e 18,97 vezes maior no coração ($p=0,0242$) no grupo infectado (**Figura 16B**). Para IFN- γ , o aumento foi de 4,86 vezes no intestino ($p=0,0122$) e 27,41 vezes no coração ($p=0,0167$) no grupo infectado (**Figura 16C**). Já para TNF- α , observou-se um aumento de 2,27 vezes no intestino ($p=0,0242$) e 3,98 vezes no coração ($p=0,0499$) no grupo infectado comparado ao controle (**Figura 16D**).

Em seguida, avaliamos as diferenças entre a expressão nos órgãos infectados. Para IFN- α , no grupo infectado a expressão no coração foi 10,8 vezes maior que no baço ($p=0,0122$), 16,6 vezes maior que no fígado ($p=0,0122$) e 3,49 vezes maior que no intestino ($p=0,0183$). No

intestino, a expressão foi 3,1 vezes maior que no baço ($p=0,0242$) e 4,76 vezes maior que no fígado ($p=0,0242$; **Figura 16A**).

Para IFN- β , a expressão no coração foi 31,75 vezes maior que no baço ($p=0,0242$), 32,93 vezes maior que no fígado ($p=0,0242$) e 4,63 vezes maior que no intestino ($p=0,0377$). No intestino, a expressão foi 6,86 vezes maior que no baço ($p=0,0499$) e 7,11 vezes maior que no fígado ($p=0,0499$) (**Figura 16B**).

Em relação ao IFN- γ , a expressão no coração foi 14,2 vezes maior que no baço ($p=0,0242$), 19,17 vezes maior que no fígado ($p=0,0202$) e 5,33 vezes maior que no intestino ($p=0,0167$). No intestino, a expressão foi 2,63 vezes maior que no baço ($p=0,0122$) e 3,6 vezes maior que no fígado ($p=0,0377$) (**Figura 16C**).

Para TNF- α , a expressão no coração foi 8,94 vezes maior que no baço ($p=0,0377$), 8,88 vezes maior que no fígado ($p=0,0499$) e 1,78 vezes maior que no intestino ($p=0,0499$). No intestino, a expressão foi 5,02 vezes maior que no baço ($p=0,0242$) e 4,99 vezes maior que no fígado ($p=0,0336$) (**Figura 16D**).

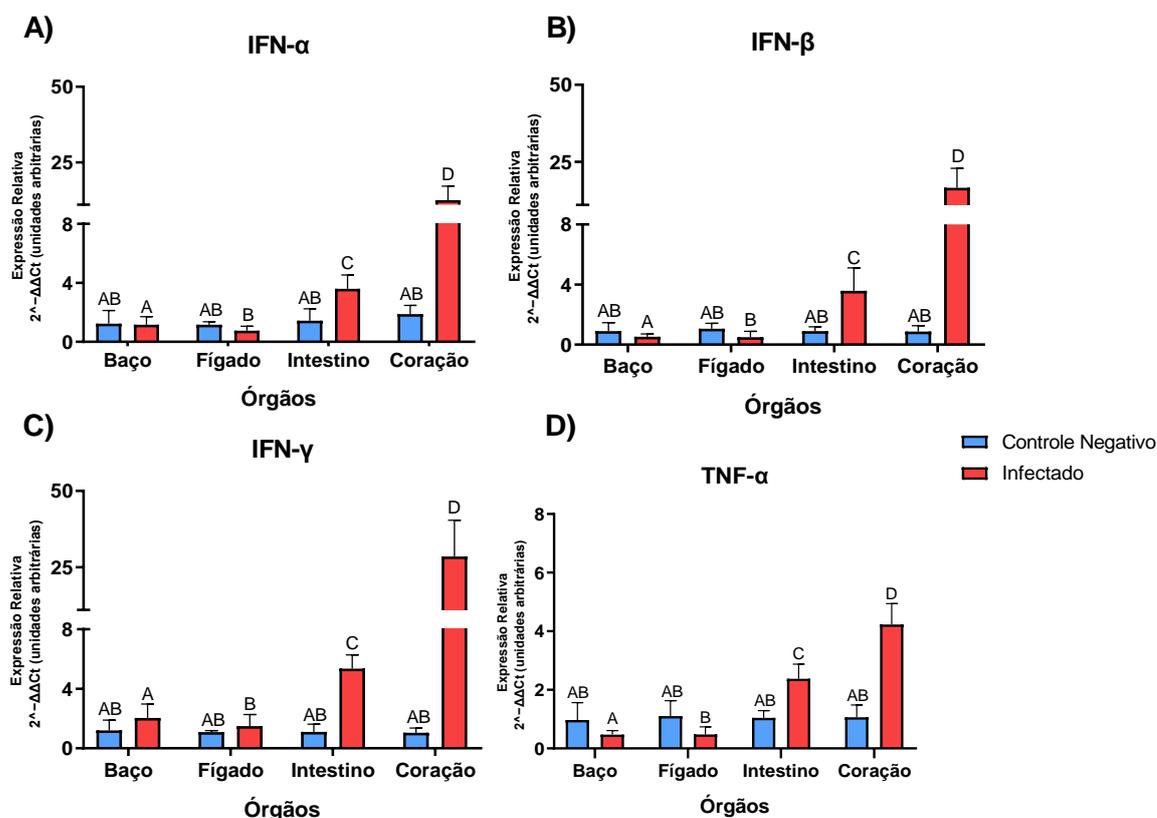


Figura 16. Expressão de genes associados à resposta imune em diferentes tecidos de camundongos Balb/C, infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*. Valores calculados por meio da fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para avaliação da expressão gênica. Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão, tanto para o grupo infectado com *T. cruzi* (barra vermelha) quanto para o controle negativo (barra azul) para os genes de (A) IFN- α ; (B) IFN- β ; (C) IFN- γ e (D) TNF- α . Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

5. Análise da produção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e autoanticorpos contra órgãos alvo

Foram realizados ensaios de ELISA para mensurar a resposta imune adaptativa, detectando anticorpos específicos contra *T. cruzi* e contra autoantígenos intestinais, cardíacos, esplênicos, hepáticos. Esses ensaios tiveram como objetivo complementar os resultados da ativação da resposta imune obtidos por meio das análises de expressão gênica realizadas pelas qPCRs. Todos os animais do grupo infectado apresentaram produção de IgG anti-*T. cruzi*, enquanto no grupo dos animais do controle, um animal apresentou taxa de anticorpos na faixa de produção indeterminada e os demais não apresentaram anticorpos contra o parasito.

Quanto à produção de autoanticorpos, nenhum animal apresentou resultados positivos para anticorpos esplênicos. Similarmente, para os autoanticorpos hepáticos no grupo infectado, nenhum animal foi positivo, sendo que cinco animais não tiveram produção detectada e dois apresentaram resultado indeterminado. Em relação aos autoanticorpos intestinais, todos os sete animais do grupo infectado apresentaram produção de IgG, enquanto os animais controles não apresentaram essa produção. Para os autoanticorpos cardíacos, foi observada a produção de IgG anti-coração em 71% dos animais infectados (5/7), enquanto dois animais do grupo infectado, assim como todos os animais do grupo controle, não apresentaram produção (**Figura 17**).

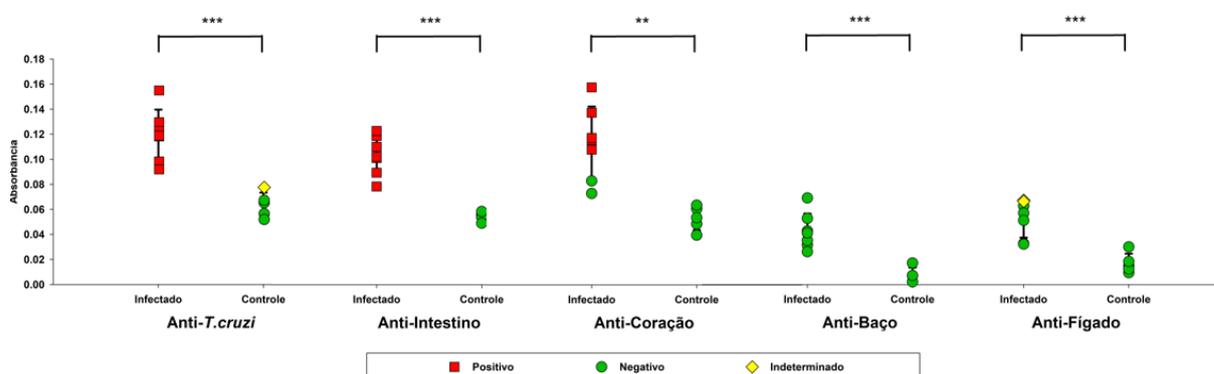


Figura 17. Perfil das taxas de anticorpos produzidos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*, baço, fígado, coração e intestino. O soro de camundongos Balb/C infectados ou não com *T. cruzi* foi analisado por ELISA para determinar as taxas de anticorpos IgG contra antígenos específicos do *T. cruzi* e proteínas desses órgãos. Cada símbolo representa um animal. Os quadrados vermelhos indicam a produção de anticorpos (animais positivos), os círculos verdes indicam a não produção de anticorpos (animais negativos) e os losangos amarelos indicam a não detecção da produção de anticorpos (animais indeterminados). Diferença estatística, ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

6. Análise histopatológica do processo inflamatório nos órgãos alvo

A presença de infiltrado inflamatório foi avaliada no baço, fígado, coração e intestino de animais controle e infectados, com o objetivo de comparar o grau de inflamação, um componente importante de respostas autoimunes (**Figura 18**).

Nenhum animal apresentou infiltrado inflamatório no baço. No fígado, um animal infectado apresentou infiltrado inflamatório moderado, enquanto um animal do grupo controle apresentou um processo inflamatório leve. Nos demais animais, o processo inflamatório não foi detectado neste órgão.

No coração, três animais do grupo controle apresentaram um grau leve de inflamação. Em contraste, no grupo infectado, um animal apresentou inflamação leve/moderada, enquanto outros dois exibiram inflamação moderada. No intestino, o processo inflamatório foi restrito aos animais infectados, sendo classificado como leve em quatro deles. A **Figura 19** apresenta imagens representativas dos achados histopatológicos de inflamação no intestino e no coração.

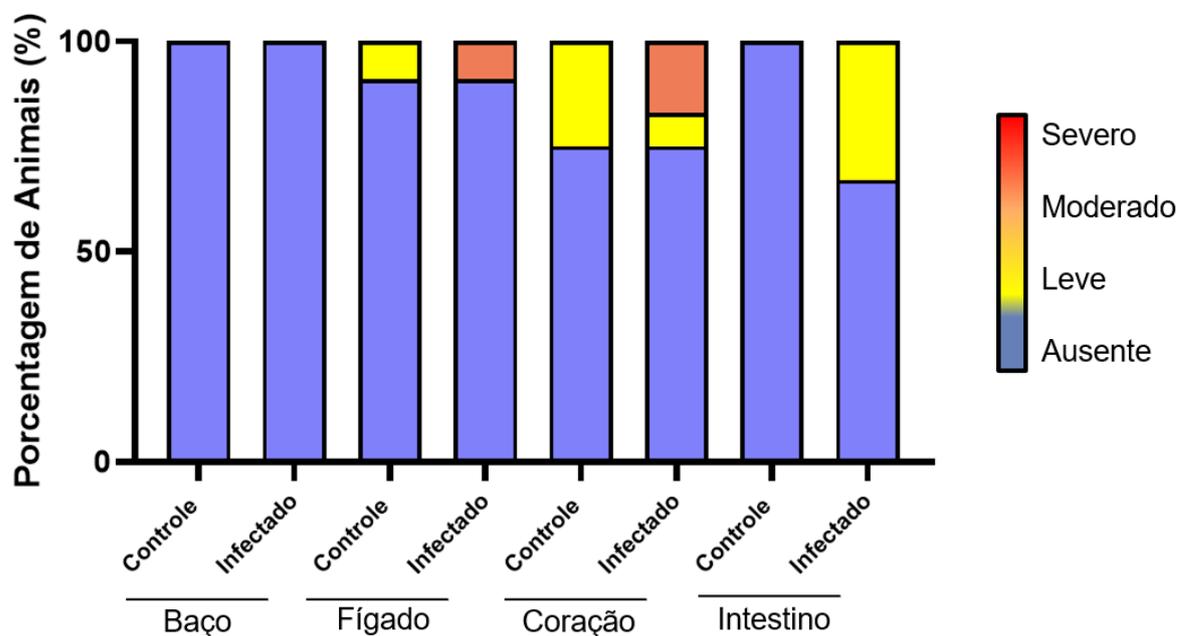


Figura 18. Avaliação histopatológica em porcentagem de animais para detecção de infiltrado inflamatório. Avaliação feita no fígado, baço, coração e intestino após 90 dias de infecção por *T. cruzi* e em período equivalente para os animais não infectados. O grau de inflamação foi avaliado em quatro graus, sendo eles ausente (azul – 0); leve (amarelo – 1); moderado (laranja – 2) e severo (vermelho – 3).

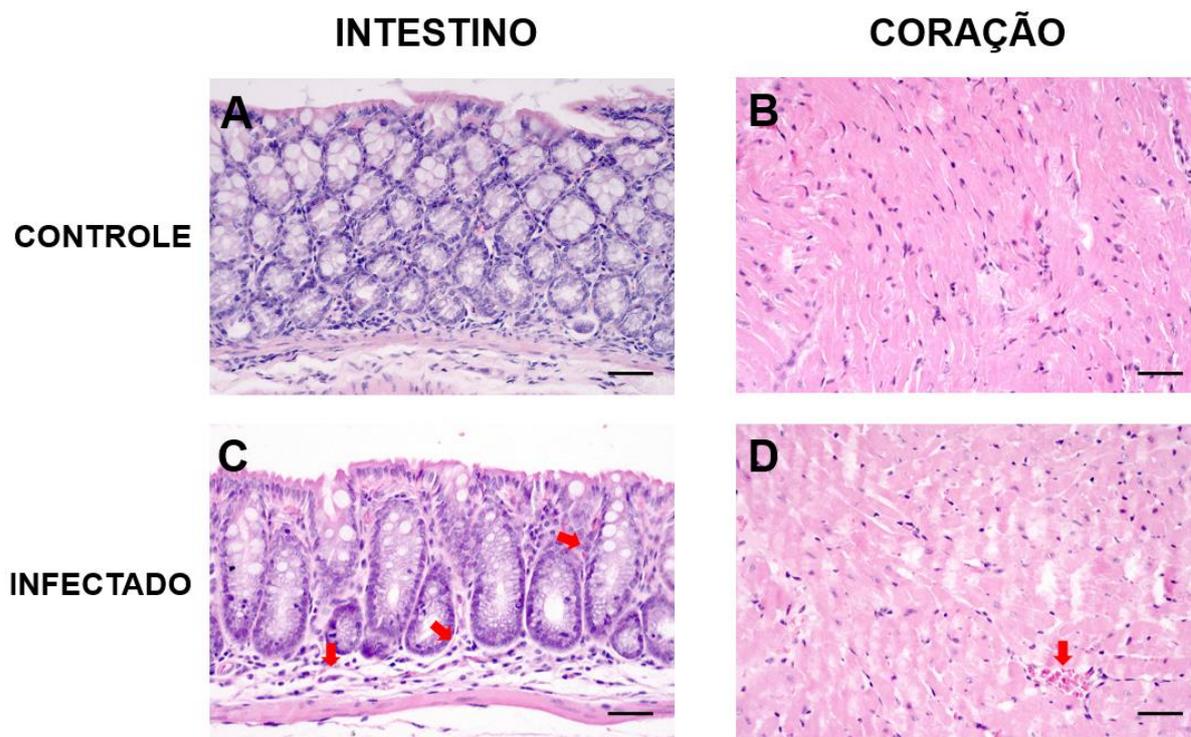


Figura 19. Cortes histológicos do tecido intestinal e cardíaco com imagens representativas dos diferentes grupos experimentais. No painel superior observam-se imagens do tecido intestinal (A) e cardíaco (B) de animais controle, ambos com aspecto tecidual normal, sem alterações. Já no painel inferior, observam-se imagens do tecido intestinal (C) e cardíaco (D) de animais infectados, mostrando o infiltrado inflamatório presente nesses tecidos, identificado pelas setas em vermelho. HE. Barra: 100 μ m.

7. Análise de correlação e componentes principais

A interação entre os parâmetros quantitativos avaliados e o aumento da expressão de L1 em resposta à infecção por *T. cruzi* foi investigada por meio de análise de correlação (**Figura 20**). As correlações positivas indicam que, à medida que uma variável aumenta, a outra também aumenta proporcionalmente, de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson (r). Por outro lado, nas correlações negativas, o aumento de uma variável está associado à diminuição proporcional da outra.

Os resultados revelaram que a carga parasitária não apresentou correlação significativa com a expressão de TNF- α , IFN- α , IFN- β , LINE-1 ou com a produção de autoanticorpos nos órgãos analisados.

Por outro lado, foram identificadas correlações positivas fortes entre diversos fatores: a expressão de TNF- α e IFN- α ($r=0,8$); IFN- β com TNF- α ($r=0,93$) e IFN- α ($r=0,78$); e IFN- γ com TNF- α ($r=0,84$), IFN- α ($r=0,84$) e IFN- β ($r=0,83$). Além disso, a expressão de L1 mostrou fortes correlações positivas com os IFNs α , β e γ ($r = 0,97$; $0,90$; $0,93$, respectivamente), bem como com a produção de autoanticorpos e a expressão de TNF- α ($r=0,77$), IFN- β ($r=0,77$) e

L1 ($r=0,78$). Correlações positivas moderadas também foram observadas entre a expressão de L1 e TNF- α ($r=0,69$), além da produção de autoanticorpos e a expressão de IFN- α ($r=0,56$) e IFN- γ ($r=0,67$). Foi observada apenas uma correlação negativa, sendo ela moderada entre a carga parasitária e a expressão de IFN- γ ($r=-0,65$).

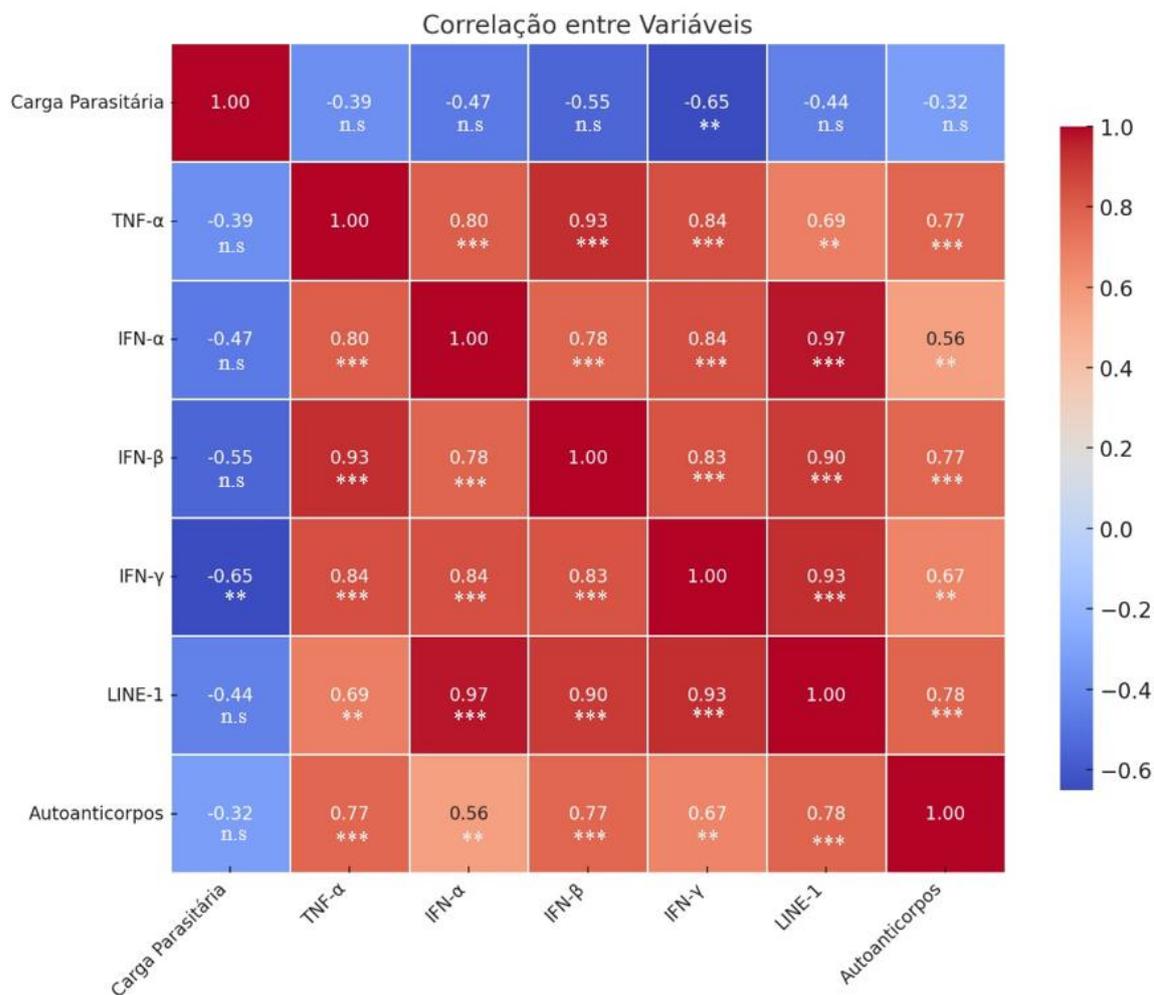


Figura 20. Correlações entre carga parasitária, expressão gênica de TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ e LINE-1 e produção de autoanticorpos nos órgãos avaliados. Coeficientes de correlação de Pearson (r) variando de -1 a 1, com correlações positivas representadas em vermelho e negativas, em azul. A intensidade da cor indica a força da correlação. Diferença estatística, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns – não significativo.

Para contribuir com esses resultados, também foi feita uma análise de componentes principais (PCA) (**Figura 21**). Os eixos de autovetores 1 e 2 explicam 94,9% da variação dos dados, com uma proporção significativa da variação total dos dados sendo explicada pelo autovetor 1 (88,4%). Pode-se notar que a carga parasitária está posicionada no quadrante superior esquerdo, com uma clara separação das demais variáveis. A produção de autoanticorpos, a expressão de IFN- γ , IFN- β , IFN- α , TNF- α e LINE-1 estão agrupados em uma região mais baixa e à direita, indicando que eles estão mais relacionados entre si.

Assim, em uma análise geral, a carga parasitária parece ser uma variável que se comporta de forma diferente em relação às citocinas e autoanticorpos, o que pode ser interpretado como um efeito distinto da infecção em comparação com respostas imunes, as quais estariam sendo determinadas pela expressão de L1.

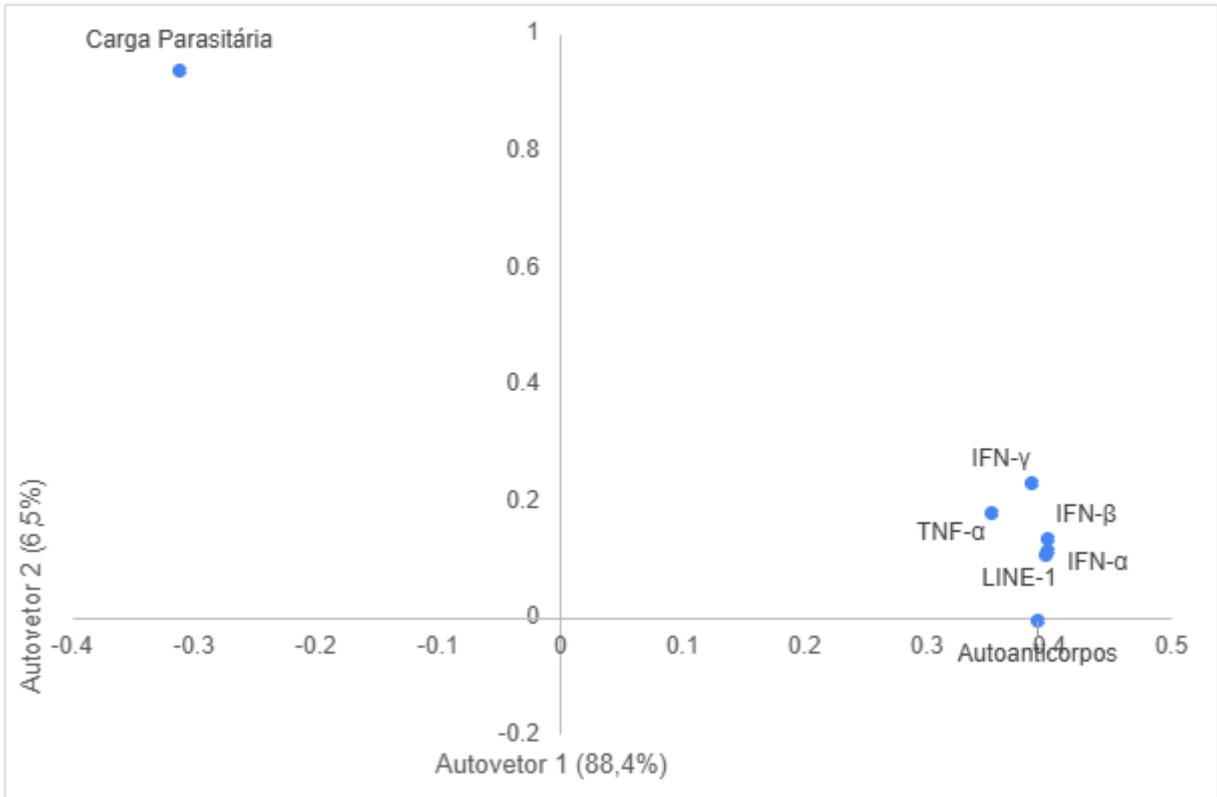


Figura 21. Análise de componentes principais mostrando a associação entre a ativação do L1, a indução da resposta imune, a produção de autoanticorpos e a carga parasitária em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Os valores entre parênteses indicam a variância explicada por cada componente principal (autovetor).

VI. DISCUSSÃO

Embora anos de pesquisa tenham sido dedicados à DC, ainda persistem brechas no entendimento completo de sua patogênese. Um dos principais mistérios dessa enfermidade está no fato de suas manifestações clínicas mais severas ocorrerem na fase crônica, frequentemente décadas após a infecção inicial, mesmo quando a concentração de parasitos circulantes no organismo é baixa (GUARNER, 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento desse fenômeno, o presente estudo investigou o impacto da ativação de retroelementos L1 durante a infecção por *T. cruzi*.

Primeiramente, investigamos a influência do parasito na expressão de L1 em condições *in vitro*. Nos tempos de análise de 12h e 24h, observou-se que o grupo infectado apresentou expressão gênica de L1 equivalente aos controles, seguida por um aumento significativo na expressão relativa desse retroelemento em 48 horas e 96 horas. Sabe-se que a infecção por *T. cruzi* pode estimular a atividade de L1 ao produzir estresse oxidativo e danos ao DNA (Rose et al., 2021), fatores reconhecidos como moduladores desse retroelemento (KLOYPAN et al., 2015; MORRISH et al., 2002). Assim, isso explicaria a maior atividade desse retroelemento às 48h e 96h, o que corrobora com os resultados de Moraes (2022) e Shiroma (2023), que também detectaram o aumento da expressão L1 a partir de 48h pós-infecção, mesmo quando utilizaram cepas distintas à de nosso estudo.

Em seguida, avaliamos a expressão de genes associados à atividade de L1 *in vitro*. Entre os genes com função inibitória, avaliamos a expressão gênica de MOV-10, uma helicase capaz de reconhecer o RNA de L1 e prevenir a sua retrotransposição, ajudando a controlar a instabilidade genômica (ARORA et al., 2022; GOODIER; CHEUNG; KAZAZIAN, 2012; LI et al., 2013). Assim, a ativação desse gene a partir de 48h pós-infecção corrobora nossos resultados anteriores, demonstrando o aumento da expressão de MOV-10 nos tempos em que ocorre uma maior expressão de L1, o que pode ser explicado pela expressão dependente da interação entre MOV-10 e o RNA de L1 (GUAN et al., 2023; LIU et al., 2023). Além disso, a relevância desse gene na inibição de L1 durante a infecção por *T. cruzi* é reforçada pela observação de que, ao suprimirmos a expressão de L1 com o sistema CRISPR/dCas9, a expressão relativa de MOV-10 tende a diminuir ($p=0,09$), um efeito que provavelmente seria mais evidente com um número amostral maior.

Outro gene inibidor de L1 que teve sua expressão relativa aumentada a 96h foi APOBEC-3. A proteína APOBEC-3 promove a desaminação do cDNA retrotransposonal nascente, levando a mutações; interage com a proteína L1-ORF1p, dificultando a transcrição

reversa pela L1-ORF2p; além de já ter sido associada ao sequestro das proteínas de L1 em corpos citoplasmáticos (WARKOCKI, 2023). Desta forma, APOBEC-3 soma-se a MOV-10 na tentativa de conter as consequências deletérias associados à transposição descontrolada desse retroelemento.

Ainda foram avaliadas as expressões dos genes inibidores de L1, SAMHD-1 e TREX-1. A proteína SAMHD-1 é capaz de se ligar à L1-ORF2p, promover o sequestro de L1 em grânulos de estresse, além de desempenhar um papel crucial na regulação da disponibilidade de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) no citoplasma, reduzindo a disponibilidade desses nucleotídeos para a transcrição reversa de L1 (WARKOCKI, 2023). Ainda que tenha essa importante participação na inibição de L1, esse gene não apresentou variação significativa ao longo do tempo. Isso poderia associar-se tanto à não expressão da ORF2 em variantes de L1 com poliadenilação prematura (BELANCIO; HEDGES; DEININGER, 2006), quanto à necessidade de reparo de DNA da célula hospedeira mediante a infecção pelo parasito (GONZÁLES-CÓRDOVA et al., 2024) tornando imprescindível a oferta de dNTPs para síntese da nova dupla-fita. Desta forma, neste contexto de infecção, a regulação orquestrada dessa via seria essencial para manter a integridade do genoma, permitindo que as células sigam com o ciclo celular e sobrevivam.

Já TREX-1 é uma proteína capaz de remover o cDNA de L1 e reduzir os níveis da proteína ORF1p (LI et al., 2017; STETSON et al., 2008). Em nosso estudo, não observamos variação significativa de sua expressão gênica ao longo do tempo, indicando uma influência limitada na atividade de L1 durante a infecção por *T. cruzi*. De interesse, já foi demonstrado que alguns vírus, como o HIV, impedem a ativação de TREX-1 como parte de seus mecanismos de escape imunológico, para evitar a degradação de seu próprio material genético (GUHA; AYYAVOO, 2013). Considerando que o *T. cruzi* exporta seu DNA mitocondrial para a célula hospedeira (SIMÕES-BARBOSA et al., 2006; Moraes, 2022; Shiroma, 2023), tal estratégia também poderia ser adotada por ele. Entretanto, novas investigações que avaliem o papel de TREX-1 em células infectadas pelo parasito são necessárias para avaliar tal hipótese.

Analisando os resultados de maneira conjunta, ressaltamos que tanto MOV-10 quanto APOBEC-3 atuam mais a nível pós-transcricional (FU et al., 2019; LIBRE et al., 2022) e, assim, é possível que esteja havendo uma inibição da síntese das proteínas de L1, o que não foi avaliado em nosso estudo. Entretanto, sabe-se a inibição da retrotransposição de L1 se dá de maneira mais efetiva em situações em que diferentes componentes estão atuando de maneira simultânea (ARDELJAN et al., 2017).

Dando continuidade aos experimentos, investigamos o comportamento da expressão de genes envolvidos em vias de reparo de DNA, que desempenham um papel ambíguo na modulação da atividade de L1, podendo tanto facilitar a inserção do retroelemento quanto restringir sua mobilidade para preservar a integridade do genoma (GASIOR et al., 2006; MITA et al., 2020; SERVANT et al., 2017). Neste contexto, outro aspecto relevante para a discussão é a ativação de vias de reparo durante a infecção por *T. cruzi* (ROSE et al., 2021).

Analisando temporalmente nossos dados, observamos que, nos tempos iniciais da infecção, houve um aumento da expressão de XPA e ATM, representando a ativação das vias NER e HR, respectivamente. De fato, outros estudos já demonstraram que essas vias são ativadas pelo estresse celular causado pela infecção por *T. cruzi* (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020b; ROSE et al., 2021). Ao mesmo tempo que visam combater os efeitos da infecção pelo parasito, essas vias podem estar atuando para controlar a atividade de L1. Sabe-se que a via NER suprime L1 ao regular o processo de retrotransposição mediante interação do complexo de proteínas ERCC1-XPF e o cDNA de LINE-1 em elongação, clivando-o (SERVANT et al., 2017). Igualmente, fatores da via HR podem impedir a progressão da retrotransposição mediante ligação de BRCA1 ao RNA de L1 no citoplasma e consequente redução da síntese de L1-ORF2p (MITA et al., 2020).

A via MMR, avaliada pela expressão de MSH-2, foi ativada a partir de 48h pós infecção, permanecendo aumentada até 96h. Entretanto, o papel direto dessa via de reparo na regulação do L1 é pouco abordado na literatura. Assim, a ativação do MMR nesse contexto pode representar principalmente uma resposta celular mais geral ao reparo dos danos no DNA causados pelo *T. cruzi*, ao invés de um mecanismo direto de modulação do L1. Mais estudos são necessários para se estabelecer a real relação de MMR com L1.

Já XRCC-4, referente à ativação da via NHEJ, apresenta maior expressão do grupo infectado comparado ao controle nos tempos de avaliação de 48h e 96h. Apesar de NHEJ poder suprimir a atividade de L1 ao induzir inserções truncadas na extremidade 5' e reparo das DSBs (SUZUKI et al., 2009) também já foi relatado que L1 pode utilizar a maquinaria de NHEJ no processo de retrotransposição (MORRISH et al., 2002) e que a inibição dessa via de reparo diminui a atividade de L1 (SUZUKI et al., 2009).

Por fim, também avaliamos a expressão de OGG-1, um componente importante da via BER, ao longo do tempo. No entanto, não observamos variação significativa de sua expressão gênica ao longo do tempo. Esse resultado sugere que a via de reparo mediada por OGG-1 pode não ter sido ativada, possivelmente porque outras vias de reparo, voltadas para combater o estresse oxidativo causado pela infecção por *T. cruzi*, foram mais relevantes. Essas vias podem

estar lidando com DSBs, em vez de lesões pequenas no DNA, como desaminação e oxidação, que são reparadas pela BER. Outra possibilidade é que a expressão de OGG-1 tenha ocorrido em um estágio mais precoce, já que essa proteína atua na fase inicial da via de reparo BER. Pesquisas anteriores indicam que o recrutamento de enzimas de BER pelo *T. cruzi* acontece nas primeiras etapas do reparo do DNA (FLORENTINO et al., 2021; ROSE et al., 2021). No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer essa questão.

Visto que o retroelemento L1 atua sobre genes ativadores de IFN, nossa próxima etapa consistiu em avaliar a expressão desses genes no contexto da infecção por *T. cruzi*. MDA-5 e RIG-1 são importantes sensores de RNA e mostraram-se superexpressos em momentos mais avançados de nossas análises: enquanto observou-se um aumento na expressão de MDA-5 nos tempos de 24h, 48h e 96h em comparação aos demais grupos, RIG-1 apresentou maior expressão no tempo de 96h.

A ativação de MDA-5 a 24h, 48h e 96h provavelmente está relacionada às etapas da retrotransposição de L1 na célula hospedeira. Considerando que MDA-5 detecta o dsRNA longo formado durante infecções virais (FENG et al., 2012), pode ser que essa detecção também ocorra durante a transcrição reversa desse retroelemento, já que existem etapas de formação de dsRNA. Esta observação se torna mais evidente quando a expressão de L1 é reduzida pelo sistema CRISPR/dCas9, levando a uma redução da expressão de MDA-5.

Já para RIG-I, o qual detecta dsRNA curtos (SAITO; GALE, 2008), o aumento a 96h pode refletir o reconhecimento das variantes truncadas ou fragmentos de L1. Assim, a ativação desse sensor de RNA apenas em um tempo mais tardio pode refletir a atuação da maquinaria de reparo celular ao longo do período de infecção, com a clivagem dos intermediários de L1 e formação de fragmentos de até 300 pb (STENZ, 2021). Desta forma, a capacidade de *T. cruzi* de estimular vias de detecção de RNA e consequentemente modular a resposta imune, pode representar um mecanismo adaptativo para facilitar sua sobrevivência no hospedeiro (MACALUSO et al., 2023).

De interesse, tanto RIG-1 quanto MDA-5 já foram descritos como estando superexpressos na infecção por *T. cruzi* (CHESSLER et al., 2008; MANQUE et al., 2011), bem como outros sensores de ácidos nucleicos. GIL-JARAMILLO et al., 2021, por exemplo, detectaram o aumento de sensores como AIM2, IFI16 e RIG-I na infecção de células dendríticas infectadas por *T. cruzi* e, em suas conclusões, alertam para a existência de vias antivirais como um processo inexplorado durante a interação do hospedeiro com o parasito.

Interessantemente, observamos um aumento na produção dos IFNs avaliados no grupo infectado sempre com picos de produção após 48h de infecção, coincidindo com o aumento da

expressão de L1. Em relação aos IFNs do tipo I, nota-se uma maior expressão de IFN- β , corroborando com o que está descrito na literatura, que demonstra a maior produção dessa citocina em contextos de retrotransposição (YU et al., 2015), enquanto a produção de IFN- α geralmente é menor, pois depende de feedback positivo gerado pelo IFN- β (LEVIYANG; GRIVA, 2018). Similar aos nossos achados, Aldaif; Mercer; Fleming, 2022, demonstraram que a infecção de células HEK-293 por parapoxvirus se utiliza dos receptores RIG-I e MDA5 para induzir uma forte expressão de IFN- β .

Em relação à IFN- γ , esta é uma citocina fundamental para a resposta imunológica contra *T. cruzi* e uma das principais responsáveis pelo controle da infecção (SERBAN et al., 2015). Entretanto, sua produção em células HEK-293 costuma ser ausente ou irrisória, visto que essas células são consideradas deficientes na via JAK/STAT (LV et al., 2024; REYNOLDS et al., 2006). Desta forma, nossos achados de aumento da expressão de IFN- γ após 48h de infecção são surpreendentes, porém corroboram o estudo de Serban et al., 2015, que detectaram a presença de IFN- γ no lisado de culturas de HEK-293 após exposição a produtos de glicação avançada (AGES) em um contexto de diabetes mellitus.

Também se mostrou inesperada a participação de L1 na expressão dessa citocina, uma vez que a inibição de L1 pelo sistema CRISPR/dCas9 resultou em uma menor expressão de IFN- γ . Desta forma, nossos resultados sugerem que a ativação de IFN- γ na infecção por *T. cruzi* pode ser independente da via JAK/STAT e utilizar vias de vigilância citosólica atualmente desconhecidas, mediadas por L1. Se de fato existir, essa via poderia aliviar o ônus da presença física de *T. cruzi* como fator necessário para manter o perfil pró-inflamatório no contexto da infecção. Mais estudos são necessários para esclarecer essas questões.

Após a confirmação de que a infecção por *T. cruzi* é capaz de induzir a expressão de L1 e a consequente produção de IFNs *in vitro*, direcionamos nossos esforços para avaliar o que estaria acontecendo *in vivo*. Nas análises realizadas em tecidos de camundongos, observou-se um aumento significativo nos níveis de mRNA de L1 nos órgãos do grupo infectado em comparação ao controle, com maior ativação desse retroelemento no coração, seguida pelo intestino, os principais órgãos afetados na doença de Chagas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; PIERROTTI et al., 2018). De importância, sabe-se que a expressão basal de L1 ocorre de maneira diferenciada em cada local, estando ela naturalmente aumentada nos testículos, esôfago, coração e intestino (BELANCIO et al., 2010). Além disso, é importante destacar que a carga parasitária foi equivalente em todos os órgãos analisados, exceto entre o intestino e o coração, tendo este último apresentado uma carga parasitária reduzida ($p=0,05$). Desta forma,

tais achados sugerem que a ativação de L1 não depende da abundância do parasito no tecido, fato que fica bem evidenciado pela análise de correlação e de componentes principais.

Sabendo que a ativação de retroelementos pode desencadear um aumento na resposta imune, promovendo processos inflamatórios persistentes e, potencialmente, a predisposição a doenças autoimunes (DE CECCO et al., 2019; GARCÍA PÉREZ; ALARCÓN-RIQUELME, 2017; THOMAS et al., 2017), procedemos com a avaliação da expressão de IFNs e TNF- α nos mesmos tecidos analisados anteriormente. Foi observado que o aumento na expressão desses genes associados a um perfil pró-inflamatório ocorreu apenas no coração e intestino ($p \leq 0,05$), enquanto a expressão dos mesmos genes no baço e no fígado não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

A não indução da expressão de IFNs nesses dois órgãos pode residir no fato de que neles predomina a expressão de uma variante endógena de L1 resultante de *splicing* alternativo e que é poliadenilada prematuramente, tornando-a incompleta funcionalmente (BELANCIO et al. 2010). Desta forma, as vias subsequentes que seriam ativadas pelo retroelemento podem estar prejudicadas. Já no coração e no intestino, predomina a variante completa e totalmente funcional de L1 (BELANCIO et al. 2010).

A manutenção de ambiente inflamatório pela expressão dos IFNs está relacionada ao desencadeamento de respostas autoimunes, nas quais se observa a presença de infiltrados inflamatórios e anticorpos autorreativos (BILLIAU, 1996; CROW; OLFERIEV; KIROU, 2018; RÖNNBLUM; ELORANTA, 2013). Especialmente os IFNs do tipo I podem ativar as células B a produzirem autoanticorpos. O IFN- α , por exemplo, é particularmente relevante em doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, onde ele pode estimular células B a produzirem autoanticorpos contra o DNA ou nucleossomos (TANAKA; KUSUDA; YAMAGUCHI, 2023). Já a importância de IFN- β em doenças autoimunes foi descrita na esclerose múltipla, por exemplo (KRUMBHOLZ et al., 2008).

Outro ponto de destaque é que TNF- α desempenha um papel fundamental na ativação de vias inflamatórias, incluindo aquelas que envolvem a produção de IFNs (KARKI et al., 2021). Em nosso estudo, observamos uma associação entre a expressão gênica desses fatores. No caso de doenças inflamatórias intestinais como a colite ulcerativa e a Doença de Crohn, o TNF- α está intimamente envolvido na regulação das respostas imunes (JANG et al., 2021). Nesses quadros, o TNF- α contribui para o desenvolvimento de um ambiente inflamatório crônico, favorecendo a infiltração de células imunes e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como os IFNs, que exacerbam a inflamação e danificam os tecidos intestinais (JANG et al., 2021).

Neste trabalho, os resultados de ELISA demonstram a existência de autoanticorpos apenas contra coração e intestino, corroborando com os achados de Wesley et al., 2019, e Dias et al., 2024. Considerando que a análise de correlação mostrou uma forte associação entre os autoanticorpos, a expressão de L1 e a produção de IFNs, esta pode ser uma possível explicação para a resposta autoimune observada na doença de Chagas.

Ao avaliarmos a presença de processo inflamatório tecidual, não se detectou nenhum grau de inflação no baço dos animais infectados, enquanto apenas um animal desse grupo apresentou processo inflamatório moderado no fígado. Ainda que lesões inflamatórias crônicas já tenham sido relatadas no fígado de camundongos com doença de Chagas (MARINHO et al., 2004), tal achado não é comum e poderia estar associada a outras causas, visto que só foi detectada em um animal.

Como esperado, o processo inflamatório no intestino só foi observado em animais infectados, ainda assim apenas em grau leve. Isso pode ser devido ao fato de que o modelo murino tem limitações em refletir a severidade das manifestações clínicas da doença de Chagas humana (CHATELAIN; KONAR, 2015), além de os animais ainda estarem em um momento inicial da fase crônica, período em que as manifestações clínicas da doença ainda não teriam surgido (CARMO et al., 2024; DA CUNHA; CUNHA, 2022).

Em relação ao tecido cardíaco, os animais infectados com *T. cruzi* apresentaram grau de inflamação moderado, em detrimento ao grau leve encontrado nos animais do grupo controle. A esse respeito, diferentes fatores podem desencadear uma inflamação discreta mesmo na ausência de infecção, variando desde condições ambientais até o próprio envelhecimento (BEKTAS et al., 2018).

Ademais, vale ressaltar que o processo inflamatório foi detectado exatamente nos órgãos em que se observou um aumento acentuado da expressão de L1 e produção de IFNs, de maneira dissociada da carga parasitária. Novamente, esses resultados sugerem a participação do retroelemento L1 na modulação da resposta autoimune da doença de Chagas.

VII. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que a infecção por *Trypanosoma cruzi* está intimamente associada à ativação de retroelementos LINE-1, impactando a resposta autoimune. Nossos achados sugerem que a ativação de L1 pode ser um fator-chave no desenvolvimento de respostas inflamatórias e autoimunes durante a infecção.

- Observamos um aumento significativo na expressão de L1 em modelo celular e murino infectados por *T. cruzi*, sugerindo que o parasita atua como um gatilho para a ativação desses retroelementos;
- Nossos dados revelaram a regulação diferencial de genes associados a atividade de L1 durante a infecção, indicando um esforço inicial do hospedeiro para conter a ativação de L1, seguido por uma falha desse mecanismo em estágios mais avançados;
- Identificamos que a ativação de L1 está correlacionada com a sinalização de interferons, incluindo IFN- α e IFN- β , por meio de vias como MDA-5 e RIG-1. Interessantemente, também foi observado o aumento da expressão de IFN- γ acompanhando os tempos em que houve aumento de L1. Esses resultados reforçam a ligação entre a retrotransposição de L1 e a indução de respostas inflamatórias mediadas por IFNs;
- A inibição de L1 pelo sistema CRISPR/dCas-9 reduziu a expressão de genes relacionados à atividade desse retroelemento e a produção de IFNs, fortalecendo a evidência da relação entre L1 e a resposta inflamatória;
- Em modelo murino, investigamos a relação entre a ativação de L1, a carga parasitária e a produção de autoanticorpos. Observamos uma maior atividade de L1 no coração e no intestino, órgãos frequentemente afetados pela DC, sem correlação direta com a carga parasitária. Esses achados reforçam a hipótese de que L1 desempenha um papel central na amplificação da resposta autoimune e na progressão das manifestações clínicas tardias da DC.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. v. 77, n. 3, p. 437–454, 2005.

ABEL, L. C. J. et al. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11–12, p. 1184–1195, ago. 2005.

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. **The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 24 ago. 2018.

ALDAIF, B. A.; MERCER, A. A.; FLEMING, S. B. The parapoxvirus Orf virus inhibits IFN- β expression induced by dsRNA. **Virus Research**, v. 307, 2 jan. 2022.

ALDASORO, E. et al. What to expect and when: Benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 1060–1067, 1 abr. 2018.

ANDRADE, V. et al. **AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CEPAS DO TRYPANOSOMA CRUZI NA INFECÇÃO DE SEIS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. [s.l: s.n.].

AOKI, M. P. et al. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 286, p. 206–212, 2004.

ARAUJO, P. F. et al. Sexual transmission of american trypanosomiasis in humans: A new potential pandemic route for chagas parasites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437–446, 2017.

ARDELJAN, D. et al. **The human long interspersed element-1 retrotransposon: An emerging biomarker of Neoplasia**. **Clinical Chemistry** American Association for Clinical Chemistry Inc., , 1 abr. 2017.

ARIUMI, Y. **Guardian of the human genome: Host defense mechanisms against LINE-1 retrotransposition**. **Frontiers in Chemistry** Frontiers Media S. A., , 2016.

ARORA, R. et al. Sequestration of LINE -1 in cytosolic aggregates by MOV10 restricts retrotransposition . **EMBO reports**, v. 23, n. 9, 5 set. 2022.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. **IFN-g in human Chagas' disease: protection or pathology?** **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [s.l: s.n.].

BAILLIE, J. K. et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 534–537, 24 nov. 2011.

BAKR, A. et al. Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 6, p. 3154–3166, 31 mar. 2015.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. **Recruitment and Endo-Lysosomal Activation of TLR9 in Dendritic Cells Infected with Trypanosoma cruzi** *The Journal of Immunology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/181/2/1333/1258780/zim01408001333.pdf>>.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.

BECK, C. R. et al. **LINE-1 elements in structural variation and disease**. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 13 jul. 2011.

BEKTAS, A. et al. **Aging, inflammation and the environment**. **Experimental Gerontology** Elsevier Inc., , 1 maio 2018.

BELANCIO, V. P. et al. Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. 3909–3922, 9 mar. 2010.

BELANCIO, V. P.; HEDGES, D. J.; DEININGER, P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 5, p. 1512–1521, 2006.

BELGNAOUI, S. M. et al. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 6, 2 maio 2006.

BERMEJO, D. A. et al. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 1 maio 2010.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.

BILLIAU, A. **Interferon-in Autoimmunity** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. [s.l.: s.n.].

BONA, N.; CROSSAN, G. P. Fanconi anemia DNA crosslink repair factors protect against LINE-1 retrotransposition during mouse development. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 30, n. 10, p. 1434–1445, 1 out. 2023.

BONNEY, K. M. et al. **Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease**. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease** Annual Reviews Inc., , 2019.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr36/en/index.html>.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead**. **American Journal of Pathology** Elsevier Inc., , 1 jun. 2015.

BRENER, Z. **THERAPEUTIC ACTIVITY AND CRITERION OF CURE ON MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH TRYPANOSOMA CRUZI.** [s.l: s.n.].

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. **THE MECHANISMS OF TRYPANOSOMA CRUZI INVASION OF MAMMALIAN CELLS** *IL Rev. Microbiol.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

CARDILLO, F. et al. **Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection.** [s.l: s.n.].

CARMO, M. et al. **Clinical features of Chagas disease progression and severity.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.thelancet.com>.

CHAGAS, C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of Schyzotrypanum cruzi, the cause of a new human disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 47, p. 159–218, 1909.

CHANG, H. H. Y. et al. **Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2017.

CHATELAIN, E.; KONAR, N. **Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review.** *Drug Design, Development and Therapy* Dove Medical Press Ltd., , 19 ago. 2015.

CHESSLER, A. D. C. et al. Type I interferons increase host susceptibility to trypanosoma cruzi infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 2112–2119, maio 2011.

CHESSLER, A.-D. C. et al. **A Novel IFN Regulatory Factor 3-Dependent Pathway Activated by Trypanosomes Triggers IFN-in Macrophages and Fibroblasts** *The Journal of Immunology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/181/11/7917/1259033/zim02308007917.pdf>>.

CHUONG, E. B.; ELDE, N. C.; FESCHOTTE, C. **Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits.** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 1 fev. 2017.

COQUEL, F. et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. **Nature**, v. 557, n. 7703, p. 57–61, 3 maio 2018.

COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC Genomics**, v. 10, 29 maio 2009.

COUFAL, N. G. et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 51, p. 20382–20387, 20 dez. 2011.

CROW, M. K.; OLFERIEV, M.; KIROU, K. A. Type I Interferons in Autoimmune Disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 2019, v. 14, p. 369–393, 2018.

DA CUNHA, A. B.; CUNHA, D. M. Revisiting the History of Chagas Disease: "Live to tell". **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 35, n. 2, p. 267–282, 2022.

DE BONA, E. et al. **Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy?** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 6 ago. 2018.

DE CECCO, M. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. **Nature**, v. 566, n. 7742, p. 73–78, 7 fev. 2019.

DE MELO CRUVINEL, W. et al. **Immune system-Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response** **Bras J Rheumatol.** [s.l: s.n.].

DE SOUSA, A. S. et al. **Chagas disease.** **The Lancet** Elsevier B.V., , 13 jan. 2024.

DEUTSCHMANN, J.; GRAMBERG, T. **SAMHD1 . . . And viral ways around it.** **Viruses** MDPI AG, , 1 mar. 2021.

DHIMAN, M. et al. MnSODtg Mice Control Myocardial Inflammatory and Oxidative Stress and Remodeling Responses Elicited in Chronic Chagas Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 5, 2013.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E. J. **Mecanismos alternativos de Transmissão do trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção.** **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, maio 2011.

DIAS, N. et al. Network Analysis of Pathogenesis Markers in Murine Chagas Disease Under Antimicrobial Treatment. **Microorganisms**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2024.

DIRUSSO, J. A.; CLARK, A. T. **Transposable elements in early human embryo development and embryo models.** **Current Opinion in Genetics and Development** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2023.

ERSCHING, J. et al. A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4+ Foxp3+ T Cells. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2016.

ESPER, L. et al. **Molecular mechanisms of myocarditis caused by Trypanosoma cruzi.** **Current Opinion in Infectious Diseases** Lippincott Williams and Wilkins, , 6 jun. 2015.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. **THE MOLECULAR CELL BIOLOGY OF INTERFERON- γ AND ITS RECEPTOR** *Ann. Rev. Immunol.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

FENG, Q. et al. MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1187–1196, 29 nov. 2012.

FLORENTINO, P. T. V. et al. DNA damage and oxidative stress in human cells infected by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4 April, 1 abr. 2021.

FORSYTH, C. J. et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1056–1062, 15 out. 2016.

FRANCISCO, A. F. et al. Comparing in vivo bioluminescence imaging and the Multi-Cruzi immunoassay platform to develop improved Chagas disease diagnostic procedures and biomarkers for monitoring parasitological cure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 10, 2022.

FU, K. et al. Biological and RNA regulatory function of MOV10 in mammalian germ cells. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, 14 maio 2019.

GARCÍA PÉREZ, J. L.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. **The TREX1 Dinosaur Bites the Brain through the LINE**. *Cell Stem Cell* Cell Press, , 7 set. 2017.

GASIOR, S. L. et al. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 5, p. 1383–1393, 14 abr. 2006.

GIL-JARAMILLO, N. et al. The First Contact of Human Dendritic Cells With *Trypanosoma cruzi* Reveals Response to Virus as an Unexplored Central Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 9 abr. 2021.

GIRONÈS, N.; CUERVO, · H; FRESNO, · M. **Trypanosoma cruzi-Induced Molecular Mimicry and Chagas' Disease** CTMI. [s.l.] Springer-Verlag, 2005.

GOMES, C. et al. **American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission**. *International Journal of Infectious Diseases* Elsevier B.V., , 1 abr. 2019.

GONZÁLES-CÓRDOVA, R. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces DNA double-strand breaks and activates DNA damage response pathway in host epithelial cells. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

GOODIER, J. L. et al. The Broad-Spectrum Antiviral Protein ZAP Restricts Human Retrotransposition. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 5, 1 maio 2015.

GOODIER, J. L.; CHEUNG, L. E.; KAZAZIAN, H. H. MOV10 RNA Helicase Is a Potent Inhibitor of Retrotransposition in Cells. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 10, out. 2012.

GUAN, Y. et al. The MOV10 RNA helicase is a dosage-dependent host restriction factor for LINE1 retrotransposition in mice. **PLoS Genetics**, v. 19, n. 5, 1 maio 2023.

GUARNER, J. **Chagas disease as example of a reemerging parasite. Seminars in Diagnostic Pathology**W.B. Saunders, , 1 maio 2019.

GUHA, D.; AYYAVOO, V. Innate Immune Evasion Strategies by Human Immunodeficiency Virus Type 1. **ISRN AIDS**, v. 2013, p. 1–10, 12 ago. 2013.

GUIMARO, M. C. et al. Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 18 dez. 2014.

GUO, L. et al. Effects of short-term exposure to inhalable particulate matter on DNA methylation of tandem repeats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 322–335, 2014.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunology**, nov. 2009.

HATANAKA, Y. et al. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14641–14646, 24 nov. 2015.

HE, J. et al. Transposable elements are regulated by context-specific patterns of chromatin marks in mouse embryonic stem cells. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

HECHT, M. M. et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 12 fev. 2010.

HIGUCHI, M. DE L. et al. **Correlation Between Trypanosoma Cruzi Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis: Light Microscopy and Immunohistochemical Findings**Cardiovasc Pathol. [s.l: s.n.].

HOCHBERG, N. S.; MONTGOMERY, S. P. Chagas Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 176, n. 2, p. ITC17–ITC32, 1 fev. 2023.

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4934–4940, ago. 2005.

IMGENBERG-KREUZ, J.; SANDLING, J. K.; NORDMARK, G. Epigenetic alterations in primary Sjögren's syndrome – an overview. **Clinical Immunology**, v. 196, p. 12–20, 1 nov. 2018.

JANG, D. I. et al. **The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 1 mar. 2021.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. **Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**Frontiers Media S.A., , 6 fev. 2020.

JIN, M. H.; OH, D. Y. **ATM in DNA repair in cancer. Pharmacology and Therapeutics**Elsevier Inc., , 1 nov. 2019.

KANO, H. et al. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. **Genes and Development**, v. 23, n. 11, p. 1303–1312, 1 jun. 2009.

KARAGIANNI, P. et al. DNA Methylation Studies in Saliva of Patients with Sjögren's Syndrome. **Mediterranean Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 176–178, 2021.

KARKI, R. et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149- 168.e17, 7 jan. 2021.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, v. 441, n. 1, p. 101–105, 4 maio 2006.

KAYAMA, H. et al. NFATc1 mediates toll-like receptor-independent innate immune responses during Trypanosoma cruzi infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, jul. 2009.

KINOMOTO, M. et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 2955–2964, maio 2007.

KLOYPAN, C. et al. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 6, p. 375–384, 1 ago. 2015.

KOHLRAUSCH, F. B. et al. **Control of LINE-1 Expression Maintains Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development. Reproductive Sciences**Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 fev. 2022.

KRUMBHOLZ, M. et al. Interferon- β increases BAFF levels in multiple sclerosis: Implications for B cell autoimmunity. **Brain**, v. 131, n. 6, p. 1455–1463, jun. 2008.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. **The relative contribution of antibody production and CD8 β T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi.** [s.l: s.n.].

LA CAVA, A. **Regulatory immune cell subsets in autoimmunity. Autoimmunity**, fev. 2011.

LANDER, S. et al. **Initial sequencing and analysis of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium* The Sanger Centre: Beijing Genomics Institute/Human Genome Center**NATURE. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com>.

- LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. **Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.parasitology-online.com>.
- LEVIYANG, S.; GRIVA, I. Investigating functional roles for positive feedback and cellular heterogeneity in the type I interferon response to viral infection. **Viruses**, v. 10, n. 10, 1 out. 2018.
- LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, 2014.
- LI, D.; WU, M. **Pattern recognition receptors in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2021.
- LI, P. et al. Aicardi-Goutières syndrome protein TREX1 suppresses L1 and maintains genome integrity through exonuclease-independent ORF1p depletion. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 8, p. 4619–4631, 5 maio 2017.
- LI, X. et al. The MOV10 helicase inhibits LINE-1 mobility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 29, p. 21148–21160, 19 jul. 2013.
- LIAO, J. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 469–478, 30 maio 2015.
- LIBRE, C. et al. A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2022.
- LIDANI, K. C. F. et al. **Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. Journal of Physical Oceanography** American Meteorological Society, , 2019.
- LIU, Q. et al. MOV10 recruits DCP2 to decap human LINE -1 RNA by forming large cytoplasmic granules with phase separation properties . **EMBO reports**, v. 24, n. 9, 6 set. 2023.
- LIU, Y.; LI, Y.; LU, X. **Regulators in the DNA damage response. Archives of Biochemistry and Biophysics** Academic Press Inc., , 15 mar. 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LV, Y. et al. **The JAK-STAT pathway: from structural biology to cytokine engineering. Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2024.
- MACALUSO, G. et al. **A Review on the Immunological Response against *Trypanosoma cruzi*. Pathogens** MDPI, , 1 fev. 2023.
- MANQUE, P. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in Cardiomyocytes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855–1862, maio 2011.

MARCON, G. E. B. ET AL. **Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients.** [s.l: s.n.].

MARINHO, C. R. F. et al. Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by A Trypanosoma cruzi Clone: A Model for Genetic Studies of Chagas' Disease. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2350–2357, abr. 2004.

MARKKANEN, E. **Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage.** **DNA Repair** Elsevier B.V., , 1 nov. 2017.

MASLOWSKA, K. H.; MAKIELA-DZBENSKA, K.; FIJALKOWSKA, I. J. **The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage.** **Environmental and Molecular Mutagenesis** John Wiley and Sons Inc., , 1 maio 2019.

MCCORMICK, T. S. ; R. E. C. Trypanosoma cruzi: recognition of a 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. 1993.

MEDSTRAND, P.; VAN DE LAGEMAAT, L. N.; MAGER, D. L. Retroelement distributions in the human genome: Variations associated with age and proximity to genes. **Genome Research**, v. 12, n. 10, p. 1483–1495, 1 out. 2002.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** [s.l: s.n.].

MITA, P. et al. BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 179–191, 1 fev. 2020.

MORILLO, J. A. M. A. A. S. S. A. R. JR. , F. R. E. V. R. Q. R. B. C. B. F. G. E. V. L. B. B. M. P. R. J. P. A. M. J. L. A. R. S. J. C. AND S. Y. **Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy.** **Archivos Argentinos de Pediatria** Sociedad Argentina de Pediatria, , 1 abr. 2015.

MORRISH, T. A. et al. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. **Nature Genetics**, v. 31, n. 2, p. 159–165, 2002.

MUOTRI, A. R. et al. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. **Nature**, v. 435, n. 7044, p. 903–910, 16 jun. 2005.

NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. DNA repair and chromosomal alterations. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 657, n. 1, p. 3–7, 17 nov. 2008.

NAVARRO, I. C. et al. MicroRNA transcriptome profiling in heart of trypanosoma cruzi-infected mice: Parasitological and cardiological Outcomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 19 jun. 2015.

NYBO, K. Immunology and immunochemistry: ELISA. **BioTechniques**, v. 49, n. 2, p. 555–556, ago. 2010.

ORECCHINI, E. et al. **Post-transcriptional regulation of LINE-1 retrotransposition by AID/APOBEC and ADAR deaminases**. **Chromosome Research** Springer Netherlands, , 1 mar. 2018.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. **Chagas disease**. **The Lancet** Lancet Publishing Group, , 6 jan. 2018.

PERONE, D. et al. Trypanosoma cruzi : identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TcrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody. 2003.

PETRAY, P. B. et al. **Effect of anti-7-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of Trypanosoma cruzi** **Immunology Letters**. [s.l: s.n.].

PIERROTTI, L. C. et al. **Chagas disease recommendations for solid-organ transplant recipients and donors**. **Transplantation** Lippincott Williams and Wilkins, , 1 fev. 2018.

PIZARRO, J. G.; CRISTOFARI, G. **Post-transcriptional control of LINE-1 retrotransposition by cellular host factors in somatic cells**. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** Frontiers Media S.A., , 7 mar. 2016.

PROTASOVA, M. S.; ANDREEVA, T. V.; ROGAEV, E. I. Factors regulating the activity of line1 retrotransposons. **Genes**, v. 12, n. 10, 1 out. 2021.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease)**. **Infectious Disease Clinics of North America**, jun. 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease**. **The Lancet** Elsevier B.V., , 2010.

REPOLÊS, B. M.; MACHADO, C. R.; FLORENTINO, P. T. V. **DNA lesions and repair in trypanosomatids infection**. **Genetics and Molecular Biology** Brazilian Journal of Genetics, , 2020a.

REPOLÊS, B. M.; MACHADO, C. R.; FLORENTINO, P. T. V. **DNA lesions and repair in trypanosomatids infection**. **Genetics and Molecular Biology** Brazilian Journal of Genetics, , 2020b.

REYNOLDS, A. et al. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. **RNA**, v. 12, n. 6, p. 988–993, jun. 2006.

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

RIOS, A. et al. Can sexual transmission support the enzootic cycle of trypanosoma cruzi? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 3–8, 1 jan. 2018.

RODRIGUES, M. M. et al. **Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 Cells Revealed by Characterization of the Cellular Immune Response Generated by Immunization with a DNA Vaccine Containing a Trypanosoma cruzi Gene**INFECTION AND IMMUNITY. [s.l: s.n.].

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. **The immune response to Trypanosoma cruzi: Role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. Journal of Parasitology Research**, 2012.

RÖNNBLÖM, L.; ELORANTA, M. L. **The interferon signature in autoimmune diseases. Current Opinion in Rheumatology**, mar. 2013.

ROSE, E. et al. Host DNA repair response to oxidative damage is modulated by Trypanosoma cruzi in a strain-dependent manner. **Acta Tropica**, v. 224, 1 dez. 2021.

ROSSI, I. V.; DE SOUZA, D. A. S.; RAMIREZ, M. I. **The End Justifies the Means: Chagas Disease from a Perspective of the Host–Trypanosoma cruzi Interaction. Life**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 abr. 2024.

SAITO, T.; GALE, M. **Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. Journal of Experimental Medicine**, 7 jul. 2008.

SANCHEZ-LUQUE, F. J. et al. LINE-1 Evasion of Epigenetic Repression in Humans. **Molecular Cell**, v. 75, n. 3, p. 590- 604.e12, 8 ago. 2019.

SANGENITO, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, 1 jun. 2020.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. L. **The immunology of Experimental Chagas Disease III. Rejection of Allogeneic Heart Cells in Vitro.** [s.l: s.n.].

SERBAN, A. I. et al. Ages-induced IL-6 synthesis precedes RAGE up-regulation in HEK 293 cells: An alternative inflammatory mechanism? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20100–20117, 25 ago. 2015.

SERVANT, G. et al. The nucleotide excision repair pathway limits L1 retrotransposition. **Genetics**, v. 205, n. 1, p. 139–153, 1 jan. 2017.

SILBERSTEIN, E. et al. A novel nanoluciferase-based system to monitor Trypanosoma cruzi infection in mice by bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2018.

SILVERMAN, R. H. Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. **Journal of Virology**, v. 81, n. 23, p. 12720–12729, dez. 2007.

SIMÕES-BARBOSA, A. et al. **Hitchhiking Trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. [s.l: s.n.].

STENZ, L. **The L1-dependant and Pol III transcribed Alu retrotransposon, from its discovery to innate immunity**. *Molecular Biology Reports* Springer Science and Business Media B.V., , 1 mar. 2021.

STETSON, D. B. et al. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell*, v. 134, n. 4, p. 587–598, 22 ago. 2008.

SUN, L. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, v. 339, n. 6121, p. 786–791, 15 fev. 2013.

SUZUKI, J. et al. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genetics*, v. 5, n. 4, abr. 2009.

TANAKA, Y.; KUSUDA, M.; YAMAGUCHI, Y. Interferons and systemic lupus erythematosus: Pathogenesis, clinical features, and treatments in interferon-driven disease. *Modern Rheumatology*, v. 33, n. 5, p. 857–867, 1 set. 2023.

TARLETON RL, Z. L. Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology Today*, p. 94–99, 15 mar. 1999.

TAYLOR, S. C. et al. **The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time**. *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection** *Mutation Research*. [s.l: s.n.].

TEIXEIRA, A. R. L. et al. **Chagas disease**. *Postgraduate Medical Journal*, dez. 2006a.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. **Chagas disease**. *Postgraduate Medical Journal*, dez. 2006b.

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

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

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, ago. 2012.

THOMAS, C. A. et al. Modeling of TREX1-Dependent Autoimmune Disease using Human Stem Cells Highlights L1 Accumulation as a Source of Neuroinflammation. *Cell Stem Cell*, v. 21, n. 3, p. 319- 331.e8, 7 set. 2017.

UKADIKE, K. C. et al. Expression of L1 retrotransposons in granulocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. **Mobile DNA**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.

V. SHARMA, L. B. C. T. C. N. H. S. T. W. S. J. A. S. J. N. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. 2016.

VAN VOORHIS, W. C. et al. **FL-160 Proteins of Trypanosoma cruzi Are Expressed from a Multigene Family and Contain Two Distinct Epitopes that Mimic Nervous Tissues.** [s.l.: s.n.].

VENTER, J. C. et al. **The Sequence of the Human Genome Downloaded from.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>.

WALTER, M. R. **The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 12 nov. 2020.

WARKOCKI, Z. **An update on post-transcriptional regulation of retrotransposons.** **FEBS Letters** John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2023.

WEN, J. J. et al. Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 10–11, p. 1201–1209, ago. 2008.

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

WESSLER, S. R. **Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks.** [s.l.: s.n.].

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. **Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks.** **Journal of Biological Chemistry** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 6 jul. 2018.

YANG, F. et al. Retrotransposons hijack alt-EJ for DNA replication and eccDNA biogenesis. **Nature**, v. 620, n. 7972, p. 218–225, 3 ago. 2023.

YAO, Q. et al. Ribonuclease activity of MARF1 controls oocyte RNA homeostasis and genome integrity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 44, p. 11250–11255, 30 out. 2018.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 7, p. 730–737, jul. 2004.

YU, Q. et al. Type I interferon controls propagation of long interspersed element-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 16, p. 10191–10199, 17 abr. 2015.

ZHANG, L. et al. **Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry : lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production** Eur. J. Immunol. [s.l: s.n.].

ZHANG, X.; ZHANG, R.; YU, J. **New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. Frontiers in Cell and Developmental Biology** Frontiers Media S.A., , 7 ago. 2020.

ZHAO, K. et al. Modulation of LINE-1 and Alu/SVA Retrotransposition by Aicardi-Goutières Syndrome-Related SAMHD1. **Cell Reports**, v. 4, n. 6, p. 1108–1115, 26 set. 2013.

ZHAO, X. et al. **The Interplay Among HIV, LINE-1, and the Interferon Signaling System. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 9 set. 2021.

ZINGALES, B. et al. **A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** [s.l: s.n.].

ZINGALES, B. et al. **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution**, mar. 2012.

ZREIN, M. et al. A novel antibody surrogate biomarker to monitor parasite persistence in Trypanosoma cruzi-infected patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, 9 fev. 2018.