



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Patologia Molecular
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



**Herança e fixação de sequências de minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Gallus gallus*:
alterações genotípicas e miocardiopatia autoimune**

Maria Carolina Cambraia Guimaro Diniz

**Orientador: Dr. Antônio R. L. C. Teixeira
Co-orientadora: Dra. Mariana M. Hecht**

Brasília – DF
2012

Maria Carolina Cambraia Guimaro Diniz

**Herança e fixação de sequências de minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Gallus gallus*:
alterações genotípicas e miocardiopatia autoimune**

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

Brasília – DF
2012

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

Financiamento: CNPq / CAPES

Aprovada em 19 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Raimundo Lima Cruz Teixeira (presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali
Universidade de Brasília – UnB

Dr. José Raimundo Correa
Universidade de Brasília – UnB

Dr. André Kipnis
Universidade Federal de Goiás – UFG

Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Universidade Católica de Brasília – UCB

Dra. Flávia Nader Motta Arenas (suplente)
Universidade de Brasília - UnB

“Serendipity. Look for something, find something else, and realize that what you've found is more suited to your needs than what you thought you were looking for.”

(Lawrence Block)

*A minha família, meu **pai**, minha **mãe** e minha **irmã**, por serem a minha paz, o meu chão, o meu aconchego e a minha vida.*

*A minha **Emília**, saudade que não acaba, abraço que preenchia todos os espaços, alegria desde tão cedo. Amorzinho da minha vida, você é eterna para mim.*

AGRADECIMENTOS

“Nem tudo o que pode ser contado conta, e nem tudo o que conta pode ser contado.”
(Albert Einstein)

Ao meu orientador, **Antônio Teixeira**, pela oportunidade de trabalhar no laboratório desde a minha iniciação científica até o doutorado. Obrigada pela confiança, pelo aprendizado e por ter me guiado no meu amadurecimento como pesquisadora.

A minha co-orientadora, **Mariana Hecht**, pelo apoio e paciência em todos os momentos. Obrigada por me fazer acreditar no meu trabalho e pela amizade que nasceu deste período. Seu empenho e sua orientação foram essenciais para esta tese.

Ao **Clever** e a **Nadjar**, por terem me treinado na minha iniciação científica e nos meus primeiros experimentos, sempre com muita paciência e muita vontade de ensinar.

A todos da equipe atual do LMPDC e aos que já passaram pelo nosso laboratório.

Agradeço imensamente às pessoas que contribuíram diretamente para essa tese: à **Eliete**, pelo apoio com as centenas de placas e materiais para esterilização; aos funcionários do biotério, pelo apoio diário no cuidado dos galinheiros; ao **Miguel**, por cuidar de todas as burocracias e papeladas com tanto carinho e dedicação; à **Roze**, por fazer todos os experimentos de histologia; à **Ana de Cássia**, pelo fornecimento dos meios de cultura; aos meus ex-estagiários, **Ciro**, **Osmar**, **Ester** e **Tamires**, que tanto me ajudaram nos experimentos; aos estagiários **Luiz**, **Fernanda**, **Hevelly**, **Ana Luisa** e **Gabriela**, que mesmo não sendo meus estagiários, me ajudaram muito na bancada; aos veterinários da Cirurgia Experimental, **Rafael** e **Gabriela**, pelo cuidado com os animais e pela constante disponibilidade; à **Lou** e **Manuela**, por terem ficado tantas vezes comigo até tarde no laboratório; ao **Alessandro**, pela imensa ajuda com as análises de bioinformática e por me ensinar a utilizar os programas.

Agradeço especialmente aos que, além de colegas de trabalho, se tornaram amigos queridos: **Ciro**, **Fernando**, **Alessandro**, **Ester**, **Lou**, **Manuela**, **Adriano**, **Carol**, **Rafa**, **Nadjar** e

Mariana. Obrigada pelos momentos tão especiais de beto no estacionamento, sinuca, açaí no Casca, chocolates-quentes, almocinhos, cinemas e etc.

Ao laboratório Parasito-Hospedeiro, por terem cedido o local para alguns experimentos. Agradeço especialmente à **Flávia** e à **Keyla** por essa amigável disponibilidade.

Ao laboratório de Toxicologia, pelos litros e litros de água milliQ. Agradeço especialmente à **Juliana Pasiani**, **Mariana** e **Patrícia**, pelos momentos alegres de visitas e por tanto me acolherem.

Agradeço ao Instituto de Genética Molecular de Ciências de Praga, da República Tcheca, e ao professor **Jiri Hejnar** pela doação dos ovos das aves utilizadas neste trabalho.

Ao CNPq, à CAPES e à UnB, pelo financiamento da pesquisa.

E como nem só de trabalho vive o homem, agradeço a todos os meus amigos pelo apoio durante todos estes anos do doutorado, pela paciência com as minhas ausências – ou como me diziam “quando eram trocados pelas galinhas” – e pelo enorme carinho. Sei que sou uma pessoa abençoada com amigos maravilhosos e peço desculpas caso eu me esqueça de citar alguém.

Às minhas belikas queridas (**Bia**, **Júlia Braga**, **Isabel** e **Patê**), que mesmo à distância estiveram sempre tão presentes, trazendo uma alegria imensa em cada reencontro. À **Natão**, minha amiga de infância, pelos seus telefonemas sempre me encorajando. Ao **Flávio**, minha dupla querida da época da graduação, por todas as visitas no lab, pelos almoços e por ter continuado sempre tão presente. À **Maria**, minha xará querida, por todas as mensagens e os abraços tão carinhosos. À **Juliana Pasiani**, minha dupla da academia e de lanchinhos com muitas bisnagas torradinhas com muita manteiga. Muito obrigada pelos doces da vó, pelas conversas no estacionamento e pelos conselhos maravilhosos. À **Juliana Pinheiro**, minha companheira de cineminhas e crepes. Obrigada por todos os conselhos e pelo exemplo de dedicação e conquista. Você tem toda a minha admiração. À **Bia**, pela doçura que você traz para a minha vida e por sempre saber a palavra certa para me acalmar. Obrigada pela sua temporada brasiliense que tornou essa cidade bem mais alegre, pelos fins-de-tarde no parque da cidade e pelos muitos domingos me ajudando no laboratório. À **Julia Dalla Costa** e à **Mara**, minhas herancinhas amadas, por terem entrado na minha vida num momento tão difícil e terem tornado tudo mais leve. Obrigada pela amizade

especial e pelas viagens gostosas. À minhas amigas do colégio, **Laura, Iracema e Valessa**, que mesmo na correria das nossas vidas, não deixam ser especiais e importantes para mim.

Agradeço às “famílias” que a gente adquire no correr da vida. À **família Villacorta Siqueira** (Paulo César, Maria Lúcia, Paulo Andrés e Diego), por sempre cuidarem tão bem da minha irmã e por trazerem tantos momentos alegres regados a pisco e a comidas peruanas maravilhosas para a nossa família. À **família Cunha Borges** (tio João, tia Carmen e Antonio) pelo exemplo de força e superação que vocês foram para mim nesses últimos anos e por serem sempre tão amorosos. À **família Dalla Costa** (tio Valdir, tia Meire, Julia, Marina e Gabriel) por me incluírem nos momentos tão gostosos da família de vocês e nos lanchinhos com pão-de-queijo quentinho.

Ao meu querido **Jose**, por toda a alegria e o tempero gostoso que você trouxe para a minha vida. Obrigada por ser tão companheiro e paciente, por toda a ajuda com a tese e por fazer o chocolate quente mais gostoso de todos para me animar. E aos seus pais, **Ciro e María Isabel**, por mesmo a distância serem tão carinhosos comigo.

Agradeço a todos os meus familiares pelo carinho e apoio nesses anos todos. Em especial, a minha tia **Beth Barros**, grande guerreira, pelo constante interesse e entusiasmo pelo meu crescimento acadêmico. A minha avó, **Maria Emília**, que mesmo não entendendo para que serve esse “tal de doutorado”, ter sempre me dado um colo tão amoroso e tão aconchegante como só um colo de vó pode ser. A minha amada **Cida**, por sempre ter cuidado de mim como uma filha.

À minha irmã, **Mila**, por todos os mimos e todo o carinho. Obrigada por ser sempre tão empolgada e amorosa com as minhas coisas. À minha mãe, **Silvany**, por ser meu exemplo de força e me ensinar o que é trabalhar duro. Ao meu pai, **Antonio Augusto**, por ser sempre tão doce, por acreditar tanto em mim e por mover o mundo para tentar me agradecer. Eu tenho muito orgulho da nossa família e de tudo o que vocês conquistaram. Eu não seria nada sem o amor, sem o apoio e sem a alegria de vocês três. Obrigada por serem tão maravilhosos, por sempre cuidarem de mim e me fazerem sentir especial. Eu amo muito vocês.

E por último, o mais importante: a Deus, pela proteção nesse vai-vem diário e pela vida abençoada que eu tenho. “Com Deus existindo, tudo dá esperança: sempre um milagre é possível, o mundo se resolve.”

RESUMO

A base da teoria autoimune da doença de Chagas é a rejeição acelerada das células do coração pelos linfócitos efetores do sistema imune. Estudos do nosso Laboratório sugerem que uma transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma do hospedeiro pode explicar a origem da patogênese da doença. Mas, como o hospedeiro mamífero retém a infecção chagásica ao longo da vida, decidimos empregar um modelo trans-filo que elimina a infecção e permite analisar com segurança a transferência do kDNA e sua possível relação com a rejeição autoimune do coração chagásico. Aves são refratárias ao *Trypanosoma cruzi*, mas a infecção pode ser estabelecida na primeira semana, antes do desenvolvimento do embrião. Pintos que eclodem de ovos inoculados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* são livres da infecção, mas retêm DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasita no genoma; os exames de PCR revelam positividade para kDNA na ausência de DNA nuclear (nDNA). O kDNA integrado no genoma das aves parentais foi transferido verticalmente para as progênies. A identificação das seqüências de minicírculos integradas no genoma das aves foi feita com auxílio da técnica *tpTAIL* PCR, e as quimeras kDNA-DNA hospedeiro foram mapeadas em vários cromossomos. Esses resultados também mostraram o kDNA integrado em retroelementos CR1 em 28% das seqüências. As mutações foram localizadas em diversos *loci*, e as mutações nos genes CNNM2, tetraspaninas-18, e distrofina foram analisadas. As bandas desses genes nas hibridizações pelo *Southern blot* mostraram variações no padrão de migração, e este achado foi atribuído a recombinações e deleção na progênie. Ademais, as estruturas das seqüências nas regiões variáveis dos minicírculos de kDNA nos genes CNNM2 e distrofina dos parentais diferia daquelas presentes nas progênies. Tais diferenças, decorrentes da diversidade dos minicírculos, *hitchhiking*, recombinações, e mosaicismos sugerem um tipo de herança semiconservativa, não-Mendeliana. As aves kDNA-mutadas desenvolveram cardiomegalia e o exame histopatológico revelou lesão típica da doença de Chagas, com destruição de células cardíacas pelos linfócitos efetores do sistema imune. Aves controle não tinham lesão. Os resultados apresentados sugerem que as mutações de kDNA nos parentais são transferidas verticalmente e fixadas no genoma das progênies, podendo estar associadas às lesões autoimunes no coração do hospedeiro. A origem genética da patogênese da cardiopatia autoimune explica a variabilidade das manifestações clínicas semelhantes à doença de Chagas no modelo das aves sem o parasitismo.

Palavras-chave: kDNA, *Gallus gallus*, cardiomiopatia inflamatória, *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, autoimunidade, CR1, CNNM2, tetraspanina-18, distrofina.

ABSTRACT

The autoimmune theory suggests an accelerated rejection of heart cells by immune system effectors lymphocytes and Chagas heart disease. Studies of our Laboratory shows that transfer of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles to the host genome may explain the origin of the autoimmunity. To eliminate any role played by parasite persistence in the chronic Chagas disease, we used the chicken model to shed light further on the origin of the autoimmune rejection of target cells in the heart. Birds are refractory to *T. cruzi* but the infection can be established in the early embryo. The inoculation of *T. cruzi* trypomastigotes into the air chamber of fertile egg generates parasite-free chickens at hatching: The exams revealed the presence of kDNA and absence of nuclear DNA (nDNA). Crossbreeding vertically transferred the kDNA mutations to progeny. The sequencing of minicircle kDNA was made by the tpTAIL PCR technique, and the chimera sequences showed kDNA conserved and variable regions at several chromosomes. These results also revealed that the kDNA integrated into retrotransposons CR1 in 28% of those sequences. The kDNA mutations were mapped to several *loci*, but the CNNM2, tetraspanin-18 and dystrophin genes were analysed with more detail. Southern blot hybridization revealed bands with various migration patterns, possibly, due to recombination and deletion occurring over time. The kDNA mutations in CNNM2 and dystrophin *loci* showed structural differences in kDNA variable regions in parental and progeny. Additionally to mutation differences stemming from minicircle diversity, hitchhiking, recombination and mosaicism also account for the semi-conservative, non-Mendelian, pattern observed. The kDNA-mutated birds showed cardiomegaly and the histopathology documented typical Chagas disease lesions, whereby parasite-free target heart cells were rejected by the immune system mononuclear cells. Control birds did not show these lesions. These findings highlight the association between the heart disease and genotype modifications, resulting from the kDNA integrations in the chicken genome. The genetically driven pathogenesis of Chagas-like heart disease explains a gamut of clinical manifestations in the parasite-free chicken model.

Key words: kDNA, *Gallus gallus*, inflammatory cardiomyopathy, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, autoimmunity, CR1, CNNM2, tetraspanin-18, dystrophin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro humano.	p. 06
Figura 2.	Estrutura do minicírculo de kDNA.	08
Figura 3.	Estrutura do DNA do cinetoplasto.	09
Figura 4.	Representação gráfica do retrotransposon não-LTR CR1.	20
Figura 5.	Presença de miocardite em uma ave kDNA positiva.	28
Figura 6.	Inseminação artificial das aves.	31
Figura 7.	Inoculação de ovos férteis de galinhas com <i>T. cruzi</i> .	32
Figura 8.	Esquema da <i>tpTAIL</i> PCR.	41
Figura 9.	<i>Southern blot</i> de produtos de kDNA e nDNA amplificados por PCR e hibridizados com sondas específicas.	51
Figura 10.	Heredograma da família 1.	52
Figura 11.	Heredograma da família 2.	53
Figura 12.	Heredograma da família 3.	54
Figura 13.	Produtos da <i>tpTAIL</i> PCR.	56
Figura 14.	Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma das aves.	58
Figura 15.	Evento de integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> em região codante do genoma da galinha.	59
Figura 16.	Evento de integração de minicírculo e <i>hitchhiking</i> de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma de <i>Gallus gallus</i>	60
Figura 17.	Integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> em região indeterminada do genoma da galinha.	62
Figura 18.	Características dos elementos repetitivos encontrados nas regiões flangeadoras às inserções de seqüências de minicírculos de kDNA.	64

Figura 19.	Representação esquemática de seqüências quimeras no genoma da ave K1-583 (F1) flanqueadas pela inserção de kDNA à montante e à jusante no <i>locus</i> NW_001471673.1 do cromossomo 3.	65
Figura 20.	Inserção de kDNA em regiões satélites com inserto de CR1.	67
Figura 21.	Alinhamento de seqüências quimeras nos sítios de integração de minicírculos de kDNA no genoma de <i>Gallus gallus</i> .	69
Figura 22.	Seqüências quimeras mostrando o kDNA do <i>T. cruzi</i> inserido em regiões codantes no genoma da galinha.	72
Figura 23.	Alinhamentos dos clones CG e DG.	73
Figura 24.	Fixação da mutação de kDNA em aves da família 3.	75
Figura 25.	<i>Southern blot</i> de DNA extraído de diferentes tecidos da ave F2 K1-639.	76
Figura 26.	Hibridização das bandas de <i>Southern blot</i> genômico mostrando mutações de kDNA no <i>locus</i> NW_003763785.1 da tetraspanina-18.	78
Figura 27.	Hibridização das bandas de <i>Southern blot</i> genômico mostrando mutações de kDNA no <i>locus</i> NW_001471534.2 da distrofina.	79
Figura 28.	Hibridização das bandas de <i>Southern blot</i> genômico mostrando mutações de kDNA no <i>locus</i> NW_003763812.1 do transportador de metal CNNM2.	80
Figura 29.	Lesões teciduais no coração de ave F3 kDNA positiva.	81
Figura 30.	Cardiomegalia e lesões teciduais no coração de aves F2 kDNA positivas.	82
Figura 31.	Manifestações clínicas apresentadas por aves mutadas com kDNA.	83
Figura 32.	Modelo de integração de minicírculos de kDNA do <i>T. cruzi</i> no genoma do hospedeiro humano.	90
Figura 33.	Esquema sugerido para reativação de elementos transponíveis inativos e truncados pela associação com outras seqüências repetitivas.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR.	p. 40
Tabela 2.	Sondas radioamarcadas.	47
Tabela 3.	Elementos repetitivos identificados nas regiões flanqueadoras às inserções de seqüências de minicírculos de kDNA.	63
Tabela A1.	Seqüências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> .	109
Tabela A2.	Seqüências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no locus CNNM2.	126
Tabela A3.	Seqüências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no locus da distrofina.	128
Tabela A4.	Seqüências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas <i>in silico</i> , formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma de <i>Gallus gallus</i> .	130
Tabela A5.	Seqüências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas <i>in silico</i> , formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no gene transportador de metal CNNM2 de <i>Gallus gallus</i> .	147
Tabela A6.	Seqüências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas <i>in silico</i> , formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no gene da distrofina de <i>Gallus gallus</i> .	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CN	Controle negativo
CR1	<i>Chicken repeat 1</i>
CSB	<i>Constant sequence block</i> - bloco de região conservada
ERV	Retrovírus endógeno
G	Guanina
GIRI	<i>Genetic Information Research Institute</i>
gRNA	RNA guia
ICGSC	<i>International Chicken Genome Sequencing Consortium</i>
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> – DNA do cinetoplasto
LINE	<i>Long interspersed element</i> - elemento entrecassado longo
LkDT	<i>Lateral kDNA transfer</i> - transferência lateral de kDNA
LMPDC	Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas
LTR	<i>Long terminal repeats</i> - longas repetições terminais
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - complexo principal de histocompatibilidade
MMEJ	<i>Microhomology mediated end joining</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nDNA	DNA nuclear
ORF	<i>Open reading frame</i> - fase de leitura aberta
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação de polimerização em cadeia
SINE	<i>Short interspersed element</i> - elemento entrecassado curto
T	Timina
TCR	Receptor de célula T
TE	<i>Transposable element</i> – element transponível
TGH	Transferência gênica horizontal
TGV	Transferência gênica vertical

T_m	Temperatura média
TNF	Fator de necrose tumoral
<i>tp</i>TAIL	<i>Target-primer Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i>
UMSBP	Proteína universal de ligação ao minicírculo
VkDT	<i>Vertical kDNA transfer</i> - transferência vertical de kDNA
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE

	P.
I. INTRODUÇÃO	01
1. Doença de Chagas	01
1.1. Vias de transmissão	02
1.2. Manifestações clínicas	04
1.3. Diagnóstico	04
1.4. Tratamento	05
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> e ciclo de vida	05
2.1. Ciclo de vida	06
2.2. DNA do cinetoplasto (kDNA)	07
3. Mecanismos Patogênicos	10
3.1. Persistência do Parasito	11
3.2. Autoimunidade	12
4. Integração de DNA exógeno	16
5. Elementos transponíveis	17
5.1. Elementos transponíveis de <i>Gallus gallus</i>	18
5.1.1. Elementos não-LTR de <i>Gallus gallus</i>	19
5.1.2. Elementos LTR de <i>Gallus gallus</i>	21
5.2. TGH via elementos transponíveis	21
6. Integração de minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro	23
7. O modelo experimental <i>Gallus gallus</i>	24
7.1. Características do genoma de <i>Gallus gallus</i>	25
7.2. Características do Sistema Imune de <i>Gallus gallus</i>	25
7.3. Refratariedade das aves ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
7.4. A utilização do modelo <i>Gallus gallus</i> no estudo das mutações de kDNA	27
II. OBJETIVOS	29
1. Objetivo Geral	29
2. Objetivos Específicos	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2. Modelo animal	30
2.1. Amostragem	30

2.2.	Cruzamento das aves	31
2.3.	Inoculação do <i>Trypanosoma cruzi</i> em ovos férteis de galinhas	32
3.	Extração do DNA	33
3.1.	Extração de DNA de células sanguíneas das aves	33
3.2.	Extração de DNA de tecidos das aves	33
3.3.	Extração de DNA total de <i>T. cruzi</i>	34
3.4.	Extração de kDNA de <i>T. cruzi</i>	34
3.5.	Quantificação e análise do DNA extraído	35
4.	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	35
4.1.	Amplificações de nDNA e kDNA de <i>T. cruzi</i>	35
4.2.	Amplificação das regiões flanqueadoras do kDNA de <i>T. cruzi</i> integrado no genoma de <i>Gallus gallus</i>	36
4.2.1.	<i>tp</i> TAIL PCR adaptada para genes específicos	38
4.3.	Transferência dos produtos de PCR para membrana de nylon	42
5.	<i>Southern blot</i> genômico	42
5.1.	Digestão enzimática do DNA genômico	42
5.2.	Transferência do DNA digerido para membrana de nylon	43
6.	Clonagem dos produtos obtidos por <i>tp</i>TAIL PCR	44
6.1.	Clonagem e transformação em <i>Escherichia coli</i> competente	44
6.2.	Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon	44
6.3.	Extração do DNA plasmidial	45
7.	Sondas Radioativas	45
7.1.	Marcação de sondas radioativas	46
7.2.	Purificação de sondas radioativas	46
7.3.	Hibridização com sondas radioativas	46
8.	Análise em bancos de dados	48
8.1.	Análises de seqüências quimeras	48
8.2.	Análise de ORFs quimeras putativas	48
8.3.	Análise de elementos repetitivos	48
9.	Análises histológicas	49
IV.	RESULTADOS	50
1.	Identificação de TGV e TGH das mutações de minicírculos de kDNA no genoma de <i>Gallus gallus</i>	50
2.	Análise da integração de kDNA no genoma de <i>Gallus gallus</i>	55
2.1.	<i>tp</i> TAIL PCR (<i>target-primer Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i>)	55

2.1.1. Características das regiões flaqueadoras aos minicírculos de kDNA inseridos no genoma de <i>Gallus gallus</i>	57
2.1.2. Elementos repetitivos presentes nas regiões flaqueadoras	61
2.1.3 Características e estrutura dos minicírculos de kDNA inseridos no genoma da galinha	68
2.2. Resultados obtidos com a <i>tp</i> TAIL adaptada pra genes específicos	71
2.3. <i>Southern blot</i> genômico	76
3. Análise da formação de possíveis novas fases de leitura aberta	80
4. Ocorrência de cardiomiopatia inflamatória na ausência de parasitismo	81
V. DISCUSSÃO	84
1. Aspectos gerais	84
2. Sítios de integração do kDNA no genoma de <i>Gallus gallus</i>	84
2.1. Associação do kDNA a genes	86
3. Herança das seqüências de kDNA de <i>T. cruzi</i> inseridas no genoma de <i>Gallus gallus</i>	88
4. Modelo de integração dos minicírculos de kDNA no genoma de <i>Gallus gallus</i>	90
5. Evolução do genoma relacionada à integração do kDNA no genoma	92
6. Manifestações clínicas e patológicas da doença de Chagas em aves kDNA-mutadas	93
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO I	109
ANEXO II	126
ANEXO III	128
ANEXO IV	130
ANEXO V	147
ANEXO VI	150

I. INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta há mais de 100 anos pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Em 1909, durante o trabalho em uma campanha de controle da Malária em Minas Gerais, Dr. Chagas observou protozoários flagelados no sangue de uma criança febril. Após algumas semanas, na ausência de sintomas, percebeu que não era mais possível observar os parasitos no seu sangue. Chagas designou o protozoário de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz, renomado cientista, seu mentor. Ao longo de meses, trabalhando sozinho, Dr. Chagas descreveu o patógeno, o inseto vetor, e as características clínicas de uma nova doença. Sua pesquisa é considerada uma proeza na história da medicina (Chagas, 1909; Tanowitz e cols, 2009). Em 1960, foi localizada a paciente chamada Berenice, em quem Dr. Chagas achou o tripanossomo no sangue, que era soropositiva para a infecção pelo *T. cruzi*. Berenice viveu até 74 anos de idade livre de qualquer sintoma de doença crônica, vindo a falecer por outra causa em 1973 (Tanowitz e cols, 2009).

A Tripanossomíase Americana é a enzootia causada pelo *T. cruzi* que se encontra disseminado em mais de mil espécies de cinco classes de mamíferos. Estima-se que existam cerca de 18 milhões de pessoas infectadas por este parasito (WHO, 2002). Dados mais recentes sugerem que, desde 2009, o número de infectados teria caído para 10 milhões (WHO, 2011). Porém, esta queda estatística drástica precisa ser examinada com cautela, porque a população humana duplicou nas três últimas décadas e não existem inquéritos epidemiológicos recentes para explicar a contração parcial da endemia. Não obstante, como 15 a 30% da população infectada desenvolve manifestações clínicas evidentes, assume-se que mais de 5 milhões de pessoas podem apresentar ou vir a manifestar alterações clínicas atribuíveis a doença de Chagas. Esta doença pode afetar o sistema gastrointestinal e o cardiovascular causando morte devido a disfunções cardíacas (WHO, 2002; Barrett e cols, 2003).

Inicialmente considerada uma doença prevalente em áreas rurais de países endêmicos, esta infecção tem se espalhado para as cidades devido à migração urbana. Alguns países desenvolvidos, livres de transmissão vetorial, também foram atingidos por essa enfermidade devido à imigração, sendo um processo já descrito na Austrália, no Canadá, nos Estados Unidos e

na Europa (Biolo e cols, 2010). Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estão em risco de contaminação com o *T. cruzi* (WHO, 2002; Biolo e cols, 2010). Novos surtos desta infecção têm surgido em vários estados do Brasil e em outros países da América Latina, devido a diversas vias de transmissão. Além disso, dados epidemiológicos já mostram a doença de Chagas como uma patologia emergente em países desenvolvidos (Castro, 2009).

A doença de Chagas permanece como uma doença negligenciada. Ainda não existem vacinas disponíveis e apenas poucas drogas antiparasitárias atenuam a parasitemia na fase aguda da doença. Mas Berenice, a paciente febril de Dr. Carlos Chagas, não recebeu tratamento com nitroderivado, viveu sem manifestação clínica da doença e faleceu de causa desconhecida com mais de 70 anos de idade. A história natural da infecção chagásica na primeira paciente se repete na grande maioria dos casos com manifestação clínica de infecção aguda e isto explica porque a maioria dos pesquisadores jamais viu um óbito de doença de Chagas aguda (Lauria-Pires e cols, 2000). Aliás, a infecção chagásica aguda geralmente é assintomática e só existem 18 milhões de infectados porque eles não faleceram na fase aguda da doença, sem qualquer tratamento específico. Essas digressões são essenciais para que os jovens profissionais de saúde considerem criticamente a indicação de tratamento com droga de alta toxicidade que não erradica a infecção e não melhora o prognóstico da doença em 15% a 30% dos casos que desenvolvem manifestações clínicas no intestino e no coração (Lauria-Pires e cols, 2000).

1.1. Vias de transmissão

A principal via de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, através da aquisição do parasito em fezes ou urina infectadas do inseto vetor durante o repasto sanguíneo (Abad-Franch e Monteiro, 2005). Estes insetos hematófagos são popularmente chamados de barbeiros e pertencem à família Reduviidae e à subfamília Triatominae, que contém mais de 130 espécies, sendo vários destes vetores ou potenciais vetores do *T. cruzi*. Triatomíneos são comuns desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Patagônia, estando presentes por toda a América Latina. As espécies mais importantes como vetores desta infecção são *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. maculata*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus*, *R. neglectus*, *R. pallescens* e *Panstrongylus megistus* (Garcia e cols, 2007).

As infecções por *T. cruzi* também podem ser adquiridas por outras vias, como transfusões de sangue, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos, transplacentária e transmissão oral (Bonney e Engman, 2008). Em áreas não-endêmicas, a transmissão transfusional é a principal via de contaminação, assumindo grande importância em países com substancial população de imigrantes da América Latina, como Estados Unidos, Espanha, França, Suíça e Canadá. Estima-se que aproximadamente 300 mil indivíduos estão infectados com o *T. cruzi* nos Estados Unidos (Castro, 2009; Sánchez e Ramírez, 2012). A transmissão congênita também é considerada um importante mecanismo de propagação da doença, mesmo em países não-endêmicos. Esta transmissão vertical do *T. cruzi*, materna ou transplacentária, pode ocorrer durante toda a gestação, sendo mais provável no último trimestre ou no momento do parto, através do contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (Sánchez e Ramírez, 2012). O relato de formas amastigotas em órgãos do sistema reprodutor masculino, como no tubo seminífero de um menino de 18 meses de idade com amastigotas no citoplasma de espermatoblastos e no lúmen, sugere a possível existência de transmissão vertical paterna deste parasito (Teixeira, 2007).

Em áreas endêmicas, a infecção pela via oral é um importante modo de transmissão do parasito, tendo relatos de microepidemias e eclosões de casos agudos da doença em várias regiões geográficas devido à ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi*. No Brasil, já ocorreram várias notificações deste tipo de transmissão, como casos ocorridos com a ingestão de caldo de cana-de-açúcar, suco de açaí, água e alimentos contaminados com estes parasitos. Na Colômbia e na Venezuela, vários surtos têm sido relacionados à ingestão de sucos de frutas contaminados (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). A fonte de contaminação dos alimentos tem sido atribuída a insetos triatomíneos infectados com o *T. cruzi* que são triturados durante o preparo destas bebidas. Uma característica comum destes casos é a severidade da doença, com vários casos culminando em morte (Yoshida, 2008).

Na ausência de vacinas ou de medicamentos adequados para um tratamento de larga-escala, a redução do número de novos casos da doença depende do controle da transmissão pelos insetos triatomíneos e pelas transfusões de sangue contaminado (Abad-Franch e Monteiro, 2005). A transmissão oral vem sendo considerada a principal causa da doença de Chagas aguda na bacia Amazônica e em outras regiões onde o controle intradomiciliar e peridomiciliar dos triatomíneos tem sido eficaz. Entre 2000-2010, 71% dos casos agudos no Brasil foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminados com o *T. cruzi*, com a maioria dos surtos acontecendo na

Amazônia brasileira (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). Estes dados evidenciam que o controle da transmissão oral também é essencial para a prevenção de novos casos.

1.2. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da fase aguda começam entre 6-10 dias após a infecção e duram por 1-2 meses. Geralmente, a fase aguda passa despercebida, sendo 95% dos pacientes assintomáticos. Os pacientes sintomáticos geralmente apresentam sintomas de mal-estar comuns a outras doenças como febre, dores musculares, sonolência, diarreia, distúrbios respiratórios e cianose. Durante o estágio agudo, os parasitos podem ser detectados no sangue periférico. Essa fase termina quando o sistema imune do hospedeiro reduz drasticamente o número de tripomastigotas circulantes, tornando muito difícil o diagnóstico parasitológico direto (Barret e cols, 2003; Teixeira e cols, 2006).

Após a fase aguda, os pacientes ficam assintomáticos. Cerca de 70-85% das pessoas infectadas continuam neste estágio pelo resto da vida, período conhecido como fase indeterminada da doença de Chagas crônica. Após 10-30 anos da infecção inicial, 15-30% dos pacientes desenvolverão danos teciduais relacionados com as formas cardíaca, digestiva ou nervosa da doença. Dor no peito, palpitações, tonturas e edema periférico são características comuns dos pacientes chagásicos crônicos. Arritmia, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita também são evoluções comuns desta patologia. A radiografia de tórax geralmente mostra uma cardiomegalia associada a diferentes graus de dilatação das câmaras cardíacas. A ecocardiografia também registra as alterações no coração e o eletrocardiograma apresenta alterações típicas que permitem o diagnóstico. A doença de Chagas também pode produzir megavísceras, principalmente mega-esôfago e mega-cólon (Barret e cols, 2003).

1.3. Diagnóstico

Os testes utilizados para detecção do *T. cruzi* são, em sua maioria, imunológicos, feitos com antígenos homogeneizados ou com antígenos recombinantes. Anticorpos IgM e IgG estão geralmente elevados nas fases aguda e crônica, respectivamente, sendo normalmente utilizados em diagnósticos sorológicos. Hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e técnicas de

ELISA costumam ser empregadas. Outras técnicas suplementares como xenodiagnóstico e hemoculturas também podem ajudar a definir se os doadores estão infectados. A PCR permite detectar o DNA do parasito e está começando a ser usada em diagnósticos de rotina (Barret e cols, 2003; Castro, 2009).

1.4. Tratamento

O controle da doença de Chagas é feito pelo combate aos triatomíneos transmissores do *T. cruzi*, visto que ainda não existe tratamento eficaz ou vacinas efetivas contra este parasito. A droga utilizada para esta doença é antiga, ineficaz e altamente tóxica, causando severos efeitos colaterais. O quimioterápico prescrito para o tratamento desta patologia é o benzonidazol (Teixeira e cols, 2006). O efeito deste medicamento depende da fase da doença, sendo verificado que a droga é mais efetiva na fase aguda da doença, enquanto que apresenta baixa eficácia na fase crônica. Além disso, o desenvolvimento de resistência do parasito a droga vem sendo observada (Teixeira e cols, 2006; Cuervo e cols, 2010). Alguns pontos importantes para o desenvolvimento de um tratamento mais efetivo seriam a elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência às drogas e a descoberta e validação de novos alvos para a quimioterapia (Cuervo e cols, 2010).

2. *Trypanosoma cruzi* e ciclo de vida

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae e se apresenta como um hemoflagelado que possui uma mitocôndria diferenciada, o cinetoplasto. Sob condições naturais, este parasito infecta centenas de espécies de mamíferos de diferentes ordens. O *T. cruzi* é encontrado em diferentes populações de hospedeiros invertebrados (os insetos vetores) e de hospedeiros vertebrados, como seres humanos e animais silvestres e domésticos (Devera e cols, 2003; Garcia e cols, 2007).

2.1. Ciclo de vida

O *T. cruzi* pode passar por alterações morfológicas e funcionais: a) Formas replicativas: estágios que sofrem divisão binária, incluindo os amastigotas observados no interior das células do hospedeiro vertebrado e os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor; b) Formas não replicativas e infectantes: os tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado e os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes do inseto vetor (Garcia e cols, 2007).

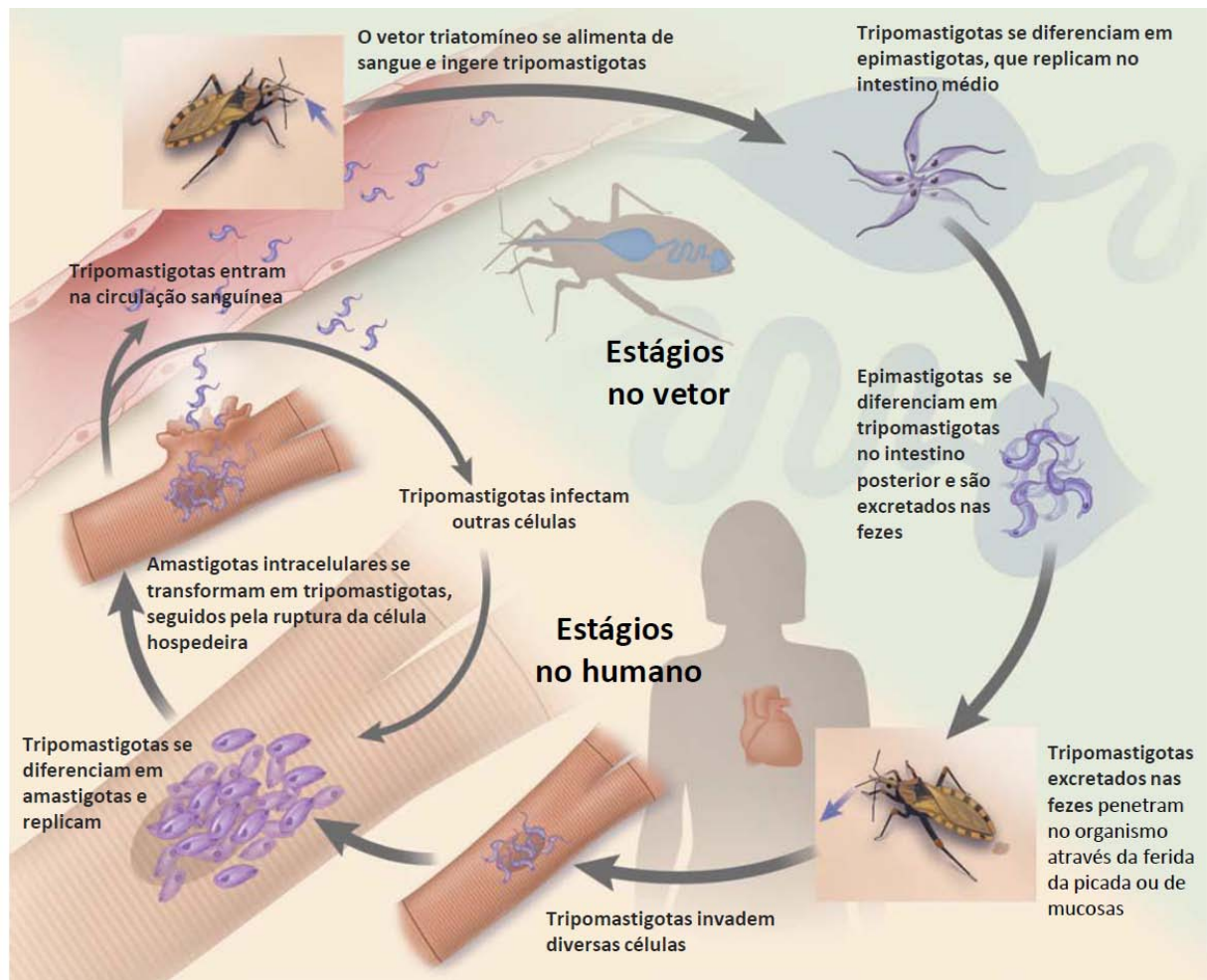


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro humano. Adaptado de Bern (2011).

O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre alternando entre o inseto vetor e seus vários hospedeiros mamíferos. A Figura 1 exemplifica este ciclo no hospedeiro humano. Ao picar o indivíduo e se alimentar de seu sangue, o inseto libera, no local da picada, fezes infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas do parasito que podem penetrar no organismo através de feridas na pele ou através de mucosas. Este estágio entra na circulação sanguínea do hospedeiro e pode invadir uma variedade de tipos celulares, incluindo células cardíacas musculares, onde se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas intracelulares se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados na circulação sanguínea, podendo invadir outras células ou serem ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo. No inseto vetor, os tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas que se replicam no intestino médio do inseto e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior, reiniciando o ciclo (Cuervo e cols, 2010; Bern, 2011).

2.2. DNA do cinetoplasto (kDNA)

Os parasitos cinetoplastidas receberam este nome porque possuem uma mitocôndria única, com estrutura peculiar e grande quantidade de DNA, conhecida como cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto (*kinetoplast* DNA – kDNA) apresenta uma estrutura especial que compreende uma rede de anéis de DNA entrelaçados. Estes anéis estão separados em dois tipos - maxicírculos e minicírculos - e representam 15% do DNA total da célula (Liu e cols, 2005; Simões-Barbosa e cols, 2006). Cada rede de kDNA consiste de cerca de 20 mil minicírculos de 1,4 kb e de algumas dezenas de maxicírculos de 36 kb. Os minicírculos apresentam uma organização peculiar da sua seqüência, sendo cada minicírculo organizado em quatro regiões conservadas de 122 pb, intercaladas por quatro regiões variáveis de ~238 pb (Figura 2). Dessa forma, os minicírculos apresentam heterogeneidade nas suas seqüências (Degraeve e cols, 1988; Sturm e cols, 1989; Lukes e cols, 2002; Junqueira e cols, 2005). Cada região conservada tem três blocos de repetições ricas em citosina-adenina (C/A) (*constant sequence blocks* CSB-1, CSB-2 e CSB-3), que se apresentam sempre na mesma ordem, conforme ilustrado na Figura 2 (Ray, 1989).

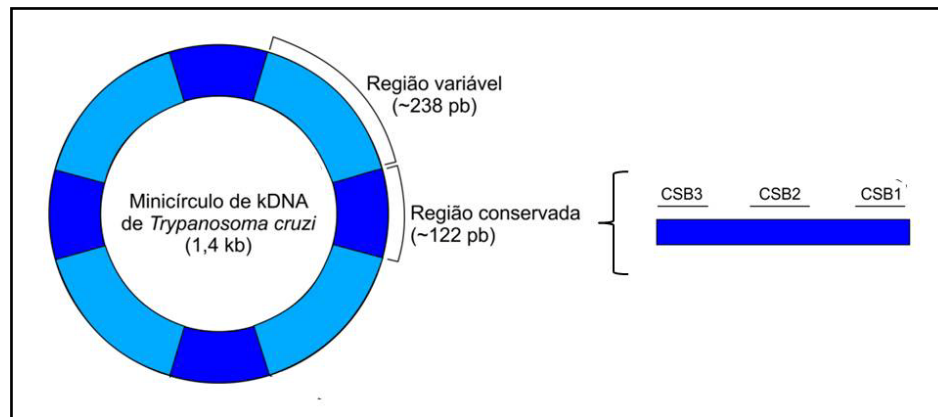


Figura 2. Estrutura do minicírculo de kDNA. Cada minicírculo apresenta quatro regiões variáveis (azul claro) intercaladas por quatro regiões conservadas (azul escuro). Em destaque, a presença das CSBs na região conservada.

Cada *T. cruzi* contém apenas um cinetoplasto, com uma única rede de kDNA condensada numa estrutura em forma de disco. Esta estrutura fica localizada numa região da matriz mitocondrial próxima do corpo basal do flagelo (Liu e cols, 2005). Na figura 3A, observa-se a localização deste disco de kDNA na célula e, na figura 3B, uma secção da rede contendo os minicírculos e maxicírculos. A visualização de maxicírculos e minicírculos é facilitada pela decatenação da rede com a topoisomerase II (Figura 3C).

Os maxicírculos codificam produtos típicos de genes mitocondriais de eucariotos, como rRNAs e subunidades de complexo da cadeia respiratória. Porém, os cinetoplastos apresentam uma expressão gênica mitocondrial não convencional, onde existe uma interação cooperativa entre os transcritos dos maxicírculos e dos minicírculos. Essa cooperação é necessária, pois os transcritos de maxicírculos precisam ser editados para formar um mRNA funcional. A editoração envolve a adição ou deleção de resíduos de uridina em sítios internos precisos do transcrito do maxicírculo, gerando fases de leitura aberta (ORFs). Esse processo é controlado por RNA guias (gRNA) codificados pelos minicírculos, que servem de molde para inserção ou deleção desse resíduos (Lukes e cols, 2005; Klingbeil e Englund, 2004; Liu e cols, 2005).

Alguns gRNAs podem ser codificados pelos maxicírculos, mas a grande maioria é originada dos minicírculos (Lukes e cols, 2002). Devido ao processo extenso de editoração de diversos transcritos dos maxicírculos, uma grande variedade de gRNAs é necessária, a qual é obtida graças ao vasto repertório de diferentes seqüências variáveis de minicírculos presentes na

rede de kDNA (Liu e cols, 2005). Acredita-se que a produção dos gRNAs seria a única função dos minicírculos no parasito e alguns organismos chegam a possuir centenas de diferentes classes de seqüências de minicírculos em sua rede que permitem produzir gRNAs suficientes (Lukes e cols, 2005).

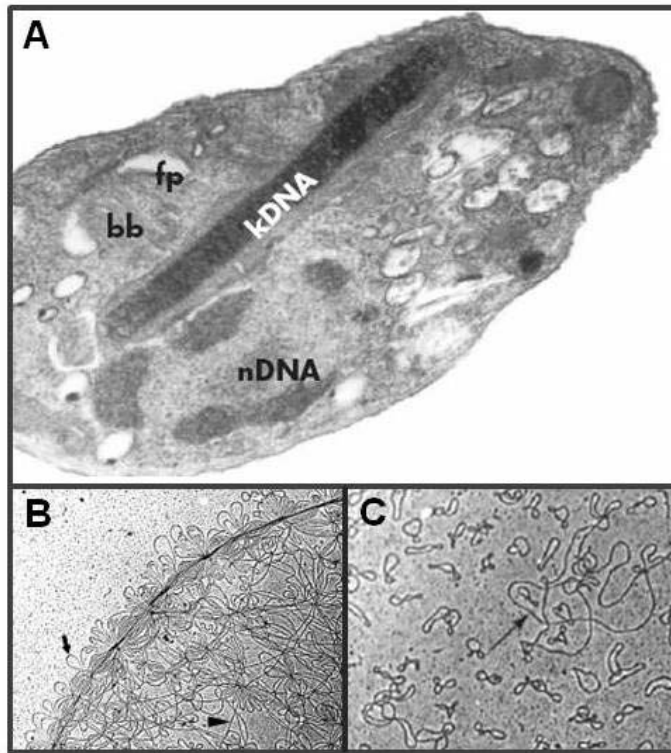


Figura 3. Estrutura do DNA do cinetoplasto. A) Microscopia eletrônica de um amastigota de *T. cruzi*, destacando as seguintes estruturas: núcleo (nDNA), cinetoplasto (kDNA), corpo basal do flagelo (bb) e o saco flagelar (fp). Microscopia eletrônica de uma rede de kDNA de *Crithidia fasciculata* mostrando: **B)** uma secção desta rede, com a seta indicando um minicírculo e com a ponta de seta indicando parte de um maxicírculo. **C)** a rede de kDNA decatenada pela topoisomerase II, apresentando os minicírculos e um único maxicírculo (seta). Adaptados, respectivamente, de Teixeira e cols, 2006; Klingbeil e cols, 2001; Liu e cols, 2005.

A síntese de kDNA é um processo ímpar, apresentando uma complexa maquinaria de replicação, a qual conta com diversas proteínas situadas ao redor do disco de kDNA. O processo de replicação envolve a duplicação do número de minicírculos e maxicírculos e a distribuição destes produtos em duas redes idênticas à rede parental. Um ponto muito importante deste processo é assegurar que cada célula-filha receberá um repertório completo dos minicírculos para que todos os gRNAs cruciais estejam disponíveis para a editoração do RNA. Essa replicação da rede ocorre durante um período distinto do ciclo celular, próximo da fase S nuclear, o que contrasta com a replicação do DNA mitocondrial de mamíferos, que ocorre aleatoriamente durante o ciclo celular (Lukes e cols, 2002, Liu e cols, 2005).

A replicação dos minicírculos é um processo já bem estudado. Eles não se replicam quando estão ligados à rede, sendo necessário liberá-los individualmente por uma topoisomerase II para se replicarem como minicírculos livres. A replicação da fita contínua do minicírculo utiliza a DNA polimerase, enquanto que a replicação da fita complementar é iniciada por múltiplos primers de RNA sintetizados pela DNA primase (Liu e cols, 2005; Lukes e cols, 2005). Um grande número de proteínas adicionais está envolvido na replicação do minicírculo. A proteína universal de ligação ao minicírculo (UMSBP) é uma proteína abundante que se liga especificamente à origem de replicação do minicírculo. O monômero da USBP, junto com a DNA primase, a DNA polimerase e a RNA polimerase, se agrega à origem de replicação, iniciando este processo. Após a replicação, os minicírculos são reintegrados à rede por uma reação também mediada pela topoisomerase II (Lukes e cols, 2005). As informações sobre a replicação dos maxicírculos são bem menores. Sabe-se que, como os minicírculos, os maxicírculos iniciam a replicação unidirecional em uma origem na região não-codificadora. Porém, ao contrário dos minicírculos, eles não se separam da rede durante a replicação (Liu e cols, 2005).

3. Mecanismos Patogênicos

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, mas ainda existem muitos questionamentos sobre a patogênese da doença. Após invadir o hospedeiro, a replicação do *T. cruzi* ocorre no citoplasma de diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, fibroblastos,

células do músculo esquelético e cardíaco e em células epiteliais. O parasito é prontamente fagocitado pelas células do sistema fagocítico mononuclear, mas também apresenta tropismo pelas células do tecido muscular, inclusive o miocárdio, onde forma ninhos. O parasitismo pode ser identificado frequentemente na fase aguda da doença. A migração das células imunes para o local do parasitismo depende da produção de citocinas e quimiocinas, assim como da regulação da expressão de seus receptores e moléculas de adesão (Gutierrez e cols, 2009). Essas células inflamatórias têm que cruzar a matriz extracelular, num processo mediado pela atividade de metaloproteinases da matriz extracelular. A fase aguda da doença é caracterizada pela ativação policlonal de linfócitos T e B. Vários estudos demonstraram que células T CD8+ são predominantes no tecido cardíaco na fase crônica da doença. Além da sua atividade citolítica, as células T CD8+ também contribuem para as respostas imunes ao *T. cruzi* e para a imunopatogênese da doença de Chagas, através da produção de citocinas como IFN- γ e IL-10 (Bonney e Engman, 2008; Gutierrez e cols, 2009; Teixeira e cols, 2011b).

Existem duas teorias principais para explicar a origem das lesões teciduais presentes na fase crônica desta patologia. A primeira teoria é a persistência do parasito no corpo do paciente chagásico e, a segunda, é a rejeição de células-alvo do hospedeiro por reações de autoimunidade. De um ponto de vista clínico, a discrepância entre essas teorias pode ser justificada pela dificuldade de se determinar a patogenicidade após um longo lapso de tempo entre a aquisição da infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento de lesões na doença de Chagas crônica (Teixeira e cols, 2011b).

3.1. Persistência do Parasito

Após o *T. cruzi* entrar no hospedeiro, este começa a se disseminar e tripomastigotas sanguíneos começam a ser observados nos exames de sangue do paciente. No sangue de pacientes chagásicos crônicos, ao contrário, o parasito é dificilmente encontrado, enquanto ocorre dano progressivo a órgãos, como coração, esôfago e cólon (Teixeira e cols, 2006; Gironès e cols, 2007). Alguns autores afirmam que o parasito não é encontrado devido à limitação técnica. Dessa forma, a utilização de técnicas mais sensíveis permitiria, em muitos casos, se verificar a presença de DNA ou de antígenos do parasito, o que poderia sugerir que as lesões presentes na fase

crônica poderiam ocorrer através de uma resposta inflamatória ao *T. cruzi* remanescente (Gironès e cols, 2007).

A teoria da persistência do parasito diz que a doença de Chagas é essencialmente uma miocardite por infecção do tecido cardíaco. Durante a fase aguda, não existem dúvidas de que a resposta inflamatória é direcionada para o parasito, que está presente em grandes quantidades no miocárdio. Autores que defendem esta teoria afirmam que, na fase crônica, existem evidências de uma correlação positiva entre a inflamação e a presença do *T. cruzi* no miocárdio, assim como da ausência do parasito em áreas preservadas do tecido cardíaco, que constituiriam uma evidência adicional de que o parasito estaria diretamente induzindo danos ao miocárdio (Gutierrez e cols, 2009). Dessa forma, o desenvolvimento das formas clínicas da doença dependeria de defeitos nas estratégias imunes de evasão do parasito. Para essa teoria, os mecanismos de persistência do parasito e a qualidade da resposta imune determinariam a extensão do dano tecidual (Gutierrez e cols, 2009). Porém, observa-se que é muito difícil encontrar parasitos nos locais de lesões patológicas em pacientes crônicos, sendo que esta ausência e a rejeição de células alvo sem a presença do *T. cruzi* reforçam a idéia de que o fenômeno autoimune está envolvido na patogênese da doença de Chagas (Teixeira e cols, 2006).

3.2. Autoimunidade

O sistema imune precisa ser persistentemente ativado, adaptado e aperfeiçoado para conseguir enfrentar o desafio de eliminar patógenos eficientemente. Este sistema também deve apresentar uma tolerância, com a qual é possível distinguir entre próprio e não próprio, para que não ocorram reações autodestrutivas. Autoimunidade acontece quando uma desregulação está presente, levando a uma quebra da auto-tolerância, que permite ataque aos tecidos saudáveis como se eles estivessem infectados. Entre fatores ambientais que podem contribuir para o desenvolvimento de resposta autoimune se encontra o agente infeccioso. O *T. cruzi* interage com o sistema imune evocando reação autoimune (Kivity e cols, 2009).

A teoria autoimune da doença de Chagas vem sendo crescentemente considerada desde a publicação de um trabalho de Santos-Buch e Teixeira (1974), que mostrou a interação citotóxica entre linfócitos sensibilizados com *T. cruzi* com células cardíacas alogênicas não parasitadas. Vários anos após essa publicação, ainda existem várias questões a serem respondidas sobre como

seriam disparados os mecanismos autodestrutivos e quais seriam seus papéis no avanço da fase crônica da doença de Chagas. Acredita-se que citotoxicidade dependente de anticorpos e da ativação de células T autorreativas estaria envolvida com a autoimunidade presente nesta patologia (Boney e Engman, 2008).

Várias questões sobre em qual estágio da doença começa a surgir a autoimunidade ainda não foram totalmente compreendidas. Na fase aguda, ela poderia ser disparada pelo contato inicial entre o parasito e o hospedeiro. O dano tecidual causado pelo parasito ou por reações cruzadas com antígenos do parasito poderiam induzir a perda da tolerância imune. Outra hipótese seria de a autoimunidade se desenvolver apenas num estágio mais tardio, mas também seja possível que resposta não patogênica esteja presente em ambas as fases da doença (aguda e crônica), mas só se tornem patogênicas tardiamente (Leon e Engman, 2001).

Existem alguns mecanismos que explicam como agentes infecciosos podem iniciar e perpetuar a autoimunidade em várias doenças. Alguns destes foram estudados em relação ao seu envolvimento na patologia da doença de Chagas. Um exemplo é o mimetismo molecular, onde uma resposta antígeno-específica para células B e T próprias pode ser iniciada na presença de um patógeno devido a uma reação cruzada (Gironès e cols, 2007). De acordo com esta hipótese, proteínas do parasito e proteínas próprias do hospedeiro teriam seqüências similares de aminoácidos ou de epítomos tridimensionais. Assim, linfócitos no coração reconheceriam estas estruturas e conduziriam a uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia contra um componente específico do tecido cardíaco que apresente semelhanças estruturais com certos antígenos do *T. cruzi* (Cunha-Neto e cols, 1995; Leon e Engman, 2001). A existência de mimetismo molecular entre a miosina cardíaca e a proteína B13 do *T. cruzi* sugere que as lesões cardíacas presentes em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica seriam o resultado de uma resposta celular efetora contra a miosina cardíaca disparada por um reconhecimento autoimune (Bilate e Cunha-Neto, 2008). Outros antígenos do *T. cruzi*, como Cha e cruzipaína, já foram estudados e também apresentaram reações cruzadas com antígenos do hospedeiro (Gironès e cols, 2005).

Tentativas de produzir patologias micro e macroscópicas pela imunização de coelhos com injeções de alguns antígenos particulares de tripomastigotas de *T. cruzi* emulsificados com adjuvantes foram falhas (Teixeira e Santos-Buch, 1975; Teixeira e cols, 1983). O exame microscópico de tecidos revelou somente pequenos focos de infiltrados inflamatórios no coração

de coelhos imunizados. Esses resultados sugerem que reações cruzadas com antígenos no coração induziriam apenas infiltrado inflamatório quase imperceptível, porque a imunização de coelhos com antígenos do parasito ocorre com a ausência dos sintomas clínicos e das lesões macroscópicas típica da doença. Estes resultados são contrastantes com a progressiva destruição do tecido cardíaco e com o quadro de cardiomegalia encontrados em coelhos infectados com este parasito e que desenvolvem a doença cardíaca (Teixeira e cols, 2011b). E, de fato, estudos de mimetismo molecular em camundongos mostraram que as reações anti-miosina cardíaca, em resposta à imunização com proteínas do *T. cruzi*, não induziram dano cardíaco semelhante ao presente em animais realmente infectados com o parasito. O discreto infiltrado linfocitário encontrado não se traduz em rejeição típica de célula-alvo não parasitada encontrada na doença de Chagas (Teixeira e cols, 2011b). Um estudo recente demonstrou que a imunização de camundongos com parasitos mortos por aquecimento e emulsificados com adjuvante produziu baixos níveis de citocinas e também não induziu inflamação significativa no tecido cardíaco (Bonney e cols, 2011).

O ambiente inflamatório pode induzir um processamento diferencial de autoepítomos liberados pelas células apresentadoras de antígenos. Proteínas que são normalmente sequestradas e protegidas do reconhecimento imune começam a ser expostas ao sistema imune. Consequentemente, elas se tornam facilmente imunogênicas, pois antígenos crípticos (peptídeos que não são normalmente apresentados) começam a se tornar acessíveis a linfócitos T autorreativos que escaparam da tolerância central e periférica (Sfriso e cols, 2010). Isso poderia estar acontecendo na doença de Chagas. A presença do interferon- γ (IFN- γ) no ambiente, por exemplo, pode influenciar este processo. O conteúdo celular de proteases envolvidas na produção e destruição de peptídeos antigênicos é modificado pelo tratamento de células com IFN- γ . Desse modo, a oferta de peptídeos parece estar aumentada porque sua produção foi estimulada e sua destruição diminuída, alterando a quantidade de peptídeos disponíveis para a apresentação de antígenos (York e cols, 1999).

Esses mecanismos são considerados antígeno-específicos. O mecanismo de ativação *bystander* é dito antígeno não-específico. Essas reações podem ser observadas quando a exposição antigênica ocorre devido a um dano tecidual e a uma sensibilização num ambiente inflamatório. A ativação *bystander* pode ser resultante de uma citólise do miocárdio devido à infecção pelo *T. cruzi* que leva a uma liberação de proteínas próprias. O ambiente pró-

inflamatório presente em conjunto com os níveis elevados de antígenos do miocárdio pode causar um aumento na apresentação de autopeptídeos, estimulando a expansão de células autorreativas (Leon e Engman, 2001). Algumas vezes, apenas o ambiente pró-inflamatório no tecido do hospedeiro durante a infecção parasitária é suficiente para ativar células T autorreativas através da diminuição do limiar de ativação. O processamento e a apresentação de auto-antígenos podem ser aumentados pela ativação *bystander*, a qual pode induzir o processo de epítipo *spreading*, definido como a expansão ou propagação de respostas imunes contra diferentes auto-antígenos (Sfriso e cols, 2010). Já foi descrito o envolvimento deste mecanismo na patogênese de várias doenças autoimunes. Todos esses processos podem levar a uma ativação policlonal que estaria envolvida na patogênese da doença de Chagas. Entretanto, o papel desse mecanismo na doença de Chagas é inconsistente com os dados clínico-epidemiológicos, os quais mostram que a fase aguda da infecção em humanos, com altas cargas parasitárias, é frequentemente assintomática apesar de um elevado nível de autoproteínas liberadas durante o dano às células do coração devido à ação mecânica das formas parasitas intracelulares (Teixeira e cols, 2011b).

A ocorrência de mecanismos autoimunes e a intensidade dessas reações podem depender da genética do parasito e do hospedeiro, pois muitas pessoas não desenvolvem a doença apesar da infecção. Vários genes do hospedeiro parecem estar envolvidos na susceptibilidade e na resistência à autoimunidade induzida pelo *T. cruzi*. Além disso, o limiar de dano ou inflamação necessário para induzir a autoimunidade pode depender da linhagem do parasito (Leon e Engman, 2001).

Observou-se que, mesmo quando animais eram tratados com nitroderivado tripanocida, as fibras cardíacas continuavam a ser rejeitadas por células efectoras do sistema imune, o que reforça a idéia da presença de um perfil autoimune nesta doença (Teixeira e cols, 2006). Estudos do LMPDC indicam que a integração do DNA do parasito no material genético do hospedeiro (o que caracteriza mutações via transferência gênica horizontal) poderia estar envolvida nos mecanismos autoimunes presentes na doença de Chagas. Este tema será abordado mais detalhadamente no tópico 6 da introdução.

4. Integração de DNA exógeno

Até recentemente a transferência gênica entre espécies distantes no filo era conhecida apenas entre procariotos. Porém, os estudos de evolução molecular frequentemente apresentam saltos na filogênese que são sugestivos de ganhos genéticos vindos de espécies distantes. O sequenciamento de genomas tem mostrado parálogos que indicam ganho de DNA por transferência horizontal seguida de fixação pela reprodução sexuada. A documentação desta forma de herança explica porque os genomas são quiméricos, ou seja, contêm material genético de outras espécies (Katz, 2002). Essa transferência gênica horizontal (TGH), também conhecida como transferência gênica lateral, representa a passagem de material genético entre espécies diferentes, que não acasalam entre si. Para que essa herança de DNA tenha significado biológico, é necessário que haja sua fixação no genoma das progênies mediante reprodução sexuada. Ultimamente, este fenômeno tem sido reconhecido em varias ocasiões e, atualmente, tem sido considerado uma verdadeira força evolutiva (Gilbert e cols, 2010).

Existem diversos relatos da ocorrência de TGH entre diferentes organismos. Um grande exemplo seria a ocorrência de massivas transferências gênicas por bactérias endossimbiontes. Os dois grandes exemplos de endossimbiose na evolução de eucariotos seria a origem da mitocôndria e do plastídio, que foram originados, respectivamente, de uma alfa-proteobactéria e de uma cianobactéria. As TGH podem ocorrer entre diversas classes: de procariotos para procariotos, de procariotos para eucariotos, de eucariotos para eucariotos, e de eucariotos para procariotos, sendo essa transferência muito notável entre estas classes e vírus (Keeling e Palmer, 2008). Em alguns casos, a quantidade e as fontes das transferências gênicas que estão ocorrendo podem estar ligadas ao estilo de vida do organismo. Os primeiros casos de TGH documentados estavam associados com parasitismo e fatores de virulência, com a documentação de genes conferindo resistência a drogas se movendo entre patógenos. Existem vários exemplos de genes adquiridos por parasitos que permitiram que estes tirassem proveito de novas fontes de energia e sobrevivessem em diversos ambientes (Keeling, 2009).

As primeiras evidências de que os genomas eucarióticos seriam quiméricos vieram da análise de múltiplos genes e, num momento mais atual, dos sequenciamentos de genomas. Vários métodos vêm sendo usados para detectar a transferência gênica lateral, sendo aplicados tanto em procariotos como em eucariotos. Estas técnicas ainda apresentam falhas que precisam ser

contornadas. Uma combinação de métodos filogenéticos, análises de distribuição de padrões e a identificação de semelhanças nos habitats entre o pressuposto doador e as linhagens receptoras tem sido particularmente úteis para identificar eventos de TGH afetando eucariotos (Andersson, 2005). A busca de semelhanças nas seqüências, utilizando algoritmos como o BLAST, é um dos métodos mais usados e o mais prático para detectar possíveis eventos de transferência. Nesse método, a evidência de uma TGH ocorre quando a seqüência homóloga mais próxima da seqüência que está sendo analisada é um gene de um organismo filogeneticamente distante daquele estudado (Andersson, 2005).

5. Elementos transponíveis

Os elementos transponíveis (TEs - *transposable elements*) são segmentos de DNA com a capacidade de se moverem de um *locus* para o outro, muitas vezes se duplicando durante este processo. Estes elementos são muito abundantes e uma grande porcentagem da maioria dos genomas eucarióticos é composta por TEs, chegando a representar cerca de metade do genoma humano (Schaack e cols, 2010). Devido à característica de poderem se transpor com uma alta frequência, eles atuam como poderosos agentes mutagênicos insercionais endógenos (Kazazian, 2004). A mobilidade e a amplificação dos TEs constituem uma representativa fonte de variação genômica, tendo profundos efeitos na estrutura, função e evolução do genoma de seus hospedeiros. Estas variações ocorrem devido à capacidade de inserção e de desencadear uma variedade de arranjos cromossômicos em pequena e larga escala. Como consequência, podem ter um grande impacto na definição do fenótipo do organismo (Kordis, 2009).

Os TEs são classificados em dois grupos principais, classe I e classe II, de acordo com o seu mecanismo de transposição. Os TEs da classe I, conhecidos como retroelementos ou retrotransposons, utilizam uma transcriptase reversa para se moverem via RNA intermediário, que é copiado em DNA e integrado no genoma. Baseando-se na sua estrutura organizacional, os elementos desta classe foram divididos em retrotransposons com longas repetições terminais (LTR) e em retrotransposons não-LTR, também chamados de retroposons. Os TEs da classe II, ou DNA transposons, se movem via DNA intermediário, utilizando uma transposase neste processo. Ou

seja, o DNA é retirado de um sítio e inserido em um novo sítio alvo (Wicker e cols, 2007; Kazazian, 2011).

Cada classe de TEs contém elementos autônomos e não-autônomos. Elementos autônomos codificam proteínas, com atividade de transcriptase reversa e de endonuclease, necessárias para a transposição. Elementos não-autônomos não codificam estas proteínas, podendo se mover apenas se essas atividades forem providas por elementos autônomos presentes na mesma célula. Retrotransposons não-LTR são divididos em elementos autônomos LINEs (*long interspersed elements* - elementos entrecassados longos) e não-autônomos SINEs (*short interspersed elements* - elementos entrecassados curtos) (Wicker e cols, 2007; Kazazian, 2011).

Análises de genomas de diferentes organismos forneceram evidências de que o conteúdo de TEs varia de espécie para espécie de várias maneiras: pela classe de elementos presentes; pelo nível de atividade dos TEs e pela quantidade presente no genoma. A presença de TEs ativos varia muito entre as espécies. Enquanto que um grande número de genomas contém várias famílias de elementos ativos, alguns outros, como no caso de vários mamíferos, possuem um número bem baixo de linhagens ativas (Kazazian, 2004). Os LINE-1s (L1s) são um exemplo de elementos autônomos e ativos em humanos, que são considerados os retrotransposons mais bem sucedidos em mamíferos (Kazazian, 2011). A galinha (*Gallus gallus*) apresenta características interessantes em relação aos seus TEs, que serão descritas a seguir.

5.1. Elementos transponíveis de *Gallus gallus*

O genoma da galinha, publicado em 2004 pelo *International Chicken Genome Sequencing Consortium* (ICGSC), forneceu uma ampla visão sobre a diversidade, organização, atividade e evolução dos TEs nesta ave. Elementos repetitivos representam menos de 10% do genoma destes animais, sendo um número pequeno se comparados aos dos mamíferos, cuja porcentagem varia entre 40 e 50%. Essa baixa densidade de repetições indica que este genoma possui uma estrutura compacta (ICGSC, 2004; Burt, 2007). Os mecanismos que controlam a atividade e o número de cópias de TEs na galinha ainda permanecem pouco compreendidos (Lee e cols, 2009).

O conteúdo de elementos repetitivos nas aves apresenta algumas características peculiares. A maioria dos TEs no genoma da galinha, cerca de 80%, é constituída por elementos tipo LINEs da família *chicken repeat 1* (CR1), que são considerados degenerados e não

funcionais. Acredita-se que a baixa densidade de TEs na galinha ocorra devido a essa baixa atividade recente destes elementos (Abrusan e cols, 2008). Pouco se sabe sobre a contribuição de elementos da classe II no genoma da galinha. Porém, alguns trabalhos indicam a presença de seqüências de DNA transposons, que apresentam regiões codantes para transposases semelhante a algumas codificadas por transposons no genoma humano (Wicker e cols, 2005). Abaixo serão descritos mais detalhadamente alguns elementos não-LTR e LTR da galinha.

5.1.1. Elementos não-LTR de Gallus gallus

No genoma da galinha, os elementos CR1 são os mais freqüentes retrotransposons não-LTR, constituindo cerca de 6,4% do genoma total desta ave (ICGSC, 2004). Este TE foi primeiramente identificado em aves e apresenta uma ampla distribuição taxonômica, sendo encontrado em uma variedade de vertebrados, como tartarugas, cobras e lagartos, e de invertebrados, como insetos e nematóides (St John e Quinn, 2008a).

O CR1 se assemelha ao elemento L1 de mamíferos ao apresentar uma região 5'UTR, seguido por duas fases de leitura aberta (ORF1 e ORF2) e uma região 3'UTR (Figura 4). ORF1 tem o potencial de codificar uma proteína de ligação ao ácido nucléico de cerca de 36 kDa, que contém um motivo de dedo de zinco. No entanto, a função exata da ORF1 ainda é desconhecida (Wicker e cols, 2005). A ORF2 codifica uma proteína de aproximadamente 95 kDa com atividades de endonuclease e de transcriptase reversa, assim como encontrado nos L1s de mamíferos. Essa proteína seria a responsável pela replicação do elemento (Burch e cols, 1993; Lee e cols, 2009)

A maioria dos elementos CR1 são truncados nas suas terminações 5', as quais são necessárias para a transcrição, tornando poucas cópias de CR1 potencialmente capazes de se retrotranspor no genoma da galinha (Burch e cols, 1993; Lee e cols, 2009). Ao contrário da região 5'UTR, as 3' são bem conservadas em todos os tipos de CR1, terminando com 2 a 4 cópias de uma repetição de 8 pb (ATTCTRTG) e com a ausência de uma cauda poliadenilada (poliA), conforme ilustrado na figura 4. Um elemento CR1 intacto compreende cerca de 4,5 kb. Aproximadamente 200 mil cópias de CR1 são encontradas neste genoma e, destas, 98% são menores que 2000 pb (ICGSC, 2004; Wicker e cols, 2005). Uma vez que estas cópias truncadas foram inseridas, elas provavelmente se tornaram silenciosas e não funcionais. É interessante

observar que a cauda poli-A em mamíferos é um substrato essencial para transcriptase reversa de L1, uma característica que ajuda a explicar a abundância de elementos ativos em mamíferos se comparados à galinha. A existência de elementos CR1 ativos e funcionais na galinha ainda é incerta (Abrusan e cols, 2008; Liu e cols, 2012). A análise do genoma da galinha, encontrou 22 subtipos de CR1, que foram separados considerando-se apenas a região 3'. Os subtipos de CR1 que teriam sido mais recentemente ativos seriam CR1-F e CR1-B (ICGSC, 2004).

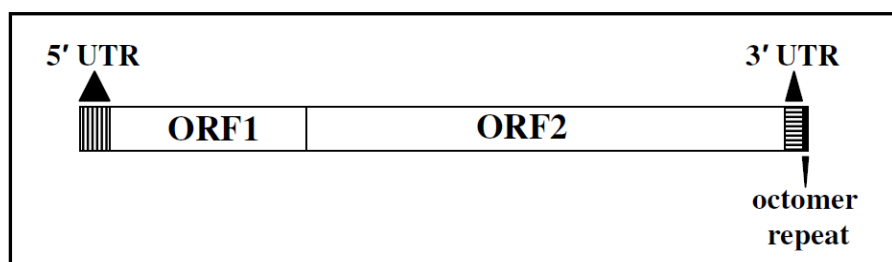


Figura 4. Representação gráfica do retrotransposon não-LTR CR1. As duas fases de leitura aberta (ORF1 e ORF2) codificam proteínas necessárias para o sucesso da retrotransposição do elemento. As regiões 5' e 3' UTR flanqueiam as duas ORFs. Adjacente à região 3' UTR, localiza-se os octômeros repetidos. Adaptado de St John & Quinn (2008b).

A maioria dos elementos está concentrada em regiões ricas em G/C e várias repetições de CR-1 foram encontradas flanqueando múltiplos genes. Porém, elementos CR1 também podem ser encontrados acumulados em regiões ricas em A/T (ICGSC, 2004; Burt, 2007). A densidade de CR1 varia entre os cromossomos. Os macrocromossomos são ricos em CR1. No cromossomo sexual Z, as repetições são ainda mais abundantes que nos autossomos. Nos microcromossomos, as densidades de CR1 são bem menores (Abrusan e cols, 2008).

A galinha apresenta um número baixo de SINEs, provavelmente devido à perda ou a baixa atividade dos elementos CR1 nesta ave (Wicker e cols, 2005). E, ao contrário de outros animais vertebrados, nenhum SINE ativo foi identificado no genoma da galinha nos últimos 50 milhões de anos (ICGSC, 2004).

5.1.2. Elementos LTR de *Gallus gallus*

Os retrotransposons LTR representam apenas uma pequena fração do DNA repetitivo destas aves. A característica principal deste grupo é um domínio interno, contendo uma região codante para proteínas necessárias para a replicação, que é flanqueado por repetições diretas de várias centenas de pares de base. As seqüências LTR fornecem as regiões promotora e 3' que são essenciais para o processo de replicação (Wicker e cols, 2005). Entre os LTR já identificados na galinha, encontram-se os retrotransposons Birddawg, Hitchcock, Kronos, e Soprano. As repetições LTR se tornaram silenciosas provavelmente devido a truncamentos que tornaram estes elementos não funcionais, como *crossing-overs* intraelemento que podem ter levado a excisões de domínios internos. Pode ser que ainda existam alguns elementos LTR intactos que não foram detectados, já que o sequenciamento do genoma da galinha ainda apresenta *gaps*. Especialmente no caso do Hitchcock, nenhum domínio interno foi identificado, mas este elemento foi classificado como LTR principalmente devido à presença das regiões terminais conservadas e à ausência de cauda poli-A (Wicker e cols, 2005).

Os elementos LTR também incluem retrovírus endógenos (ERVs), que teriam sua origem em infecções ancestrais por retrovírus exógenos, que teriam se integrado no genoma e sido transmitidos às sucessivas gerações durante milhares de anos (Kovalskaya, 2006). Somente 1,3% do genoma da galinha podem ser classificados como retrovírus endógenos, enquanto que os ERVs representam cerca de 5% do genoma humano (Huda e cols, 2008). No genoma da ave, encontram-se ERVs pertencentes às três classes retrovirais, mas apenas os retrovírus das classes 2 e 3 ainda estão ativos (ICGSC, 2004; Wicker e cols, 2005). Estes poucos ERVs representam os retroelementos e TEs ativos no genoma da galinha (Huda e cols, 2008).

5.2. TGH via elementos transponíveis

A dificuldade em reconhecer o significado evolutivo da TGH entre genomas multicelulares de eucariotos pode estar ocorrendo devido à desproporcional atenção dada à transferência de genes em oposição a de DNAs não-gênicos. Uma diferença fundamental entre a composição genômica de eucariotos em comparação aos procaritos é que genes representam uma minoria em um material genético lotado de regiões não-codantes e de elementos transponíveis

(Schaack e cols, 2010). Esta habilidade marcante dos TEs, de cruzar as fronteiras entre as espécies e invadir novos genomas, os inclina a participar do processo de TGH. Para que esta transferência lateral ocorra de forma satisfatória, é necessário que aconteça a transferência do TE para as linhagens germinativas das espécies receptoras e que ocorra uma alta taxa de transposição, levando a uma rápida propagação no genoma (Loreto e cols, 2008).

Existem várias evidências de que as interações parasito-hospedeiro podem promover a ocorrência de TGH entre invertebrados e vertebrados. Um estudo recente mostrou que o inseto *Rhodnius prolixus* carrega em seu genoma quatro famílias distintas de transposons que também invadiram os genomas de grupos tetrápodes. Os vertebrados terrestres servem como fonte de alimentação para o triatomíneo transmissor do *T. cruzi* para mamíferos. A grande quantidade de sangue e saliva trocada entre o inseto e seu hospedeiro durante o repasto facilita a difusão dos tripanossomas (Gilbert e cols, 2010). A TGH dos transposons poderia estar ocorrendo via parasitos intracelulares, já que já foi comprovada a transferência de material genético entre tripanossomas e seus hospedeiros vertebrados (Hecht e cols, 2010). Entretanto, ainda não foi detectada a presença de elementos transferidos mediante linhagens de *T. cruzi* que infectam o inseto, indicando que talvez haja outra via de transferência. No *Rhodnius prolixus*, elementos de duas das famílias estudadas de transposons tiveram 98% de identidade com os do gambá e do sagui, agrupando-se filogeneticamente com os encontrados nestes hospedeiros mamíferos preferidos por este inseto na América do Sul. Estes dados indicam que a transferência de material genético entre animais pode ocorrer numa escala jamais imaginada anteriormente (Gilbert e cols, 2010).

Diferentes mecanismos de TGH podem ser usados pelos TEs. Alguns TEs, como transposons LTRs, são capazes de produzir partículas semelhantes a partículas virais que poderiam ser vetores da transferência. Outros TEs poderiam estar sendo transportados por DNAs virais. Supostamente, alguns parasitos e parasitóides transferem seus elementos diretamente para o hospedeiro. Alguns TEs poderiam “pegar carona” (*hitchhiking*) nos genomas de bactérias simbiotes intracelulares, que se tornariam seus vetores. Neste caso, bacteriófagos poderiam ser os vetores intermediários que transferem os TEs para o genoma de bactérias (Loreto e cols, 2008).

6. Integração de minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro

Estudos prévios do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC), FM/UnB, indicaram que a integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro ocorre freqüentemente (Teixeira e cols, 1994), sendo documentados vários casos de integração de kDNA no genoma de hospedeiros humanos e de babuínos naturalmente infectados e em coelhos e aves infectados em laboratório (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2006; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a). Os segmentos de minicírculos do DNA do cinetoplasto do parasito foram encontrados integrados em retrotransposons L1 em macrófagos humanos (Simões-Barbosa e cols, 2006) e em diversos pacientes crônicos e seus descendentes (Hecht e cols, 2010). A transferência lateral de kDNA (*lateral kDNA transfer* - LkDT) é a integração das seqüências de minicírculos no genoma do hospedeiro, ocorrendo tanto em células somáticas como em células germinativas. Já a transferência vertical de kDNA (*vertical kDNA transfer* - VkDT) é a transferência destas seqüência integradas para a progênie através da células germinativas que carregam as mutações (Hecht e cols, 2010; Teixeira, 2011).

Hecht e colaboradores (2010) identificaram eventos de transferência lateral de DNA do *T. cruzi* para o hospedeiro humano. Pacientes infectados naturalmente por este parasito apresentaram minicírculos do DNA mitocondrial do *T. cruzi* integrados em elementos L1 de vários cromossomos. Esses pacientes transferiram verticalmente estes minicírculos integrados para a sua progênie. A análise dos sítios de integração encontrados randomicamente mostrou a existência de regiões de micro-homologia compartilhadas pelas seqüências do kDNA do *T. cruzi* e do DNA do hospedeiro. Estas regiões de micro-homologia contêm de 6 a 22 nucleotídeos ricos em A/C e parecem estar envolvidas no mecanismo que medeia a integração. Um ponto essencial da transferência do kDNA para o genoma das células hospedeiras seria a decatenação dos minicírculos, que ocorre antes da divisão celular. Esta etapa seria muito importante, pois as regiões ricas em A/C, as CSBs do minicírculo, estariam expostas, permitindo a complementariedade com curtas seqüências do DNA do hospedeiro. A grande freqüência destas seqüências ricas em A/C ligando o kDNA ao DNA do hospedeiro nas seqüências quimeras encontradas indica que este fenômeno de integração do kDNA seria um mecanismo de recombinação mediada por micro-homologia (Hecht e cols, 2010).

Observa-se uma importante associação das seqüências de minicírculos integrados com elementos transponíveis dos hospedeiros. No caso dos humanos, além das inserções em L1, também foram encontradas seqüências inseridas em outros retrotransposons, como SINEs e retrovírus endógenos (Hecht e cols, 2010). Nas aves, foram encontradas inserções presentes em transposons LTR Hitchcock e em retrotransposons não-LTR CR1 (Teixeira e cols, 2011a).

A inserção do kDNA no genoma do hospedeiro pode gerar fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frame*) quimeras, ou seja, ORFs que contém uma região de DNA do hospedeiro ligada ao DNA do minicírculo de kDNA. Estas ORFs teriam o potencial de codificar proteínas quimeras que podem ter importância na patogênese da doença de Chagas. Algumas proteínas putativas traduzidas de ORFs quimeras geradas pela inserção dos minicírculos de kDNA já foram descritas no genoma humano e de galinhas (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a). Além da potencial capacidade de gerar tais proteínas, a inserção de kDNA no genoma do hospedeiro também poderia ocasionar alterações funcionais em proteínas já existentes, devido à ruptura de genes. Já foram detectadas inserções em genes do receptor olfatório de humanos (Hecht e cols, 2010) e da distrofina de galinhas (Teixeira e cols, 2011a). Porém, este é um assunto que ainda requer extensa investigação. Todas essas informações acumuladas são fontes valiosas para o avanço do estudo sobre o papel das inserções de kDNA no desenvolvimento da doença de Chagas. Neste contexto, a utilização do modelo experimental *Gallus gallus* possibilitou a realização de “experimentos-chave” que elucidaram eventos envolvidos na patogênese dessa doença, como veremos a seguir.

7. O modelo experimental *Gallus gallus*

A galinha (*Gallus gallus*) é a ave com o maior avanço na análise de seqüências do genoma, apresentando a possibilidade de ser amplamente utilizada em pesquisas nas áreas de ciências da vida. Várias linhagens já foram bem estudadas, sendo amplamente utilizadas como animais experimentais em pesquisas que necessitam de manipulação cirúrgica ou transplante de tecidos. Destaca-se a existência de linhagens de galinhas histocompatíveis entre si ou entre outras linhagens, o que proporciona a estes animais um grande valor experimental (Valdez Jr e cols, 2007). O embrião de galinhas tem sido muito utilizado no estudo da embriogênese de vertebrados

na área de biologia do desenvolvimento. A galinha é também muito utilizada em estudos nas áreas de virologia, oncogênese e imunologia (ICGSC, 2004).

7.1. Características do genoma de *Gallus gallus*

A galinha foi o primeiro animal agrícola a ter o genoma sequenciado. Este é composto de aproximadamente 1,2 bilhões de pares de bases, cerca de um terço do tamanho do genoma humano, e apresenta de 20.000 a 23.000 genes. O cariótipo da galinha ($2n=78$) contém 38 autossomos e um par de cromossomos sexuais. Os autossomos tem tamanhos marcadamente distintos, sendo classificados em macro-cromossomos (1 a 5), cromossomos intermediários (6 a 10) e micro-cromossomos (11 a 38). Os cromossomos sexuais são denominados Z e W, sendo os machos homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW), ao contrário do observado em mamíferos (ICGSC, 2004; Burt, 2007).

7.2. Características do Sistema Imune de *Gallus gallus*

As aves sempre foram animais importantes nos estudos sobre o sistema imune. Os conceitos de células T e B entraram no vocabulário da imunologia após pesquisas básicas com galinhas, que revelaram o papel imunológico da bursa de Fabricius e do timo. O sistema imune de aves apresenta muitas características semelhantes ao de mamíferos, compartilhando a maioria dos constituintes celulares e moleculares, mas muitas diferenças também são encontradas (Glick, 2000). Por exemplo, as aves apresentam um único rearranjo no gene da imunoglobulina em ambos os *loci* das cadeias leve e pesada, adquirindo maior diversidade na seqüência através da conversão gênica em um órgão especial chamado bursa de Fabricius, que é requerido para a maturação de células B (Rogers e cols, 2008).

As aves apresentam mais genes variáveis de receptores de células T (TCR) γ e δ do que genes variáveis de TCR α e β , tendo apenas duas famílias de TCR $\alpha\beta$, e um número bem maior de células T $\gamma\delta$ no sangue do que humanos e camundongos. Muitas das citocinas descobertas em mamíferos estão presentes no genoma da galinha, mas algumas ainda não foram encontradas, como, por exemplo, alguns membros da família do fator de necrose tumoral (TNF), o que já era esperado devido à ausência de linfonodos em aves (Rogers e cols, 2008).

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) das galinhas é bem simples. As regiões relacionadas ao MHC nas aves estão presentes no *locus* B do microcromossomo 16 e são denominadas B-F, B-L e B-G, que se referem, respectivamente, aos antígenos de MHC de classe I, II e IV (Delany e cols, 2009). Os antígenos de MHC têm um efeito direto na regulação da resposta imune nas aves. Antígenos B-L estão presentes em células B, macrófagos, células dendríticas e em células T ativadas de aves, sendo análogos aos de classe II de mamíferos. Antígenos B-F são expressos na maioria das células da galinha e equivalem aos antígenos de mamíferos de classe I. As regiões B-L e B-F determinam a rápida rejeição de aloenxertos e a cooperação celular na resposta imune, sendo que esses genes codificam proteínas da membrana celular que controlam a comunicação celular e que podem influenciar a resistência ou susceptibilidade a doenças. A região B-G codifica antígenos específicos para eritrócitos e não tem equivalente em mamíferos (Valdez Jr e cols, 2007; Delany e cols, 2009).

7.3. Refratariedade das aves ao *Trypanosoma cruzi*

A refratariedade das aves ao *T. cruzi* é um fato já extensamente estudado. Dias, em 1944, já havia descrito a resistência natural de pombos a este parasito ao inoculá-los com formas sanguíneas do parasito, obtendo xenodiagnósticos negativos desde três horas até 25 dias após as inoculações. Atualmente, já se sabe que as aves são refratárias ao *T. cruzi* desde o nascimento (Nery-Guimarães e Lage, 1972). Ovos embrionados de galinhas infectados com formas tripomastigotas apresentam embriões com parasitemias de intensidade variável até o oitavo dia de desenvolvimento embrionário. Porém, os pintos originados destes ovos apresentam-se negativos para esta infecção (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2011a). Quando os tripomastigotas são inoculados nas aves, os parasitos são eliminados imediatamente, de forma que não conseguem atingir a corrente sanguínea (Nery-Guimarães e Lage, 1972). Então, verifica-se que as aves são refratárias ao *T. cruzi*, mas apresentam uma janela imunológica na fase embrionária na qual a infecção pode se estabelecer (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2011a).

Essa refratariedade das aves ao *T. cruzi* representa um exemplo de resistência natural do hospedeiro a uma infecção parasitária. Originalmente, acreditava-se que isso ocorria devido à presença de um anticorpo natural contra o *T. cruzi* no sangue das aves. Mas estudos *in vitro* mostraram que a atividade lítica do soro não era prejudicada em galinhas imunossuprimidas e que

estava presente mesmo na ausência de anticorpos. Demonstrou-se também que a lise do parasito ocorre na ausência de íons de cálcio, mas depende de íons de magnésio, indicando que o complemento estava sendo ativado pela via alternativa (Kierszenbaum e cols, 1976).

O requerimento do complemento para a resistência ao parasito e o envolvimento da via alternativa do complemento já foram bem estudados, tendo sido demonstrado que tanto galinhas normais como galinhas agamaglobulinêmicas eliminam tripomastigotas injetados intravenosamente em sua circulação em nove minutos ou menos. Em contraste, aves com depleção do complemento chegam a demorar de 21 a 48 horas para reduzir as parasitemias iniciais a níveis indetectáveis (Kierszenbaum e cols, 1981). Embriões de aves são conhecidos por apresentar no soro níveis bem baixos ou até ausentes do complemento, o que poderia explicar a susceptibilidade dos embriões ao *T. cruzi*. Isto é compatível ao fato de que as galinhas se tornam refratárias ao parasito após o nascimento, quando os níveis do complemento se apresentam rapidamente mais altos (Nery-Guimarães e Lage, 1972; Kierszenbaum e cols, 1976). Répteis e anfíbios são igualmente refratários à infecção pelo *T. cruzi* porque também apresentam um efeito lítico sobre este parasito mediado pelo complemento (WHO, 2002).

7.4. A utilização do modelo *Gallus gallus* no estudo das mutações de kDNA

As aves são um modelo “limpo” para o estudo da transferência horizontal de mutações de kDNA. Como são refratárias ao *T. cruzi* e a infecção por este parasito pode ser estabelecida apenas na vida embrionária, a infecção de ovos férteis permite o nascimento de animais livres destes parasitos, mas com a presença das integrações de minicírculos de kDNA em seu genoma (Nitz, 2004; Teixeira e cols, 2011a).

Aves kDNA-positivas desenvolveram fraqueza muscular e sinais de falência cardíaca. A necrópsia dessas aves demonstrou que elas apresentavam as típicas unidades mínimas de rejeição associadas à doença de Chagas: cada fibra cardíaca atacada por células mononucleares do sistema imune contém uma unidade mínima de rejeição (Figura 5) e a associação dessas unidades resulta na miocardiopatia autoimune da doença de Chagas. Essas lesões são encontradas apenas nas aves mutadas com os minicírculos de kDNA do *T. cruzi*. Em várias dezenas de aves sadias não foram observadas lesões no coração (Cardoso, 2006; Teixeira e cols, 2006).

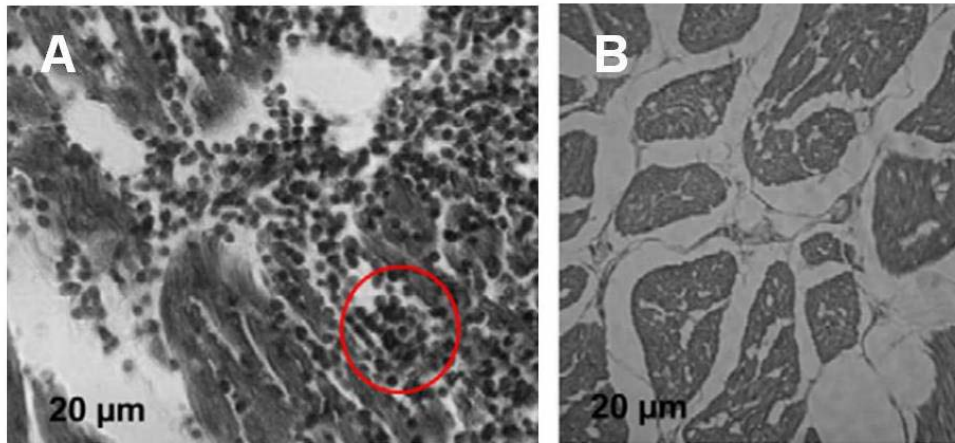


Figura 5. Presença de miocardite em uma ave kDNA positiva. A) Histologia mostrando a presença de miocardite difusa com infiltrados de células mononucleares do SI de uma ave mutada com kDNA. O círculo em vermelho destaca uma unidade mínima de rejeição, na qual linfócitos efetores destroem uma célula alvo livre de parasitos do coração. B) Histologia de uma ave controle negativa. Adaptada de Teixeira e cols, 2011a.

A integração do kDNA no hospedeiro vertebrado leva a uma resposta autoimune que resulta nas lesões teciduais no hospedeiro, o que explica parte da patogênese e das várias manifestações clínicas desta doença. O presente estudo nas aves pretende responder algumas das várias dúvidas sobre o papel das mutações de kDNA no disparo da autoimunidade e das alterações clínicas presentes na doença de Chagas.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Mapear os sítios de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma da galinha e estudar a herança dessas mutações nas diversas gerações.

2. Objetivos Específicos

- Identificar os *loci* de integração de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em células somáticas de galinhas;
- Avaliar a herança dessas mutações através da análise de seqüências quimeras presentes nas diferentes gerações de uma mesma família;
- Investigar a presença da integração do kDNA em genes específicos;
- Correlacionar as mutações presentes no genoma das aves com as alterações clínicas apresentadas pelos animais nas várias gerações;
- Analisar a possibilidade de formação de ORFs quimeras e/ou alterações de genes preexistentes em decorrência das mutações.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultura de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* Berenice foram crescidas em culturas de células musculares L6 cultivadas em meio mínimo essencial (DMEM), pH 7,2, contendo soro fetal bovino a 10%, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 250 mM de L-glutamina. Esta cultura foi cultivada a 37°C em estufa de CO₂ (5%).

2. Modelo animal

O modelo animal utilizado neste estudo foi o das aves congênicas de Praga. Ovos férteis do haplótipo BB (B12/B12) dessas aves foram doados pelo Instituto de Genética Molecular da Academia de Ciências de Praga, República Tcheca. Estas aves congênicas para os diferentes alelos do complexo MHC são histocompatíveis para todos os de antígenos das classes 1 e 2. A utilização destas aves nesta pesquisa foi devidamente autorizada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O LMPDC possui instalações no biotério da Faculdade de Medicina que contam com salas com pressão positiva de ar, controle de temperatura e de luminosidade, que permitem a manutenção de matrizes e a produção de aves para os experimentos. O acesso ao aviário é restrito à equipe técnica mediante uso de avental, gorro e máscara descartáveis, além de botas que são esterilizadas sobre bandejas de cal localizadas na entrada da sala.

2.1. Amostragem

A amostragem consistiu em 81 aves congênicas de Praga, agrupadas em três famílias (1, 2 e 3). A família 1 foi constituída pelas gerações F0, F1 e F2, enquanto que as famílias 2 e 3 foram formadas pelas gerações F0 a F3.

2.2. Cruzamento das aves

Os ovos doados geraram pintos saudáveis nascidos nas incubadoras do LMPDC. Aos oito meses de idade, as aves adultas foram reproduzidas por inseminação artificial pela equipe de pesquisadores da Faculdade de Medicina da UnB. Os machos forneceram o sêmen utilizado na inseminação de galinhas que já faziam a postura de ovos (Figura 6).

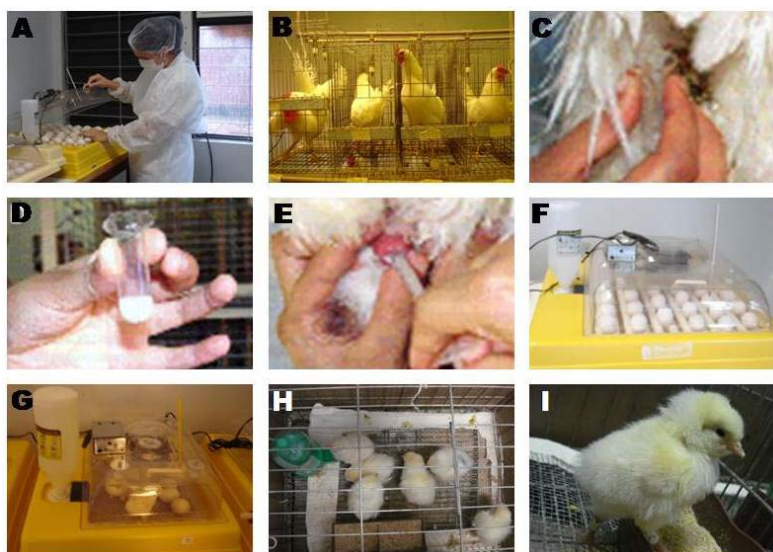


Figura 6. Inseminação artificial das aves. **A)** Equipe técnica trabalhando em condição técnica adequada. **B)** Vista frontal de uma unidade de reprodução contendo um macho e três fêmeas. **C)** Massagem da região genital do galo para coleta do sêmen. **D)** Volume padrão de sêmen obtido de um galo. **E)** Inoculação do sêmen no canal do magnum evertido da fêmea. **F)** Os ovos postos pelas fêmeas inseminadas permanecem a 37,5°C por 19 dias, em incubadoras adequadas. **G)** Após este período, os ovos são transferidos para os berçários, no qual permanecem a 37,5°C até a eclosão dos ovos, que acontece após dois dias. **H)** e **I)** Pintos nascidos dos ovos inseminados.

O processo de inseminação artificial foi utilizado para gerar novas matrizes e as famílias presentes neste estudo. Em média, 75% dos ovos fertilizados por inseminação artificial no laboratório continham embrião. No caso das famílias, também foram utilizadas no cruzamento as

aves nascidas com mutações de minicírculos de kDNA em seu genoma, obtidas conforme explicado a seguir.

2.3. Inoculação do *Trypanosoma cruzi* em ovos férteis de galinhas

Inoculou-se 100 formas tripomastigotas do *T. cruzi* Berenice na câmara de ar de ovos férteis obtidos por inseminação artificial. Para identificar a localização da câmara de ar, os ovos eram analisados por trans-iluminação em um ovoscópio. Era feito um furo na casca sobre o meio da bolha de ar e pelo orifício de 1 mm inoculava-se 5 μ L de meio de cultura contendo tripomastigotas. Os controles *mock* receberam a injeção de 5 μ L de meio de cultura. Utilizou-se parafina derretida para fechar os orifícios e os ovos eram levados para a incubadora e mantidos a 37,5 °C durante três semanas. A incubadora contava também com rotação a cada 30 minutos e umidade de 65%. Após 19 dias, os ovos foram transferidos para os berçários onde eclodiam pintos ali mantidos nas primeiras 24 h. O processo de inoculação dos ovos com o *T. cruzi* pode ser observado na Figura 7.

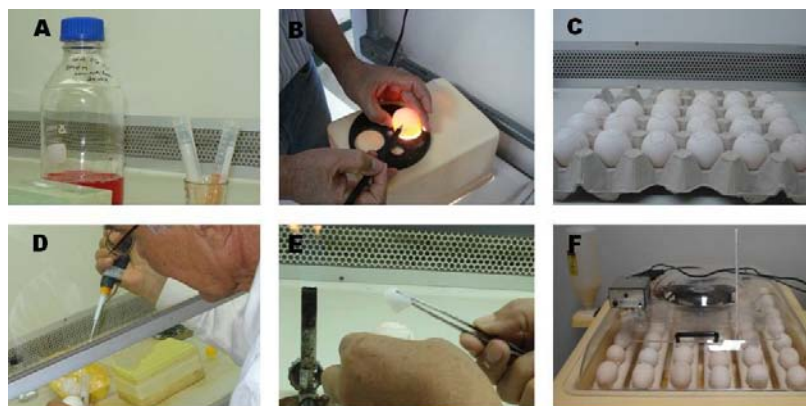


Figura 7. Inoculação de ovos férteis de galinhas com *T. cruzi*. A) Meio de cultura contendo as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. B) Ovos sendo analisados por trans-iluminação no ovoscópio para delimitação da região da bolha de ar. C) Ovos para inoculação, com as bolhas de ar já delineadas. D) Inoculação de 100 formas tripomastigotas em meio de cultura, através de furo na casca sobre a bolha de ar. E) Oclusão do orifício na casca com parafina derretida. F) Os ovos inoculados com o parasito foram mantidos nas incubadoras a 37,5°C, seguindo o procedimento usado para chocagem dos ovos.

As várias inoculações de ovos férteis com este parasito no LMPDC demonstram que a porcentagem de abortos de embriões no grupo de ovos controles (sem a infecção) foi em média de 23%, enquanto que nos ovos inoculados com tripomastigotas o percentual de abortos alcançou 45%.

3. Extração do DNA

3.1. Extração de DNA de células sanguíneas das aves

A extração do DNA de células sanguíneas foi realizada segundo o método descrito por Sambrook e Russel, 2001. O sangue das aves era coletado da veia da asa (veia ulnar cutânea), sendo possível obter de 1-2 mL de sangue dos pintos e de 8-10 mL das aves adultas. As células brancas foram separadas por gradiente de Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare), com centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos. A fração obtida foi lavada com PBS 1X pH 7,4 (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl), sendo obtido um sedimento de células, que foi suspenso em tampão de extração (1 mM TRIS-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) com proteinase K (100µg/mL), ficando incubado a 37 °C por 12 h. O material obtido foi submetido à extração por três vezes com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 25 : 24 : 1) e uma vez com igual volume de clorofil (clorofórmio : álcool isoamílico, na proporção 24 : 1). Todo tratamento das amostras com estas soluções foi feito à temperatura ambiente, sob leve agitação, e a separação das fases orgânica e aquosa foi feita por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. O DNA foi precipitado em 5 V de etanol 100% gelado e submetido a duas lavagens com etanol 70% gelado. O material resultante, após seco, foi ressuspenso em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris -HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e RNase (20µg/mL), ficando incubado a 37 °C por 12 h. Este DNA foi guardado a -20 °C.

3.2. Extração de DNA de tecidos das aves

Todas as aves que faleceram naturalmente ou que foram eutanasiadas foram submetidas à necropsia. Coletaram-se tecidos do coração e do baço de todas as aves. De algumas aves, também

foram coletados tecidos de diversos órgãos, como esôfago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, rim e músculo esquelético.

A coleta dos tecidos das aves tinha três finalidades: testes histológicos; reserva e extração de DNA. Os tecidos para histologia foram fixados em formol a 10% e emblocados em parafina para análise histopatológica. Os tecidos para reservas foram congelados em tubos contendo meio DMEM com soro fetal bovino e 10% de glicerol. Os tecidos para extração de DNA eram macerados e suspensos em 10 V de tampão de extração com proteinase K (100~~0~~g/mL), ficando incubado a 37 °C por 12 h. A extração do DNA dos diferentes tecidos foi realizada pelo mesmo método de extração clorofil : clorofane descrito no item acima. Ao final do procedimento, o DNA obtido foi estocado a -20 °C.

3.3. Extração de DNA total de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) e ressuspensão em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células/mL de solução, sendo incubado a 37 °C por 1 h. Após essa primeira incubação, adicionou-se proteinase K (100 µg/mL), ficando o material incubado por mais 12 h a 37 °C. Após este período, realizaram-se duas extrações com clorofane e uma com clorofil. O DNA foi precipitado com 2,5V de etanol 100% gelado e com 0,1V de acetato de sódio 3M pH 4,7. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e, após seco, foi ressuspensão em tampão TE. O DNA total de *T. cruzi* foi estocado a -20 °C.

3.4. Extração de kDNA de *T. cruzi*

O DNA do cinetoplasto extraído do *T. cruzi* foi utilizado na produção de sonda radioativa e em experimentos de validação da *tp*TAIL PCR. O kDNA foi isolado segundo metodologia descrita por Pérez-Morga e Englund, 1993. Através de centrifugação a 1.500 x g por 15 min, obteve-se um sedimento com cerca de 5×10^7 formas de cultivo, que foi lavado duas vezes com PBS. O sedimento foi ressuspensão em 630 µL de tampão NET-100 (10mM de Tris-HCl pH 8,0; 100mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl) e as células lisadas com 70 µL de SDS 10%.

Adicionou-se 7 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ao material resultante, que foi incubado a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com o auxílio de uma pipeta P1000 e foram acrescentados 690 μL de tampão NET -100 com sacarose a 20%. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi removido cuidadosamente com uma pipeta, deixando aproximadamente 30 μL . Novamente, adicionou-se mais 690 μL de NET-100 com sacarose 20%, repetiu-se a centrifugação e o pellet foi ressuspensão em 1000 μL de água destilada. O material resultante foi submetido a uma extração com clorofane e uma com clorofil. O kDNA foi precipitado com 2,5 V de etanol 100% gelado e 0,1 V de acetato de sódio 3 M, pH 8,0, lavado duas vezes com etanol 70% gelado e ressuspensão em 200 μL de tampão TE. O kDNA foi estocado a -20 $^{\circ}\text{C}$.

3.5. Quantificação e análise do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro, segundo Sambrook e Russel, 2001. A análise da integridade do DNA foi feita através da corrida eletroforética das amostras em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE (Tris acetato 90mM pH8,0, EDTA 25mM). A integridade das amostras de DNA obtidas das aves também foi testada através de PCR padrão para amplificação do gene constitutivo de β -actina.

4. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

4.1. Amplificações de nDNA e kDNA de *T. cruzi*

A PCR para amplificação de nDNA do *T. cruzi* foi realizada com *primers* TCZ1/TCZ2 específicos para o DNA nuclear deste parasito (Moser e cols, 1989; Virreira e cols, 2003). Estes *primers* geram uma banda de 188 pb, derivada de uma seqüência de 195 pb de DNA genômico repetitivo do *T. cruzi*. Esses elementos repetitivos de 195 pb constituem aproximadamente 9% do DNA nuclear deste parasito. A banda apresenta 7 pb a menos, pois a parte da seqüência rica em A/T (AATTTTCG, das posições 189 a 195) foi excluída dos *primers* para reduzir um anelamento

não-específico com regiões ricas em A/T do DNA de outros parasitos, insetos e mamíferos (Moser e cols, 1989). Já para a detecção do kDNA, foram realizadas PCRs com *primers* S35/S36 específicos para a detecção das regiões constantes de minicírculos de kDNA (Sturm e cols, 1989), ilustradas na figura 8A. Estes *primers* geram uma banda de 330 pb, que equivale a duas extremidades de regiões conservadas de kDNA e uma região variável inteira entre estas. Todos estes pares de *primers* estão presentes na Tabela 1.

Nas amplificações, foram utilizados 200 ng de DNA molde das aves e as seguintes condições: tampão de reação 10X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂ da Invitrogen; 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Em todas as reações, o controle negativo (DNA de ave não infectada no ovo) e o controle positivo (200 pg de DNA de *T. cruzi* Berenice) estavam presentes. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata no termociclador modelo My Cycler™ da BioRad, seguindo os seguintes programas:

	<u>ICZ:</u>		<u>kDNA:</u>
	95°C (05:00)		95°C (05:00)
30 ciclos	{	35 ciclos	{
	95°C (00:30)		95°C (00:30)
	68°C (00:30)		62°C (01:00)
	72°C (01:00)		72°C (01:00)
	72°C (05:00)		72°C (05:00)
	4°C ∞		4°C ∞

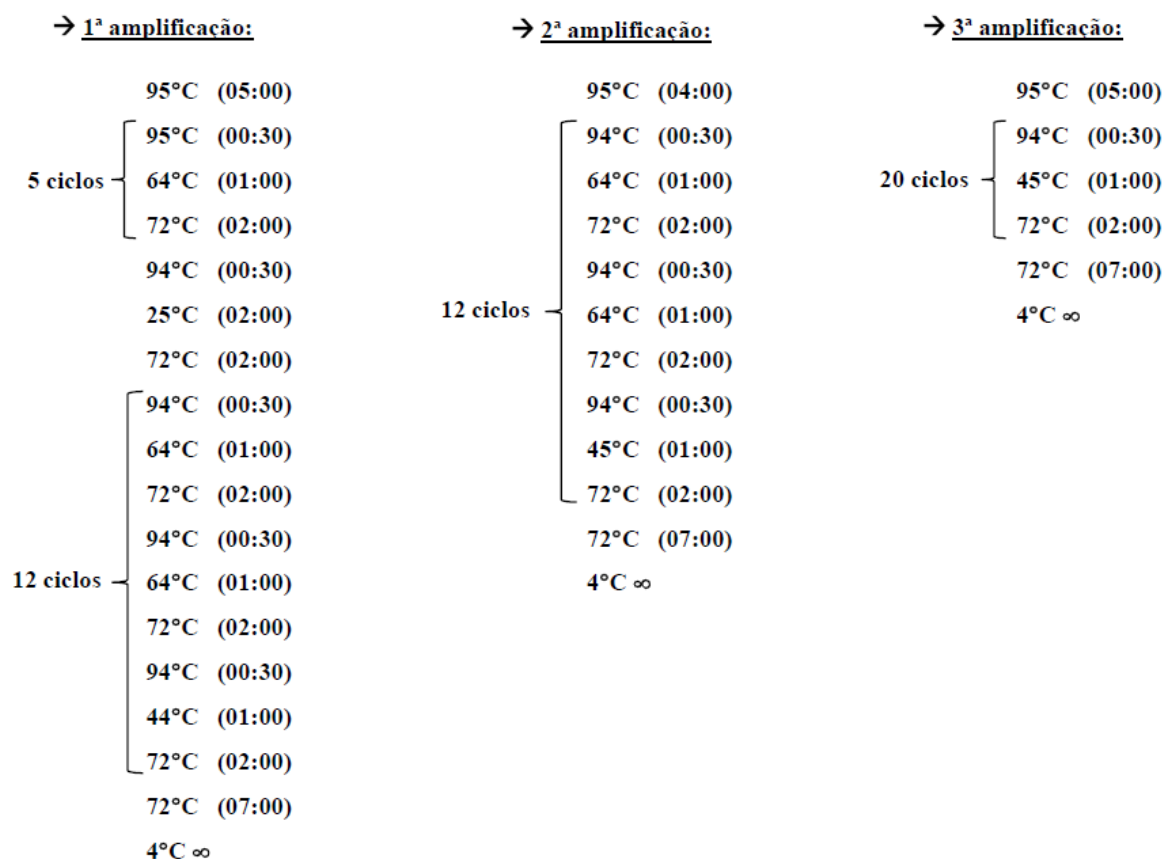
4.2. Amplificação das regiões flanqueadoras do kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma de *Gallus gallus*

A *tp*TAIL PCR (*target-primer Thermal Asymmetric Interlaced* PCR) foi utilizada para obter as seqüência quimeras de kDNA integrado no genoma das aves. Esta técnica é uma inovação (Hecht e cols, 2010) da técnica de TAIL PCR descrita por Liu e Whittier (1995). As condições de temperatura da técnica original foram mantidas, mas, ao contrário da TAIL PCR que utilizava *primers* específicos combinados com *primers* degenerados, na *tp*TAIL-PCR são utilizados apenas *primers* específicos.

No estudo das mutações de kDNA em humanos, Hecht (2008) utilizou *primers* específicos de kDNA combinados com *primers* de regiões conservadas de L1 de diversos organismos. Neste estudo em galinhas, foram utilizados *primers* específicos de kDNA de *T. cruzi* com *primers* específicos para nDNA de *Gallus gallus*. Seguindo trabalhos anteriores do LMPDC (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011; Sousa, 2012), são alternadas altas temperaturas com baixas temperaturas, facilitando o anelamento dos *primers* específicos. Dessa forma, utiliza-se ciclos de alta estringência com ciclos de baixa estringência, ao mesmo tempo em que são realizadas re-amplificações sucessivas dos produtos de PCR com *primers* de kDNA mais internos, permitindo a eliminação dos produtos de baixa especificidade formados no início do processo (Figura 8C). Os *primers* de kDNA utilizados tem suas localizações nas regiões conservadas dos minicírculos de kDNA demonstradas na Figura 8A.

Os *primers* C31 (1 a 6), específicos para nDNA de galinha, foram originados de uma seqüência quimera do clone C31 (FN599618), inserido no *locus* NW_001471673.1 do cromossomo 3 do genoma de *Gallus gallus* (Figura 8B). Este clone C31 foi obtido por *tpTAIL* PCR do galo 9849 (F1), uma ave Ross presente no trabalho de Cardoso (2006), utilizando as condições e os *primers* Gg1 a Gg6 descritos por Teixeira e cols (2011a). Os *primers* de kDNA e de C31 utilizados nesta reação estão apresentados, com suas respectivas temperaturas de anelamento, na Tabela 1.

Na primeira amplificação desta PCR, utiliza-se 200 ng de DNA genômico em uma reação contendo 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM do *primer* de kDNA (S34 ou S67), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum da Invitrogen, juntamente com 1 mM de cada um dos *primers* de C31. Na segunda amplificação, utiliza-se 2 µL do produto da diluição de 1:40 da *tpTAIL* PCR 1 e os *primers* de kDNA S34 e S67 são substituídos, respectivamente, pelos *primers* mais internos S35 e S35as. Na terceira reação, utiliza-se 2 µL da diluição de 1:10 dos produtos da *tpTAIL* PCR 2 e os *primers* de kDNA S35 e S35as são trocados, respectivamente, pelos *primers* mais internos S67as e S36. Os programas utilizados em cada amplificação da *tpTAIL* PCR são os seguintes:



Os produtos obtidos após o 3º ciclo de amplificação estão ilustrados na Figura 8. A validação desta técnica de *tpTAIL* PCR foi feita de duas maneiras: realizou-se uma reação com DNA de uma ave nunca exposta ao *T. cruzi* e uma outra reação com o DNA desta mesma ave, kDNA negativa, adicionando-se 300 pg de kDNA de *T. cruzi* ao mix da reação. As temperaturas e os ciclos de amplificação foram os mesmo utilizados nas aves contendo as integrações de kDNA.

4.2.1 *tpTAIL* PCR adaptada pra genes específicos

A *tpTAIL* PCR amplifica de maneira randômica as regiões flangeadoras do kDNA, possibilitando a identificação de sítios de inserção em diversos cromossomos. Das regiões amplificadas do genoma da galinha nesta investigacao, várias continham regiões gênicas. Dessa forma, foram selecionados dois genes para se desenhar *primers* específicos: o gene do

Esta adaptação da *tpTAIL* foi utilizada nos experimentos de herança vertical dos minicírculos de kDNA dentro de cada família de aves. Após a padronização do experimento, selecionou-se um par de *primers* para cada gene: CNM2 (CM2-s1 e S36); tetraspanina-18 (TTP-as2 e S67as) e distrofina (DG-s3 e S67as). Os *primers* de kDNA foram substituídos por *primers* mais internos nas reações seguintes, conforme descrito para a *tpTAIL* PCR.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR.

Primer	DNA a ser amplificado	Seqüências	T _m *
TCZ1	nDNA de <i>T. cruzi</i>	5' GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3'	67,6
TCZ2	nDNA de <i>T. cruzi</i>	5' CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3'	61,4
S34	kDNA de <i>T. cruzi</i>	5' ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'	57,9
S67	kDNA de <i>T. cruzi</i>	5' GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)T C 3'	60,1
S35	kDNA de <i>T. cruzi</i>	5' ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'	59,4
S36	kDNA de <i>T. cruzi</i>	5' GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'	57,9
C31-1 (s1)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' AGA GAA CTG CTT GAA ACC TAC AGG 3'	56,6
C31-2 (s2)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' GTG AAA GGC CTA TAT CAA GTC AGC 3'	55,5
C31-3 (s3)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CCA AGG AGC TGG TAG AGA GCA 3'	58,5
C31-4 (as1)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CCA CGC TGG GAG AAG AGT T 3'	57,1
C31-5 (as2)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CTC ACT TCC TCC CTT CCC A 3'	56,1
C31-6 (as3)	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' TGC TCT CTA CCA GCT CCT TGG 3'	58,5
CM2-s1	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' ACCATTCTTGTGACTGCCCTG 3'	62,0
CM2-as2	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CACCATTTCATCAGCCCAAAC 3'	63,0
TTP-s1	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' AGCTAACAAAACCCACCAACC 3'	60,0
TTP-as2	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CAATCAGCTCAAATCCTTGGG 3'	62,0
GD-s1	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' TCATTTGTTTGCCTTCCTCG 3'	61,1
GD-s3	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' TTCTAGTCCGCTCCTGTCAA 3'	61,3
GD-as1	nDNA de <i>Gallus gallus</i>	5' CCCTCCTGGCATATCACTCTT 3'	60,5

* **T_m**: temperatura média de anelamento em °C.

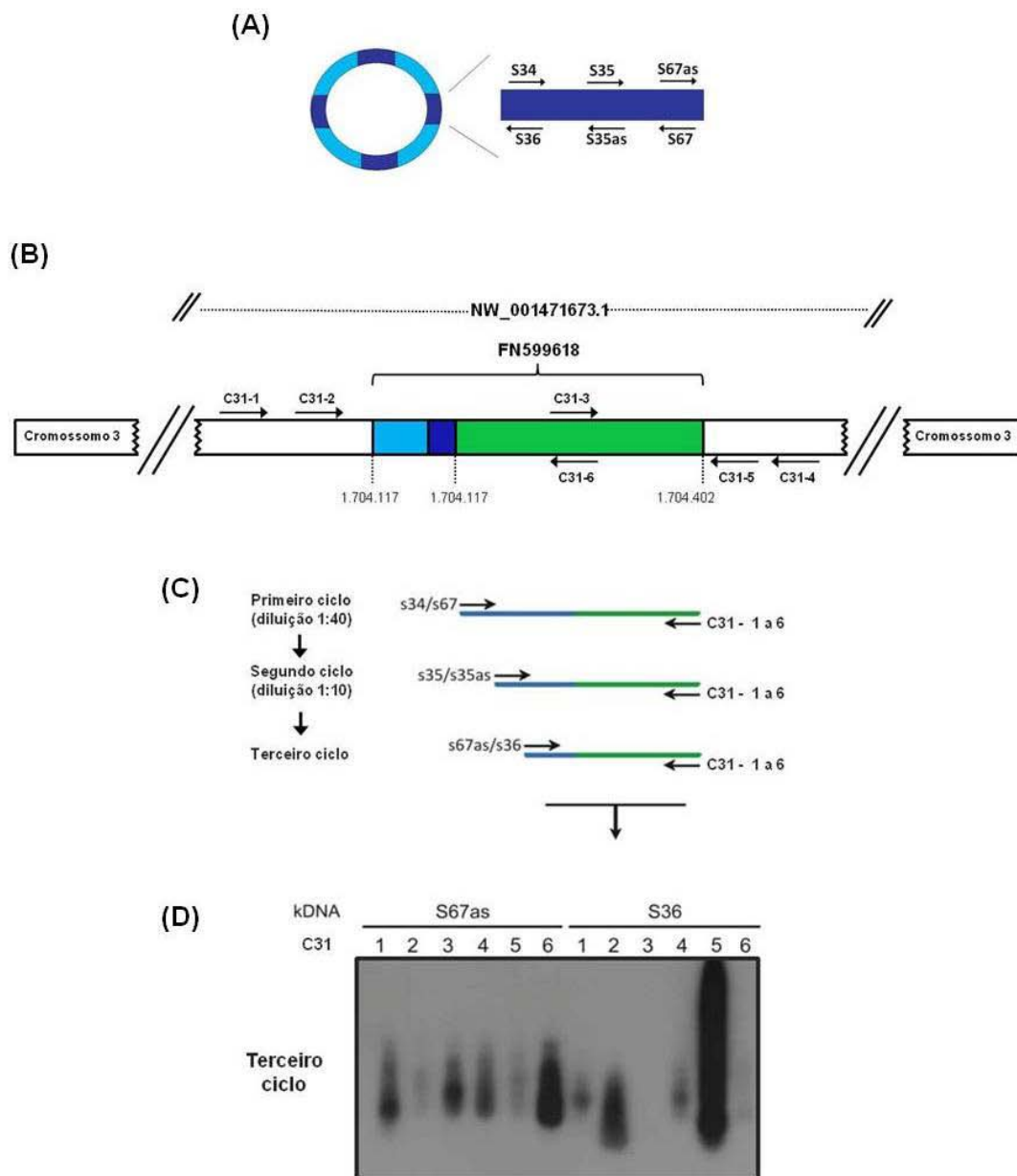


Figura 8. Esquema da *tpTAIL* PCR. A) Estrutura do minicírculo de kDNA com quatro regiões variáveis (azul claro) e quatro regiões conservadas (azul escuro). Destaca-se na região conservada, os seis *primers* deduzidos da fita senso e antisenso que são utilizado na *tpTAIL* PCR. B) Sequência quimera do clone C31 (FN599618), com os *primers* deduzidos. Um fragmento de minicírculo de kDNA, contendo uma região variável e uma região constante, se inseriu no *locus* NW_001471673.1 do cromossomo 3 do genoma de *Gallus gallus* (verde). C) Esquema das amplificações da *tpTAIL* PCR, mostrando os três ciclos de reações, as diluições dos produtos de cada amplificação e os primers utilizados em cada reação. D) Produtos da terceira amplificação da *tpTAIL* PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda específica para kDNA.

4.3. Transferência dos produtos de PCR para membrana de nylon

Os produtos de PCR foram transferidos para membrana de nylon positivamente carregada através do método de transferência alcalina descrita por Sambrook e Russel, 2001. Primeiramente, esses produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1X. Dependendo da PCR, foram utilizados gel a 1,3% (PCR de nDNA e kDNA) ou a 1% (*tpTAIL* PCR). Após a corrida, o gel contendo o DNA foi desnaturado em solução alcalina (NaOH 0,4M) por 20 min. Os *amplicons* presentes no gel foram transferidos por capilaridade para a membrana de nylon (HybondTM-N⁺, Amersham GE Healthcare), utilizando-se a mesma solução alcalina da desnaturação. O processo de transferência ocorria por 8 a 12 h. Após este tempo, as membranas foram secas em estufa de vácuo a 37 °C, para fixação do DNA. A hibridização destas membranas com sondas específicas radiomarcadas ocorreu de acordo com o item 7.

5. *Southern blot* genômico

O experimento de *Southern blot* genômico foi realizado seguindo o método descrito por Sambrook e Russel, 2001. Esse processo inclui duas etapas: a digestão do DNA genômico com enzima de restrição e a transferência do DNA digerido para membrana de nylon. Após estas etapas, as membranas eram hibridizadas com sonda radioativa específica.

5.1. Digestão enzimática do DNA genômico

Na primeira etapa do *Southern blot* genômico, a enzima *EcoRI* (Invitrogen) foi utilizada no processo de digestão enzimática do DNA. Esta enzima possui a capacidade de clivar o kDNA em um único sítio, gerando uma banda linearizada de aproximadamente 1,4 kb. Neste experimento, usou-se 50 µg de DNA genômico, três unidades de enzima por micrograma de DNA, 1/10V de tampão 10x específico para a enzima e 1/100V de BSA, que ficou a 37°C por 12 horas. O produto da digestão foi precipitado com 3 V de etanol 100% gelado e 1/10V de acetato

de sódio 3 M pH 4,7, e deixado a -80 °C por 1 h. Após centrifugação a 14000 rpm por 45 min, o *pellet* obtido foi lavado 2 vezes com etanol 70% gelado. Após seco, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de água Milli-Q e submetido à eletroforese.

A segunda etapa de *Southern blot* foi realizada utilizando enzimas que clivassem o DNA genômico à montante e à jusante de uma inserção de kDNA em um gene específico. Os genes específicos selecionados foram os mesmos utilizados na adaptação da *tpTAIL* PCR. Para digerir os DNAs de aves da família 1, foram utilizadas as enzimas *BglIII* e *PstI* (Fermentas), que clivam o DNA na região do gene da tetraspanina-18, gerando uma banda de ~700 pb. Na digestão do DNA das aves da família 2, usou-se as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (Invitrogen) para clivar o DNA nos *locus* da distrofina, gerando uma banda de ~1000 pb. Os DNAs das aves da família 3 foram clivados com a enzima *SphI* (Fermentas), que gera uma banda de ~700 pb na região do gene do CNNM2. O volume final das reações era de 400 µL, contendo 25 µg de DNA genômico, três unidades de enzima por micrograma de DNA e 1/10V de tampão 10 x específico para a enzima utilizada. A digestão ocorreu a 37 °C por 12 h. Após a digestão, o DNA foi precipitado e ressuscitado em um volume menor (50µL), da mesma forma das amostras digeridas apenas com *EcoRI*.

Além dos DNAs das aves da família, cada *Southern blot* genômico continha ao menos um controle negativo (DNA de uma ave kDNA-negativa), que eram clivado da mesma forma descrita acima. Outro controle utilizado era o DNA do *T. cruzi* digerido com as mesmas enzimas. Esta reação era realizada a 37 °C num volume final 20 µL, contendo 10ng de DNA total do parasita, 10 unidades de enzima e 1/10 V de tampão 10 x, por 12 h.

5.2. Transferência do DNA digerido para membrana de nylon

O DNA genômico digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1X. A corrida ocorria a 4 °C por 16 h, a 48 Volts. Após a corrida, o gel era submetido a uma solução de depuração do DNA (HCl 0,125 M) por 10 min e a duas lavagens de 5 min com água destilada. Em seguida, o DNA presente no gel era desnaturado por 30 min com uma solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M). A partir desse momento, a transferência do DNA para a membrana ocorreu igualmente a dos produtos de PCR, utilizando também a solução de desnaturação. Alterava-se apenas o período de transferência para 24 h.

6. Clonagem dos produtos obtidos por *tpTAIL* PCR

A hibridização com sonda de kDNA de *T. cruzi* dos produtos amplificados no último ciclo da *tpTAIL*-PCR indicou as amostras que continham integração do kDNA, sendo estas selecionadas para clonagem em células competentes.

6.1. Clonagem e transformação em *Escherichia coli* competente

Os produtos selecionados foram inseridos no vetor pGEM T-Easy (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Após a ligação do inserto, os vetores eram transformados em células competentes. As células competentes utilizadas foram preparadas de acordo com o protocolo de cloreto de rubídio (Promega, 1996), sendo usada a linhagem de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene). Depois do processo de transformação, as células foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo 40 µg/mL de X-gal e 100 µg/mL de ampicilina, e incubadas por 12 h a 37 °C. O plaqueamento permitiu que as células competentes fossem selecionadas de duas maneiras: por resistência ao antibiótico e por rompimento do gene da β-galactosidase. No primeiro caso, avalia-se se as células receberam adequadamente os plasmídeos, pois estes vetores possuem gene de resistência à ampicilina, permitindo que as bactérias que foram transformadas cresçam em meio contendo este antibiótico. O segundo caso é utilizado para selecionar células que receberam os vetores que realmente continham insertos: quando o inserto é adicionado ao plasmídeo, o gene da β-galactosidase é rompido e inativado. Dessa forma, essa enzima não consegue processar o seu substrato X-gal, que está presente na placa, originando colônias com coloração branca. Quando o inserto não está inserido, este gene continua ativo, permitindo a codificação da enzima, que age sobre o X-gal, resultando em substrato de coloração azul.

6.2. Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon

Colônias brancas foram selecionadas aleatoriamente e repicadas em uma membrana de nylon sobre meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. As mesmas bactérias eram repicadas diretamente em meio LB sólido semelhante, para criar um espelho da placa. Ambas as placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Após este período, a placa espelho era vedada e

guardada a 4 °C. A membrana era retirada da outra placa e tratada. O tratamento era feito embebendo a membrana em papel filtro contendo solução de lise (SDS 10%) por 10 min, seguida de solução de desnaturação (NaOH 0,4 M) por 10 min e, ao final, SSC 2X por 10 min. As membranas eram secas a 37 °C para fixação do DNA. Posteriormente, estas membranas eram hibridizadas com sonda radiomarcada de kDNA. As colônias com os sinais mais fortes eram selecionadas na placa espelho e inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina, crescendo a 37 °C por 12 h, sob aeração e agitação constante. No caso da seleção das bactérias que continham as ligações de produtos da *tp*TAIL PCR (utilizando *primers* de genes específicos), as membranas eram hibridizadas primeiramente com sonda radiomarcada para o gene específico (CNNM2, tetraspanina-18 ou distrofina). Numa segunda etapa, as membranas eram de-hibridizadas com três lavagens de 10 min a 60 °C com água milliQ fervente e hibridizadas com sonda radiomarcada específica para kDNA. As colônias que apresentavam sinal para ambas as sondas, eram selecionadas e inoculadas para crescimento nas mesmas condições citadas acima.

6.3. Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial das bactérias que cresceram no meio LB líquido foi realizada com a utilização do kit Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Para verificar o tamanho dos insertos, parte do DNA obtido era digerido com enzima *EcoRI* (Invitrogen) a 37 °C por 12 h, seguindo o protocolo do fabricante. O produto desta digestão era analisado em gel de agarose a 1% e os maiores insertos eram selecionados e enviados para seqüenciamento automático na Genomic Engenharia Molecular Ltda (São Paulo – SP).

7. Sondas Radioativas

As diferentes sondas radioativas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 2. Todas as sondas foram marcadas e purificadas de acordo com a descrição abaixo.

7.1. Marcação de sondas radioativas

O kit *Random Primer Labelling System* (Invitrogen) foi utilizado para marcar radioativamente fragmentos de DNA do *T. cruzi* (nDNA e kDNA) e de genes amplificados com os *primers* específicos. Neste procedimento, utilizou-se a enzima *Klenow*, que apresenta atividade de polimerase, *primers* randômicos e um dATP radiomarcado [α - 32 P]. Dessa forma, quando a fita de DNA é sintetizada, são inseridos dATPs radiomarcados na seqüência. Seguindo o protocolo do fabricante, são usados na reação 30 ng de DNA com volume final ~~de~~ 25 μ L completado com água Milli-Q. Este DNA é desnaturado a 100 °C por 10 min e imediatamente incubado em gelo, sendo adicionados 2 μ L de dCTP, 2 μ L de dGTP, 2 μ L de dTTP, 15 μ L de tampão, 5 μ L de [α - 32 P] dATP (30 000 μ Ci) e 1 μ L da enzima *Klenow*. A reação ocorreu a temperatura ambiente por um período de, no mínimo, três horas e foi finalizada com a adição de 5 μ L de tampão de parada.

7.2. Purificação de sondas radioativas

Colunas de Sephadex G50 com lã de vidro foram utilizadas para purificar as sondas radiomarcadas, seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel, 2001. A incorporação radioativa era medida por cintilografia e as sondas utilizadas respeitavam o limite de concentração de 1 a 2×10^6 cpm por mL de solução de hibridização. As atividades específicas exigidas deveriam ser iguais ou maiores que 10^8 cpm/ μ g de DNA.

7.3. Hibridização com sondas radioativas

As membranas contendo o DNA transferido eram bloqueadas a 65 °C por 2 h com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SDS 7%, SSPE 1,5% e 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmão). Após este período, as sondas radiomarcadas eram desnaturadas (100 °C por 10 min) e adicionadas à solução de pré-hibridização. As sondas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 2. O processo de hibridização ocorria a 65 °C por 12 h. Então, as membranas eram lavadas com graus crescentes de estrigência para a remoção da sonda ligada de forma inespecífica à membrana. Primeiro, foram realizadas duas lavagens a 60 °C por 15 min com

solução de SSC 2X / 0,1% SDS. Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens a 60 °C por 15 min, mas com solução de SSC 0,1X / 0,1% SDS. No caso das membranas de *Southern blot* genômico, esta última etapa de lavagem era alterada, sendo realizada apenas uma lavagem a 60 °C por 15 minutos com solução de SSC 0,1X / 0,1% SDS. Todas estas etapas foram feitas com a membrana dentro de um cilindro de vidro em constante movimento circulatório em forno de hibridização.

Imediatamente após as lavagens, as membranas úmidas eram revestidas com filme plástico de PVC e colocadas em um cassete metálico, para exposição a filme sensível a raios X (Kodak T-MAT) a -80 °C. O tempo de exposição dependia do DNA presente na membrana, variando de até sete dias para produtos de PCR ou colônias transformantes e de até quinze dias para DNA genômico. A revelação dos filmes foi realizada em sala escura com soluções comerciais de revelação e fixação da Kodak.

Tabela 2. Sondas radioamarcadas. Descrição das sondas radioativas utilizadas na hibridização de membranas de nylon contendo DNAs transferidos.

Sonda	Descrição
kDNA	Produto de PCR de DNA de <i>T. cruzi</i> amplificado com primers S35/S36 (~330 pb) separado em gel de agarose, cortado e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
TCZ	Produto de PCR de DNA de <i>T. cruzi</i> amplificado com primers TCZ1/TCZ2 (~188 pb) separado em gel de agarose, cortado e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
CNNM2	Produto de PCR de DNA de <i>Gallus gallus</i> amplificado com primers CM2-s1/CM2-as2 (~800 pb) e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
Tetraspanina-18	Produto de PCR de DNA de <i>Gallus gallus</i> amplificado com primers TTP-s1/TTP-as2 (~700 pb) e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
Distrofina	Produto de PCR de DNA de <i>Gallus gallus</i> amplificado com primers GD-s1/GD-as1 (~1000 pb) e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

8. Análise em bancos de dados

8.1. Análises de seqüências quimeras

No seqüenciamento automático, foram utilizados os *primers* T7 e SP6 para amplificação das seqüências. A análise das seqüências obtidas foi realizada pelo algoritmo BLASTn, disponível no site do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta análise comparava a similaridade das seqüências de nucleotídeos obtidas dos fragmentos de DNA clonados com seqüências de *Gallus gallus* e de *T. cruzi* depositadas no GenBank/NCBI. Os parâmetros utilizados para seqüências de *T. cruzi* eram *Database – Others* (Nucleotide collection) e *Somewhat similar sequences*. Os parâmetros para seqüências de galinha eram *Database – Gallus gallus (Genome reference only)* e *Somewhat similar sequences*. Os resultados selecionados deveriam apresentar *E-value* e identidade significativos ($E\text{-value} \leq 10^{-3}$ e Identidade $\geq 70\%$). Todas as seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson, 1994) e o Geneious 4.8.5 como gerenciador, eliminando-se seqüências repetidas de uma mesma ave.

8.2. Análise de ORFs quimeras putativas

A identificação de potenciais ORFs quimeras foi realizada no programa Geneious 4.8.5. Os parâmetros utilizados nessa dedução das ORFs quimeras foram: código genético padrão; mínimo de 100 nucleotídeos; seqüências diretas ou complementares em qualquer dos *frames* “1, 2, 3, -1, -2, ou -3”. As ORFs foram traduzidas em suas respectivas seqüências de aminoácidos e submetidas à análise em lote por meio do algoritmo blastp (UGENE v1.11.1). Os *hits* com melhores escores e com maiores identidades foram selecionados.

8.3. Análise de elementos repetitivos

As seqüências obtidas também foram avaliadas quanto à presença de elementos repetitivos de *G. gallus*. Utilizou-se o *repeat masker* CENSOR (Kohany e cols, 2006) para o

mapeamento e a identificação de elementos repetitivos, através do *site* do CENSOR-GIRI (*Genetic Information Research Institute* - <http://www.girinst.org>).

9. Análises histológicas

Os tecidos obtidos do coração das aves foram conservados através do processo de fixação em formol a 10% tamponado. A desidratação dos tecidos foi realizada por banhos sucessivos de 30 min em teor crescente de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%). Após este tratamento, foram diafanizados em xilol por três banhos consecutivos de 30 min e, ao final, incluídos em parafina fundida. Os cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura foram realizados em micrótomo de rotação Spencer (American Optical Company). Estes cortes foram desparafinizados em três banhos sucessivos de 5 min em xilol e desidratados com banhos de 2 min em soluções alcoólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100%). Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina por 10 min, lavados em água corrente e diferenciados em álcool acidulado. Após mais uma lavagem com água corrente, os cortes foram corados com eosina durante 5 min. Para a retirada da água proveniente dos corantes, uma nova desidratação foi realizada com banhos sucessivos de 5 min em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan® e examinadas por microscopia óptica e confocal. A seleção da área de análise foi capturada com micro-câmera JVC TK-1270/RGB, utilizando o programa KS300 e o analisador de imagem Kontron elektronik/Carl Zeiss.

IV. RESULTADOS

1. Identificação de TGH e TGV das mutações de minicírculos de kDNA no genoma de *Gallus gallus*

A presença do kDNA no genoma das aves foi detectada através de PCR específica para identificação do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, descrita por Sturm e cols (1989). Foram utilizados os *primers* S35 e S36, que geram fragmentos de 330 pb e seus catâmeros (Figura 9A). Das aves presentes nas famílias, apenas três não apresentam mutações de kDNA, sendo estas aves nascidas de ovos não inoculados com *T. cruzi*. A ausência do *T. cruzi* em todas as aves estudadas foi demonstrada através de PCR específica para nDNA do parasito, que gera amplificações de regiões repetitivas presentes em seu genoma (Moser e cols, 1989; Virreira e cols, 2003). Os *primers* utilizados nessa PCR (TCZ 1 e 2) geram fragmentos de 188 pb e seus catâmeros (Figura 9B). As especificidades dos produtos das PCRs de kDNA e nDNA foram confirmadas com sondas específicas para estas seqüências.

O presente estudo foi conduzido em 81 aves, separadas em três famílias. A família 1 apresentava um parental F0 macho kDNA-positivo e uma fêmea kDNA-negativa, que foram cruzados por inseminação artificial, gerando as gerações F1 e F2 (Figura 10). A família 2 possuía ambos os parentais F0 kDNA-positivos e foram cruzados, gerando as gerações F1, F2 e F3 (figura 11). A família 3 era constituída por dois parentais F0 machos kDNA-negativos e dois parentais F0 fêmeas kDNA-positivas, que no cruzamento geraram também as gerações F1, F2 e F3 (figura 12). Nota-se que todos os animais presentes nas progênies (F1, F2, F3) das três famílias estudadas eram kDNA-positivas.

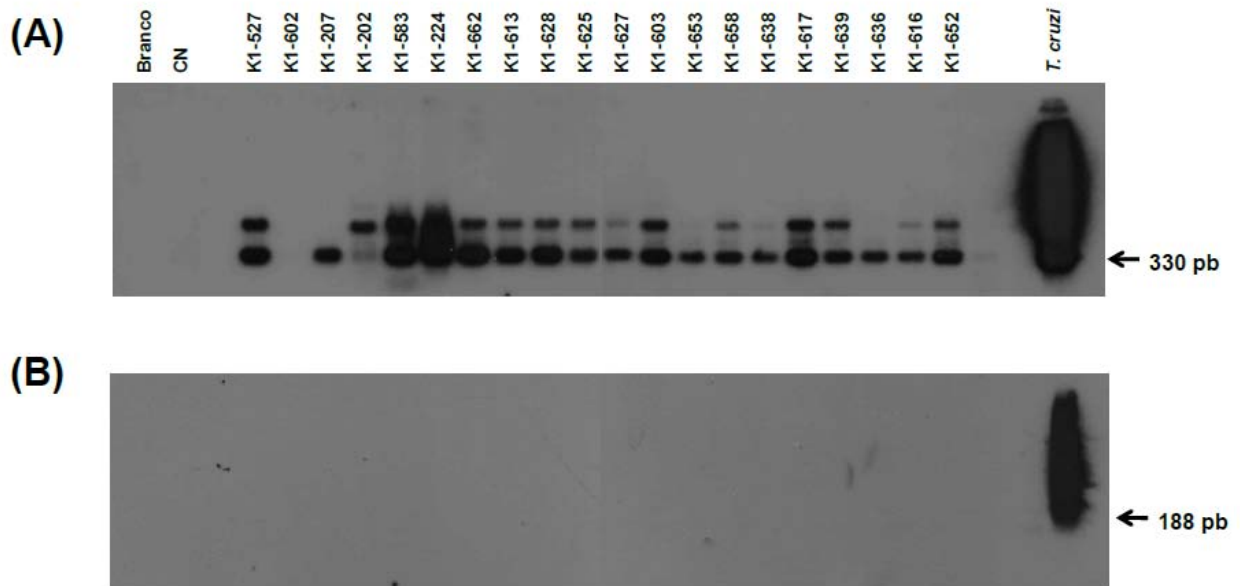


Figura 9. Southern blot de produtos de kDNA e nDNA amplificados por PCR e hibridizados com sondas específicas. A) Resultado da PCR de kDNA (*primers* S35/S36) mostrando a presença da banda específica de 330 pb e seus catâmeros. **B)** Resultado da PCR de nDNA (*primers* TCZ1/TCZ2) mostrando a presença da banda específica de 188 pb. Para exemplificar estas PCRs, estão demonstrados os resultados das aves da família 1. CN, controle negativo.

A presença das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma das aves F0 das três famílias estudadas demonstra a ocorrência de transferência gênica horizontal (TGH), pois as aves positivas da geração F0 nasceram dos ovos inoculados com o parasito. Os cruzamentos revelaram que as mutações de kDNA foram transferidas verticalmente para as progênies devido à ocorrência de transferência gênica vertical (TGV), conforme ilustrado nos heredogramas das três famílias (Figuras 10, 11 e 12). Esta transferência vertical de kDNA ocorreu para a progênie através das células germinativas que carregam as mutações de kDNA.

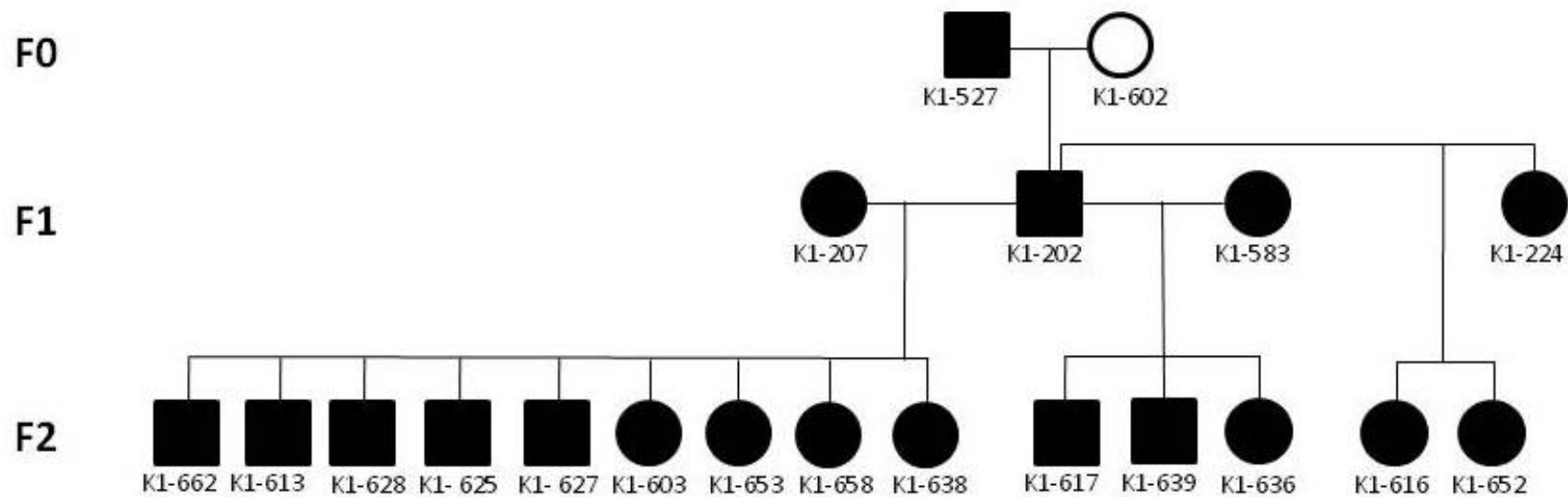


Figura 10. Heredograma da família 1. Esta família apresenta uma geração F0 composta por um macho (quadrado) com as mutações de kDNA, nascido de ovo inoculado com *T. cruzi*, e uma fêmea (círculo) negativa. As demais gerações foram obtidas por inseminação artificial. O quadrado preto representa as aves kDNA-positivas, enquanto que o círculo branco representa a galinha kDNA-negativa. Todas as aves apresentaram PCR negativa para nDNA.

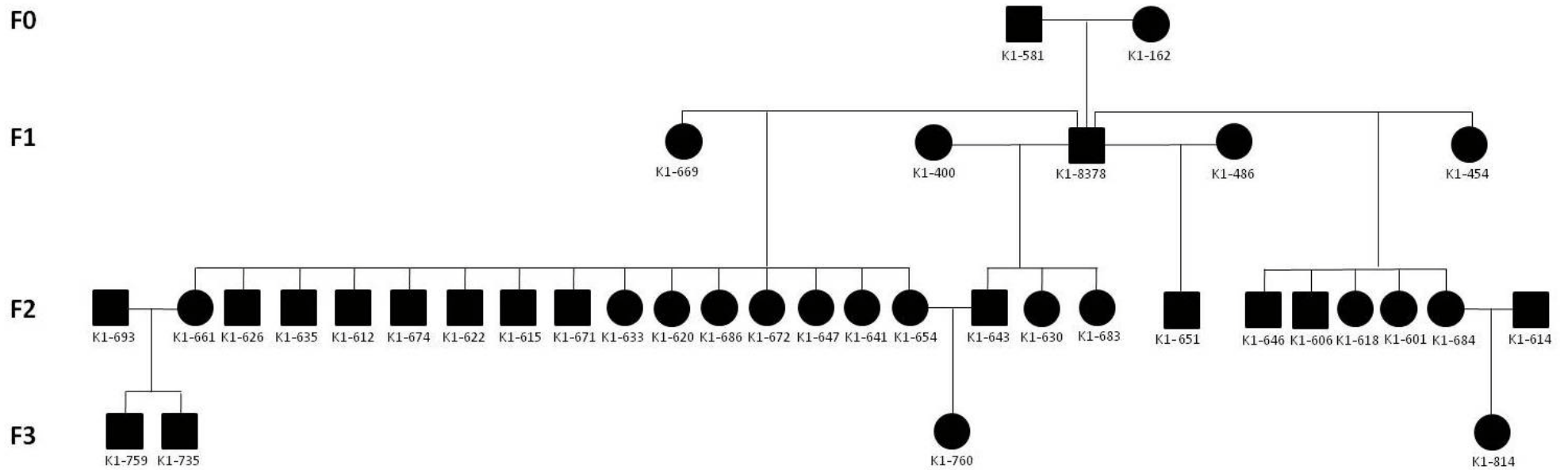


Figura 11. Heredograma da família 2. Esta família apresenta uma geração F0 composta por macho (quadrado preto) e fêmea (círculo preto) nascidos de ovos inoculados com *T. cruzi* tem as mutações de kDNA. As demais gerações foram obtidas por inseminação artificial. Todas as aves foram positivas pela PCR com primers de kDNA e foram negativas pela PCR com primers de nDNA.

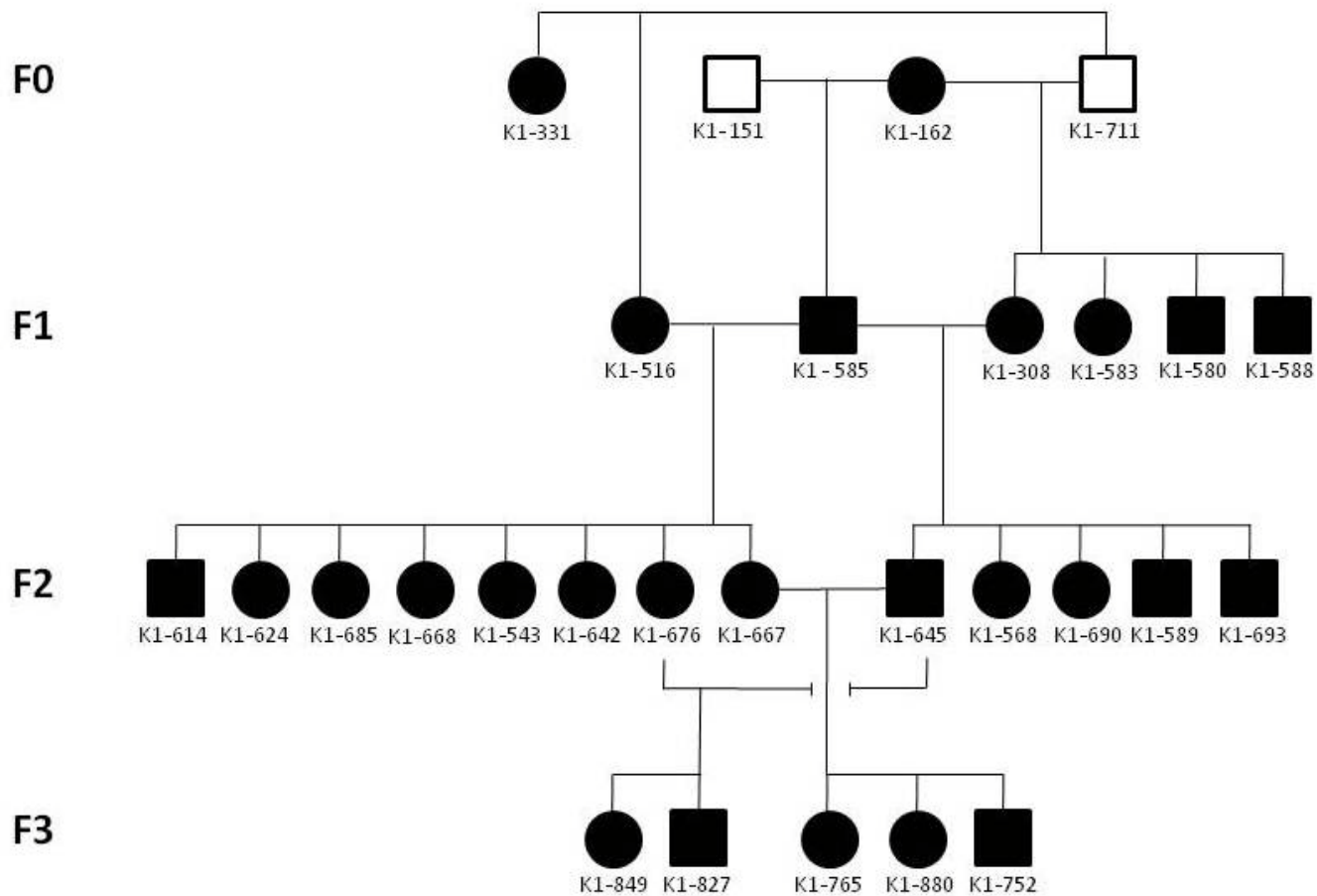


Figura 12. Heredograma da família 3. Geração F0 composta por duas fêmeas (círculo preto) com as mutações de kDNA, nascidas de ovo inoculado com *T. cruzi*, e dois machos (quadrado branco) negativos. As demais gerações foram obtidas por inseminação artificial. Todas as aves apresentaram PCR positiva para kDNA e negativa para nDNA.

2. Análise da integração de kDNA no genoma de *Gallus gallus*

A análise das seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma das aves foi feita com auxílio das técnicas *tpTAIL* PCR e *Southern blot* genômico. A *tpTAIL* PCR foi utilizada para mapear randomicamente regiões do genoma hospedeiro que flanqueavam seqüências de kDNA, visto que a técnica combina *primers* de região conservada de minicírculos com *primers* de DNA hospedeiro. Já a técnica de *Southern blot* permite identificar bandas de integração de kDNA no genoma hospedeiro clivado com enzimas de restrição e submetido a eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda específica radiomarcada.

2.1. *tpTAIL* PCR (*target-primer Thermal Asymmetric Interlaced* PCR)

Nas análises de integração de kDNA em humanos, verificou-se que a grande maioria das integrações estavam associadas a elementos L1, sendo utilizados, na *tpTAIL* PCR, *primers* específicos de kDNA combinados com *primers* de regiões conservadas deste elemento (Hecht e cols, 2010). Neste estudo, combinou-se os *primers* de kDNA com *primers* obtidos da região flanqueadora do clone C31 (FN599618), o qual corresponde a um elemento LTR Hitchcock do cromossomo 3 da galinha.

Esta técnica de amplificação das regiões flanqueadoras às mutações de kDNA foi realizada em aves kDNA-positivas selecionadas aleatoriamente das diferentes gerações das três famílias estudadas. As amplificações foram realizadas, com sucesso, em 36 aves kDNA-positivas das 81 aves do estudo, sendo 4 aves F0, 12 aves F1, 17 aves F2 e 3 aves F3. Os clones enviados para seqüenciamento automático foram obtidos pela clonagem dos produtos finais da *tpTAIL* PCR que apresentavam os sinais mais fortes na hibridização com sonda específica de kDNA. Estas hibridizações estão ilustradas na Figura 13.

A técnica de *tpTAIL* PCR foi validada pelo seqüenciamento dos *amplicons* de uma ave nunca exposta ao *T. cruzi*, cujos clones contêm apenas o DNA da galinha. Nas reações de validação o DNA desta mesma ave kDNA negativa foi misturado com 300 pg de kDNA de *T. cruzi* e os clones obtidos pela PCR com *primers* S35/S36 revelou apenas kDNA ou apenas DNA de galinha. Como esperado, os clones obtidos nos experimentos de validação não apresentaram

seqüências quimeras. Desta forma, quimeras kDNA-DNA hospedeiro obtidas do genoma das aves F0, nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, e das progênes F1, F2 e F3 obtidas por inseminação artificial, não podem estar sujeitas a especulação de contaminação.

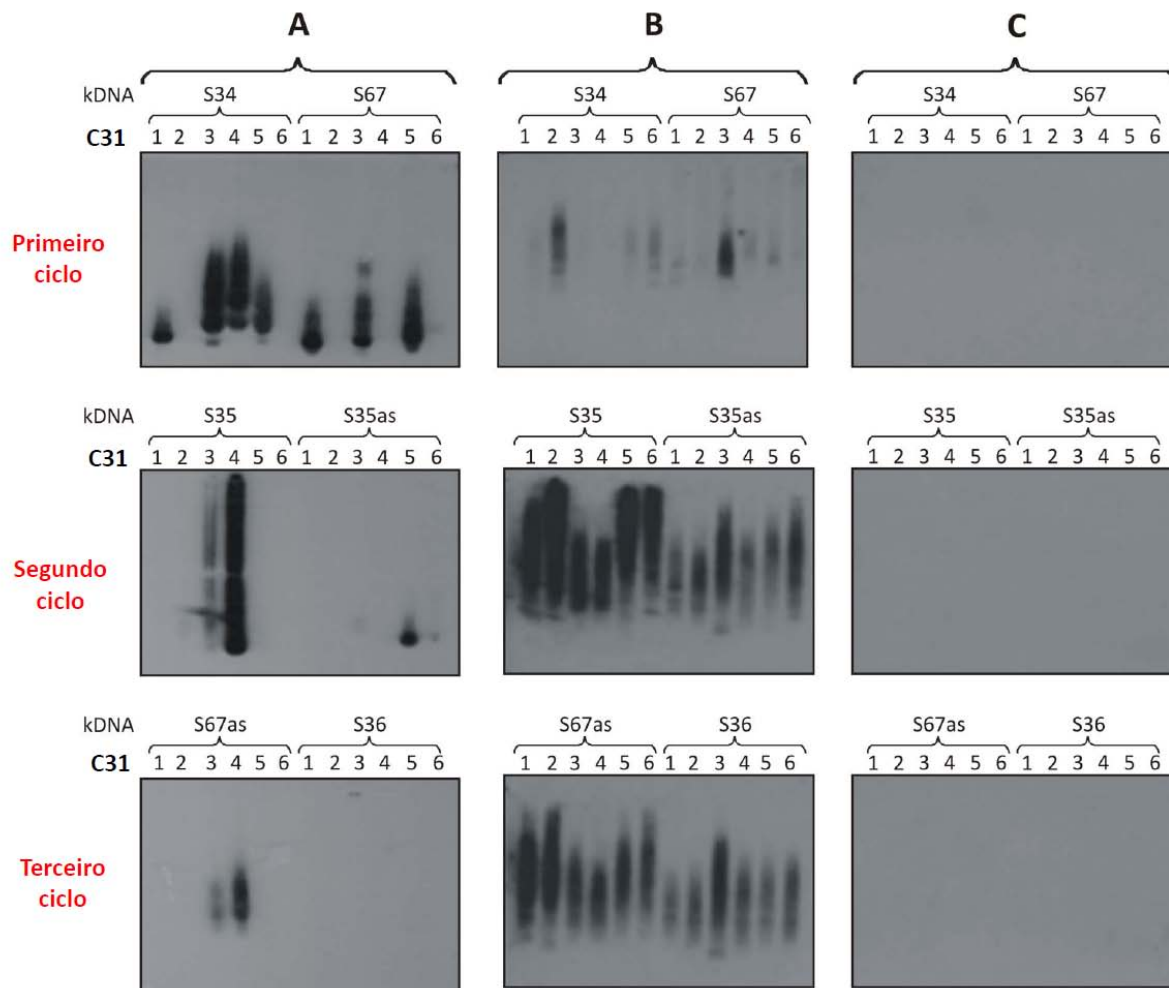


Figura 13. Produtos da *tpTAIL* PCR. Separação eletroforética e posterior hibridização com sonda específicas dos produtos dos três ciclos da *tpTAIL* PCR em: **A)** DNA de Ave F0 kDNA-positiva, **B)** DNA de ave controle (kDNA-negativa) misturado com 300 pg de minicírculos de kDNA. **C)** DNA genômico de ave controle. Os resultados do experimento B mostraram apenas amplificações de minicírculos de kDNA ou DNA de galinha; quimera kDNA-DNA hospedeiro não foi encontrada nos clones seqüenciados. Os resultados do experimento C foram negativos.

Os clones provenientes da *tpTAIL* PCR utilizando os *primers* C31 foram chamados de clones MG. No total, foram obtidos 558 clones (MG1 a MG558). A análise BLASTn identificou 41 clones que apresentavam somente DNA de galinha, 154 apresentavam somente kDNA, 8

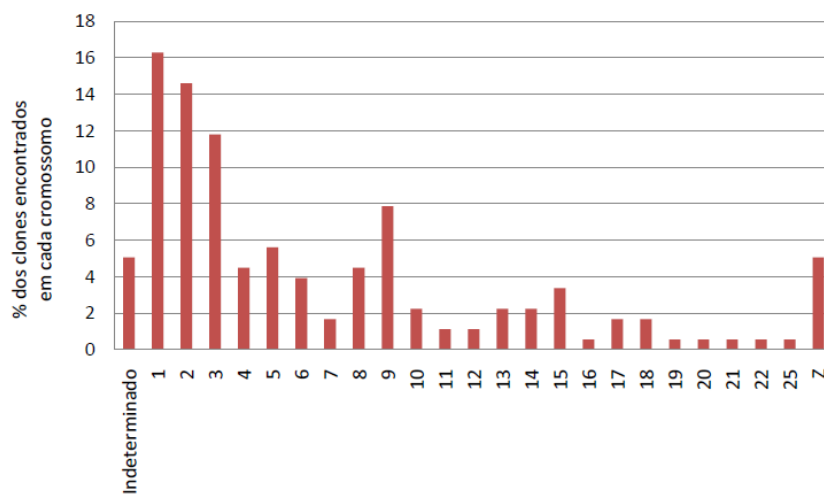
apresentavam apenas o vetor e 103 apresentavam seqüências de baixa qualidade, isto é, clones com erros de sequenciamento. Restaram 252 clones que tinham seqüências quimeras de kDNA e regiões flanqueadoras de DNA de galinha, mostrando que a técnica obteve um rendimento de aproximadamente 55%. Esse rendimento foi quase similar ao rendimento de 58% obtido no trabalho com humanos (Hecht e cols, 2010). Estes clones analisados pelo algoritmo BLASTn tiveram *E-values* significativos. Destaca-se que essas diferenças devem ser explicadas pela origem diferente do DNA, mas também se deve considerar que os pares de *primers* usados no trabalho de Hecht e cols. (2010) tinham como moldes L1s humanos, enquanto que neste trabalho foram usados *primers* derivados de uma região de elemento transponível Hitchcock do cromossomo 3 de *G. gallus*. De interesse, os primers de *G. gallus* anelam parcialmente em regiões diferentes de diversos cromossomos.

O alinhamento das seqüências dos 252 clones quimeras revelou clones redundantes para a mesma ave. Uma análise subtrativa reduziu para 175 o total de clones obtidos das 36 aves analisadas. As seqüências que estão representadas na Tabela A1 (Anexo I) serão disponibilizadas no NCBI. Algumas dessas seqüências são normalmente longas, com até 1479 nts. Estas seqüências longas permitiram uma análise eficiente no BLASTn, com *E-values* e identidades significativos, 30 das quais com *E-value* igual a zero.

2.1.1. Características das regiões flanqueadoras aos minicírculos de kDNA inseridos no genoma de *Gallus gallus*

Estes 175 clones apresentaram 178 eventos de integração em cromossomos e *contigs*, já que em três casos observam-se seqüências contendo dois *loci* diferentes do genoma. Foram obtidos clones em 23 dos 38 autossomos da galinha e no cromossomo sexual Z. O maior número de integrações foi encontrado no cromossomo 1. Os macro-cromossomos (1 a 5), junto como cromossomo Z, representaram 58% dos sítios de integração encontrados neste trabalho. Também foram obtidas algumas inserções de kDNA em regiões de cromossomos ainda indeterminados (Figura 14A). A Figura 14B ilustra a distribuição dos sítios de integração dos clones obtidos no genoma da galinha, mostrando que 38,8% das regiões flanqueadoras correspondem a seqüências de genes e 3,9% apresentam seqüências de proteínas hipotéticas. Porém, a grande maioria (57,3%) das seqüências corresponde a *loci* não caracterizados do genoma da galinha.

(A)



(B)

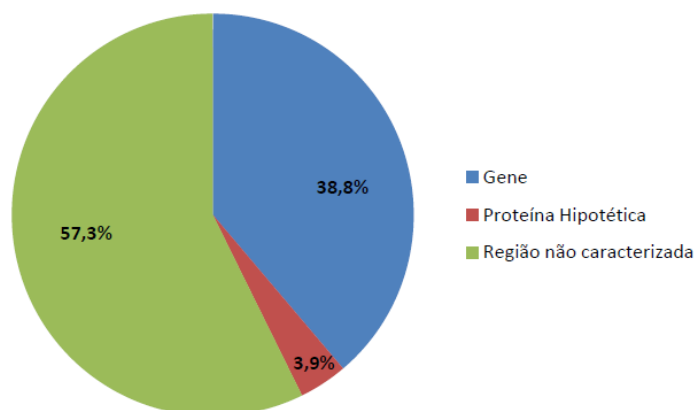


Figura 14. Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma das aves. (A) Distribuição dos clones encontrados nos diversos cromossomos da galinha. (B) Caracterização das regiões flangeadoras ao inserto de kDNA.

Nas figuras 15 e 16, estão exemplificadas algumas das 175 seqüências analisadas. Algumas seqüências apresentavam regiões flangeadoras truncadas de genes reconhecidos

(Figura 15), onde se observa o minicírculo de kDNA inserido em um gene similar ao SCDGF-B, que codifica o fator de crescimento B derivado da medula espinhal.

(A)

	S67 rev					
1	<u>GACGGCCCT</u>	<u>CCCAAACCA</u>	AACCTTCAGG	ATTTTCAAAC	CCCAAATTTT	ATKATCAAAT
61	AACACACATA	ACCCAACACA	CCATTACACC	TCCACACCAT	TACACACTCA	AACCCCAAAT
121	GAATACAGTT	AAC ^{TA} ACTTT	AATAACGGTT	ATACACAGTA	TACACAAC ^{TT}	ACACAAACTG
181	ATAACACGAA	TCTACCAAAT	AATCACACAA	C ^{TT} TATCAATA	GGTTATTACA	TAAT ^{TAA} ACT
241	CACAATCTTA	CTGCCCTAT	AT <u>TACACCAA</u>	<u>CCCCAATCGA</u>	<u>ACCAAACATA</u>	CCATCTTCCA
301	ACAAATAACG	ACCAACAAAT	AAC ^T TGTGATG	CACAT ^T GACA	AGCC ^T GCCAG	CTCCGCAGTA
361	CAAATAGAAA	ATATAATGTA	CGGGGGAGAT	GCAGTAGAAA	T ^T TCGAGTAA	TAGCACTGAC
421	AGGAAAGATA	C ^T TTTGTATC	CCGTGAAACT	AAAAT ^T GTGT	T ^T TAAGAAAT	ATAGAACAAA
481	TAAATAACGT	AGAAAGTCTT	<u>TGCTCTCTAC</u>	<u>CAGCTCCTTG</u>	<u>G</u>	

C31-6

(B)

ref|NW_001471554.1|Ggal WGA51.2 D Gallus gallus chromosome 1 genomic contig, reference assembly (based on Gallus_gallus-2.1)
 Features in this part of subject sequence: similar to spinal cord-derived growth factor-B
 Score = 405 bits(448), Expect = 5e⁻¹¹¹, Identities = 237/245(96%), Gaps = 1/245(0%)

gb|AY237306.1| Gallus gallus clone 43 integrated Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA sequence and flanking region
 Score = 488 bits (540), Expect = 1e⁻¹³⁴, Identities = 274/278(98%), Gaps = 0/278(0%)

Figura 15. Evento de integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* em região codante do genoma da galinha. A) O clone MG158 da ave K1-617 (geração F2, família 1) ilustra a entrada do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) no locus NW_001471554.1 do cromossomo 1 (verde), que compreende a região codificadora do fator de crescimento B derivado da medula espinhal (SCDGF-B). Os primers utilizados na terceira *tpTAIL* PCR encontram-se sublinhados e a região de micro-homologia está destacada em amarelo. B) Resultado da análise no BLASTn.

Os clones presentes neste trabalho apresentam regiões de micro-homologia ricas em A/C nas junções do kDNA com o DNA do hospedeiro (tabela A1, anexo I). Na figura 15, podemos verificar a presença desta região de micro-homologia destacada em amarelo. A micro-homologia corresponde ao compartilhamento de trechos de DNA provenientes de fontes distintas, reconhecidas em bases de dados de nucleotídeos por comparação. O banco de kDNA de *T. cruzi* não compreende toda a variabilidade das seqüências existentes, sendo possível que as micro-homologias sejam maiores que as encontradas. Essas regiões de compartilhamento podem estar envolvidas no processo integração do kDNA no genoma do hospedeiro. Trabalhos anteriores

sugerem um mecanismo padrão de integração do kDNA via reparo de DNA mediado por micro-homologia (MMEJ, do inglês *microhomology mediated end joining*). Esses casos já foram descritos em humanos (Hecht e cols, 2010), em aves (Teixeira e cols, 2011a) e em camundongos (Sousa, 2012). Essas micro-homologias correspondem a seqüências encontradas nos blocos conservados (CSBs) dos minicírculos de kDNA. Nas seqüências dos clones MG, os trechos compartilhando micro-homologias possuíam em média 14 ± 6 nts, com a maior delas tendo 29 nts.

(A)

C31-2

1	<u>GTGAAAGGCC</u>	<u>TATATCAAGT</u>	<u>CAGCACGAGA</u>	<u>CAGCCCAAGT</u>	<u>CAGCAGGACT</u>	<u>CGGGGCTGCT</u>
61	<u>GAGTTTTGGT</u>	<u>AGGCATTAAT</u>	<u>GGCACATAAT</u>	<u>GTACGGGGGA</u>	<u>GATGCAGACC</u>	<u>TAGTCTGTAG</u>
121	<u>AAAGGATTAC</u>	<u>TCCATTTTGG</u>	<u>TCATTCAAAT</u>	<u>TATTATAGCA</u>	<u>TTTTTCTTAC</u>	<u>AGAAAGCATT</u>
181	<u>TCTATCCATC</u>	<u>TTTTCTACTG</u>	<u>TCAAACAGAA</u>	<u>AATGTGTGGG</u>	<u>AACTTCTTAA</u>	<u>TCTACATTTG</u>
241	<u>GATAAAGGCA</u>	<u>AAGACACACA</u>	<u>GGTTATGTAA</u>	<u>TTTCCTGTGC</u>	<u>CAAGTGGGAG</u>	<u>CTGCCTCTAG</u>
301	<u>GCTTCCCTTA</u>	<u>CAATGAGCAG</u>	<u>GAGGTTATCC</u>	<u>TTCAGCCAGG</u>	<u>GGCTGTGCAC</u>	<u>GGCACTACCT</u>
361	<u>TGAAGCCCCC</u>	<u>TCCCAAAACC</u>	<u>ACAAATTCCTC</u>	<u>AAAATTTTAT</u>	<u>ACCAC TAAT T</u>	<u>TTAGCAACAA</u>
421	<u>CACTTACTAC</u>	<u>CACACACAAC</u>	<u>ACACCATTC</u>	<u>GATACCACAC</u>	<u>CATTATAACAT</u>	<u>TCTATAATAT</u>
481	<u>ACTCATAATA</u>	<u>AATATACATA</u>	<u>CTCTACTTAC</u>	<u>AACATTTACT</u>	<u>ATTCAAACAT</u>	<u>TTCACCTCTA</u>
541	<u>TCAATGTGCA</u>	<u>CATAACACAT</u>	<u>TCATATACTA</u>	<u>CCACACAATT</u>	<u>ACAAAAATCC</u>	<u>AATAAACTAC</u>
601	<u>TTTATACTGT</u>	<u>ACACCTCTAC</u>	<u>TGCCCTATAT</u>	<u>TACACCAACC</u>	<u>CCAATCGAAC</u>	<u>C</u>

S36

(B)

ref|NW_001471461.1|Gga15_WGA209_2 D Gallus gallus chromosome 15 genomic contig, reference assembly (based on Gallus_gallus-2.1. Score = 147 bits(162), Expect = $3e^{-33}$, Identities = 88/91(96%), Gaps = 1/91(1%)

ref|NW_001471646.1|Gga2_WGA73_2 D Gallus gallus chromosome 2 genomic contig, reference assembly (based on Gallus_gallus-2.1) Score = 471 bits(522), Expect = $6e^{-131}$, Identities = 269/274(98%), Gaps = 0/274(0%)

dbj|AB434519.1| Trypanosoma cruzi kinetoplast DNA, kinetoplast minicircle hypervariable region, isolate: HUU 032-4 Score = 59.0 bits(64), Expect = $3e^{-05}$, Identities = 117/166(70%), Gaps = 12/166(7%)

Figura 16. Evento de integração de minicírculo e hitchhiking de kDNA de *T. cruzi* no genoma de *Gallus gallus*. A) O clone MG002, da ave K1-516 (geração F1, família 1) ilustra a entrada do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) no locus NW_001471461.1 do cromossomo 15 (vermelho), associado a uma seqüência do locus NW_001471646.1 do cromossomo 2 (verde). Os primers utilizados na terceira tpTAIL PCR encontram-se sublinhados e a região de micro-homologia está destacada em amarelo. B) Resultado da análise no BLASTn.

Estudos anteriores do LMPDC relataram que as mutações induzidas por transferência lateral e vertical de kDNA podem acontecer sob recombinação tipo-mosaico envolvendo duas ou mais seqüências de DNA de diferentes *loci*. Neste estudo foram encontradas seqüências quimeras com trechos de minicírculos de kDNA com fragmentos de DNA hospedeiro de tamanhos variados que procederam de diferentes cromossomos. Cada fragmento de seqüência foi carregado de *locus* distante pela atividade *hitchhiking* de retroelemento (Simões-Barbosa, 2006) ou pela própria mobilização da seqüência de kDNA por recombinação via micro-homologia (Hecht e cols, 2010). Um estudo com macrófagos humanos com mutações de kDNA relatou a inserção de uma seqüência de kDNA inicialmente em um L1 no cromossomo 4, a qual se realocou no *locus* da proteína p15 no cromossomo 5, levando consigo o elemento L1 (Simões-Barbosa e cols, 2006). Em nossos clones, foram identificados três casos de *hitchhiking*, como o exemplificado na Figura 16.

O achado sugere que a inserção de kDNA teria ocorrido primeiro no cromossomo 2 e, ao se realocar para o cromossomo 15, levou consigo um fragmento de quase 300 pb do cromossomo 2. Na análise pelo CENSOR, não foram identificados retroelementos nestas seqüências de DNA de galinha. Acredita-se que as microhomologias na própria seqüência de kDNA possam se recombinar com seqüências do DNA hospedeiro, podendo ocorrer recombinação e translocação de seqüências durante a divisão celular.

2.1.2. Elementos repetitivos presentes nas regiões flanqueadoras

A observação de que 57,3% das seqüências quimeras continham regiões não caracterizadas do genoma, isto é, regiões indeterminadas, levou-nos a considerar que tais regiões poderiam representar retroelementos. Ao contrário da base de dados de DNA humano, o BLASTn de *G. gallus* fornece pouca ou quase nenhuma informação sobre seqüências de retroelementos de galinhas. Como os bancos de dados sobre retroelementos em aves não estão ligados ao BLASTn, realizou-se um cruzamento dos dados do algoritmo BLASTn com os dados da *Rebase* do CENSOR-GIRI. Como esperado, uma alta porcentagem (41%) das regiões flanqueadoras ao kDNA, que não aparecem caracterizadas pelo BLASTn do genoma das aves equivaliam a repetições simples e elementos transponíveis de galinha depositados no GIRI. Essa porcentagem pode ser ainda maior devido às lacunas e falhas de identificação de retroelementos

de aves. O clone MG391 (Figura 17A) ilustra um exemplo de DNA não caracterizado no genoma da galinha pelo BLASTn (Figura 17B), mas que apresentava um elemento CR-1 identificado no CENSOR-GIRI (Figura 17C).

(A)

s36

```

1      GGTTCGATTG GGGTTGGTGT TAGGAAGAAA TTATTTAATA TGAGAGAGAT GAGGCCCTGG
61     AACAGGTTGC CCAGAAACTG TGGGTGCCCC ATCCTGTAAG TGTACAAGGA CAAGCTGAGA
121    ACCCTGGTCT AGTGGAAAGT GTCAACCGNG GCAAGAGGTT GGAACCATCT TGTCTTAAAG
181    GTCTCTTCTG ACCGAAGTCA TTCTACNATT CTATAAAAAGT TTAATTCCTT CCCTAGTCAG
241    GCAATCTTTC CCTAAAACCTC TATACTTACT GATAAAATATT TGTACAGCG TACTAATAGG
301    GTGCAACATC CCATTAGGAT TTTTAGAAAT TTTTAGACTT CTTCAGCTTA AAGAGACACA
361    TACCTACTGC TTATTTTCCA AATGAGATTA TATACAATAC CTTCATAGCA AATACCATGA
421    TGATGTATAT TAATGCCATA TCACTAATGT AATATCAACA ATATCAGTTA GCAATTCCCT
481    CTGTCATAAC GTTCTTGAT ATCTGAAGAT TACAAAATCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
541    TTGCTCTGCC TCTTCCTACT GTTCAAAAAA ATAAAAAATA TCCAGAAGTC TTTGCTGGTA
601    TGTATATCAC ATGGATGAGC ATATATGCTG ATCTTTAACT ATCTAATTGT GGATGTTATT
661    TGCTAATTTT GCTAGATATT CAAC TAGGCA TAAGCTTTAA CAATTCATCC ACTGAAAATG
721    AGCAACATTC TAACAGAAAG AAGTTTGTTA TCTCACTTGT TATTTTCATGC CAACAAACAA
781    AATCAGTTCA TACATCATTT TCCAATTTTA TGACTGTGTA ACTTAGAAGA AAAATTATTC
841    ACAAGTAGCA CATTTAATTA AAAATAACAC AGATGATTAT TAATTATGAA GAGCATGGTG
901    GAAGACAATA AAAATTCTGA AACCCAGAAA TTTCATCTGT GACCCAATGC CATGGGAGAC
961    TTTCTTTCTT GAGTGCAGAG GTGAATCTCT GATTATAACT ATCTTTATTT TACATTAGTC
1021   CGATGAAAAA AAAATAAAAA TCTGAAGAAG AAAATGTGTA GATGTTGGAA ATACTTCAGT
1081   TTTCATAGAC TTACCCTAAT ACAGAGAGGT AAATCAGCT ATGCAAATGT GACTGTAAT
1141   AACCAATTTT TCTAATATTG AACAGAGATA TTACTATATT ATATAAATTC TTGACCCCCC
1201   CTTCCAAAAC CACACTTTCG GGAATTTCTC AACCTTACT ACACCCTAAG TATACCAAAT
1261   AATTCCAACC ACAACCATCA CAATTACCAC ACCATTCCAC ACCTATCCT GAGCAAAAATA
1321   ATATTATATA AATGATAATA AACACAATTA TAACAGATTA AAATATATT ATACCATTAC
1381   ATAAACATAC CTCATTCAGC CTCAATCAAC ACCATAAAGT CAATATATAA TGTTAAAAAT
1441   CAAAATACCA ATCTTG TGTA TATTACACCA ACCCAATCG AACC

```

s36

(B)

```

ref|NW_001471639.1|Gga2_WGA66_2|D| Gallus gallus chromosome 2 genomic contig, reference
assembly (based on Gallus_gallus-2.1)
Score = 2111 bits(2340), Expect = 0.0, Identities = 1182/1189(99%), Gaps = 1/1189(0%)

emb|FM207286.1| Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast
minicircle DNA, case 1409_7, clone 313
Score = 522 bits(578), Expect = 3e-144, Identities = 292/294(99%), Gaps = 0/294(0%)

```

(C)

Name	From	To	Name	From	To	Class	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	Score
MG397	1	211	<u>CR1-C4</u>	4274	4504	NonLTR/CR1	d	0.7442	1.8462	720

Figura 17. Integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* em região indeterminada do genoma da galinha.

A) O clone MG397 da ave K1-735 (geração F3, família 2) ilustra a inserção do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) no locus NW_001471639.1 do cromossomo 2 (verde), uma região não caracterizada pelo BLASTn do genoma da galinha. Sublinhado em vermelho, encontra-se um elemento CR1 identificado pelo CENSOR-GIRI. A região de micro-homologia está destacada em amarelo. **B)** Resultado da análise no BLASTn. **C)** Resultado da análise no CENSOR.

Na análise dos 178 clones MG, foram encontrados 62 fragmentos de elementos repetitivos, que, além dos 43 elementos encontrados em regiões não caracterizadas do genoma, apresentaram 18 fragmentos em regiões de genes e um fragmento em região com proteína hipotética. A grande maioria destes fragmentos (79%) equivalia ao retrotransposon não-LTR CR1. Mas também foram encontradas repetições satélite, um retrovírus endógeno ERV3 e retrotransposons LTR Hitchcock, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Elementos repetitivos identificados nas regiões flangeadoras às inserções de seqüências de minicírculos de kDNA.

Classe Repetitiva	Fragmentos
Repetição simples	3
Satélite	3
Elementos transponíveis	59
Retrovírus endógeno ERV3	1
Retrotransposon LTR Hitchcock	9
Retrotransposon não-LTR CR1	49
Total	62

Os elementos repetitivos identificados localizavam-se, em sua maioria, nos macro-cromossomos (1 a 3), no cromossomo intermediário 9 e no cromossomo sexual Z (Figura 18A). Uma presença representativa dos macro-cromossomos e do cromossomo Z já era esperada, visto que estes são os cromossomos com a maior concentração de retroelementos na galinha. Um fato curioso em relação ao cromossomo 9 é que todos os retroelementos ali encontrados eram do subtipo CR1-L. A Figura 18B ilustra que este subtipo foi o mais representativo (41%) de toda a família de CR1 encontrada neste trabalho. O CR1-L provavelmente representa um ancestral de um elemento tipo-SINE que se associou com um CR1 tipo-LINE (Jurka, 1999).

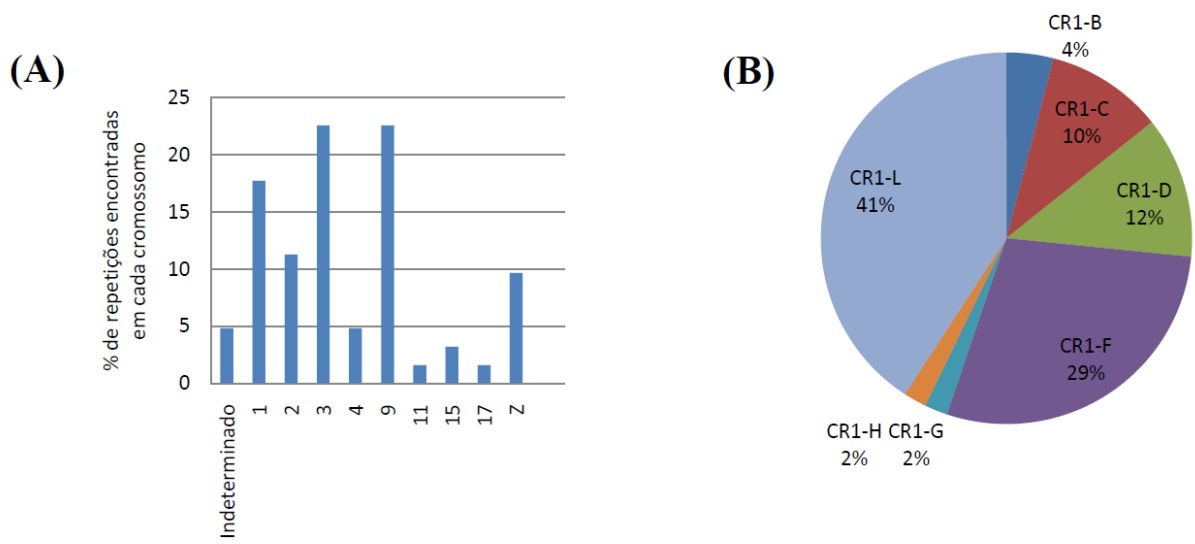


Figura 18. Características dos elementos repetitivos encontrados nas regiões flangeadoras às inserções de seqüências de minicírculos de kDNA. A) Distribuição das 62 repetições encontradas nos cromossomos da galinha. **B)** Descrição dos subtipos de elementos CR1 presentes dentro dos 49 fragmentos de CR1 identificados.

Dois clones da ave K1-583, geração F1 da família 3, apresentaram alinhamentos no mesmo *locus* do cromosso 3 (NW_001471673.1). Quando estes dois clones (MG328 e MG325) foram alinhados, verificou-se que eles apresentavam a mesma região de kDNA. A análise dos clones no BLASTn mostrou que a região de ave de um dos clones (MG328) estava à montante da mutação do outro clone (MG325), com a presença de uma duplicação de cerca de cerca de 75 pb logo após região de inserção do kDNA. Ou seja, os dois clones alinhados continham as duas regiões que flanqueavam o kDNA. A análise destas seqüências no CENSOR mostrou que elas continham um elemento LTR nos fragmentos que flanqueavam a inserção do kDNA, sugerindo a entrada do kDNA no meio de um retrotransposon LTR Hitchcock. Estes clones estão ilustrados na Figuras 19A e B com os devidos resultados de análise no BLASTn e no CENSOR. O esquema ilustrando os dois clones alinhados se encontra na Figura 19C. Observa-se que estes elementos compartilham extensas regiões de micro-homologia (em amarelo na Figura 19) com o kDNA, além daquele limite identificado pelo BLASTn. No caso do clone MG328, a micro-homologia inicial de 19 nts saltou para 65 nts com o resultado da *Rebase*, e no clone MG325, passou de 18 nts para 55 nts.

(A)

C31-4

1 CCACGCTGGG AGAAGAGTTG TTTGCTAATA CTATGCTGTT GGTTTAACCC AGCAGGTGGC
61 TCAGCCCCAC ACAGTCGTTT GCTCACTTCC TCCCTTCCCA GTGGGATGGG GGAGAGATTC
121 AAAAAATAAA AGCAGAACTC ATGGTTTAAAG ATAAAGCTGT TTAATAAGAT GGAGAAAAGG
181 AAAAGGATAG TAGCTATGAT TATATCTGTA TGAATGTACA TAACAAGTGA TGCATAAGCA
241 ATTGCTTACC AACCCCTAAT CAAACTCCCA ACTAACCCCT CAAGCAGCAG AAGAGAGAGA
301 TGAACGCCCC TCCAAAACC AAACCAGGAA GAGGTTGAAT CTCTGAATAG ACCAATAACA
361 GGCTCTGATA CACATACACC AACCCCAATC GAACC

S36

[ref|NW_001471673.1|Gga3_WGA106_2](#) D Gallus gallus chromosome 3 genomic contig, reference assembly(based on Gallus_gallus-2.1)
Score = 513 bits (568), Expect = $1e^{-143}$, Identities = 308/323 (96%), Gaps = 8/323 (2%)

[gb|FJ854352.1](#) Homo sapiens clone 447 trypanosome minicircle DNA integration region
Score = 147 bits (79), Expect = $2e^{-32}$, Identities = 90/95 (95%), Gaps = 1/95 (1%)

Name	From	To	Name	From	To	Class	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	Score
MG325	76	365	Hitchcock_LTR	1	325	LTR	c	0.8840	1.8000	1865

(B)

S67 rev

1 GAACCCCTC CCCAAAACA AACCCAGGAAG AAGTTGAATC TCTGAATAGA CCAATAACAG
61 GCTCTGATAC ACATACACCA ACCCCAATGG AACCCCAAC TAACCCCTCA AGCAGCAGAA
121 GAGAGAGATG AACTCCCATC TCCTCCAAAA CACCTTCAGC ATGATGCCAT ATGGTATGGA
181 ATATCCCTTT GGCCAGTTTT TCAGCTGTCC TAACTCTGCT CTCTACCAGC TCCTTGGGCC
241 TTGGCTCTGA ACAACACTGT TTAGCAGCAA CTATAAACAC TGGTGTATTG TCTCCTAGAA
301 CCAAAACATA GCATCAGACC AGACACTCTG AAGAAAACAA TTGCATCCCA GCTGAAACTA
361 AGCCATGCTA GATGGCTGTT AGGATAAATT CTGGCTGTGG ATAGATATGT TTGAAATACA
421 TTACTTCAA GTCAGTTTCA TTCAATTTTA GAAGGTTCTC TAACTGAAAT TGCCATTTCA
481 CCCTTGAACC AAATTGCTAC TCCAAAGCTT AAAAAACAAG TAACATGAGG AACACAACAT
541 GGGATTTTTA TTCTCTATCT TCACAAAGTA GATGCTGACT TGATATAGGC CTTTCACTGC
601 ACTGTAAAAA TTAGATTTCT TAGAAATTCT TTAACACCAG CATAAACCGT ATGCTGCATT
661 AGAAAGGGCT GCTGGGAAAT TAATTGGGAT TTTTGTCTTT CTTTCTACC TTCAGGTATA
721 TAAAACAGTT AATGACGCTG AAAGCTGTTA TTAAACCTGT TCATAATTTA GAAATAAAGT
781 ATATTAGAGG GAGGTTGAAA AGAGATAAATT AGATATTGGA AAGCCTACTA CAGGGCTTGA
841 NNTTACCTGT AGGTTTCAAG CAGTTTCTCT

C31-1

[ref|NW_001471673.1|Gga3_WGA106_2](#) D Gallus gallus chromosome 3 genomic contig, reference assembly(based on Gallus_gallus-2.1)
Score = 1373 bits (1522), Expect = 0.0, Identities = 783/796 (99%), Gaps = 3/796 (0%)

[emb|FM207355.1](#) Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORFcl30 DNA, patient 1466_42, clone 130
Score = 147 bits (162), Expect = $1e^{-32}$, Identities = 89/94 (95%), Gaps = 0/94 (0%)

Name	From	To	Name	From	To	Class	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	Score
MG328	40	314	Hitchcock_LTR	257	534	LTR	c	0.8448	1.4815	1764

(C)

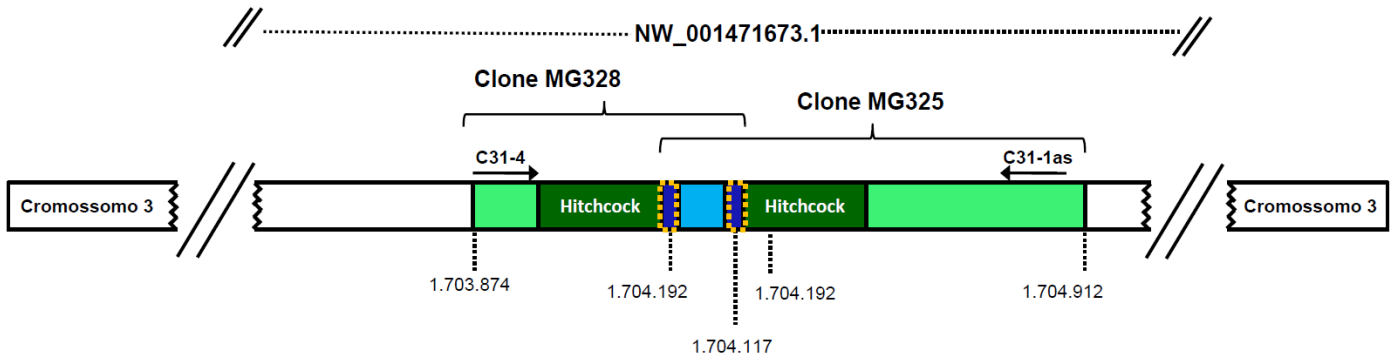


Figura 19. Representação esquemática de seqüências quimeras no genoma da ave K1-583 (F1) flanqueadas pela inserção de kDNA à montante e à jusante no locus NW_001471673.1 do cromossomo 3. Os clones MG328 (A) e MG325 (B) ilustram a integração do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) em posições próximas no locus do cromossomo 3 (verde claro). Os primers utilizados na terceira *tpTAIL* PCR encontram-se sublinhados e a região de micro-homologia está destacada em amarelo. Sublinhadas em vermelho, encontram-se as regiões que equivalem ao elemento Hitchcock. Logo abaixo de cada clone, estão presentes os resultados da análise no BLASTn e no CENSOR. O esquema do alinhamento dos dois clones (C) mostra as regiões do genoma da ave (verde) flanqueando o inserto de kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro). Os quadrados com linha amarela tracejada representam as regiões de micro-homologia e as regiões em verde escuro representam o elemento Hitchcock.

Neste trabalho, alguns insertos de kDNA estavam unidos a elementos repetitivos em tandem (associados entre si). A Figura 20 ilustra uma destas ocorrências, onde o kDNA estava presente numa região de DNA satélite Z-rep que continha um inserto de um fragmento de CR1. O resultado do BLASTn forneceu apenas a informação de que este inserto de kDNA estava localizado numa região repetitiva do cromossomo Z ("Unresolved tandem repeat"). A identificação de que a região correspondia a um CR1 flanqueado por DNAs satélites só foi obtida após a análise no CENSOR-GIRI. Além disso, a análise no BLASTn indicava que a região de micro-homologia correspondia à seqüência GAACGCCC, uma seqüência menor do que a indicada pela *Repbases* do GIRI (GAACGCCCCTCCCAA). Esses dados mostram a necessidade de enriquecimento e unificação das plataformas com depósitos de seqüências de *Gallus gallus*.

(A)

```
1      GGTACGGATG TTACATGTGA CGGCGCGGGG AAATCAAATG GAGTCTTTTT CTGGGTGTGT
61     TCTGTGTTGA ATACCTCCTT TATCCATCCC ACATTCTCCT CTGTGTTGAT GATCCTTCCT
121    GCATCCCACG GGGCGTAGGG CTGCTGTTTT GTAGGCAGTG AGAACGAGGG CTTGGGCAAA
181    TGATAGGATC CTTGTAGAAT GGCTTGGGAT GGAAGGGACN TCAAGGATCA TCAAGCTCCA
241    ACCCCCGTGC CTCAGGCAGG GCTGCCAACN TCCACTTTGA ATGCCAGACT AGACCAGGCT
301    GCCCAGGGCC CCATCCAACC TGGCCTTGA CTCCTCCAGG GACGGGGAAA ATCTGTTGTT
361    GTAGGTACTT GTTGGCAATG TTCTTCCCGC TTTTACGTGC TCTGTAGAAT GTGTTTCCGC
421    TCAGCCTGGT CCCACTGAAC CCAACCTGAA ATGAACTGGT TTCTTCCTTT TGTTGTGCAG
481    TGCCAAAGAA GCGTGGCAAG CTCCTCAGCT TCCTTCGTTT CTTTCGTGAAC GCCCCTCCCA
541    AAACCACACT TTCGGGAAAT TCTCAACCTT ACTCACGCC TAAGTATACC AAATAATTCC
601    AACCACAACC ATCACAATTA CCACACCATT CCACACACTA TCCTAAGCAA AATAATATTA
661    TATAAATGAT AATAAACACA ATTATAACAG ATTAATAACTA TATTATACCA TTACATAAAC
721    ATACCTCATT CAGCTTCAAT CAACACCATA AAGTCAATAT ATAATGTAA AANNNAAAAT
781    ACCAATCTTG TGTATATTAC ACCAACCCCA ATCGAACC
```

gb|AC231413.2|**D** Gallus gallus BAC clone CH261-89E17 from chromosome z, complete sequence
Score = 881 bits(976), Expect = 0.0, Identities = 514/534(96%), Gaps = 0/534(0%)

emb|FN397848.1| Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle
DNA, patient 71, clone E267
Score = 508 bits(562), Expect = 4e-140, Identities = 287/292(98%), Gaps = 0/292(0%)

Name	From	To	Name	From	To	Class	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	Score
MG417	1	201	Z-REP	8540	8740	Simple/Sat	d	0.9353	3.2500	1542
MG417	202	347	CR1-B2	1068	1208	NonLTR/CR1	c	0.8873	3.0000	894
MG417	370	542	Z-REP	8744	8915	Simple/Sat	d	0.9538	3.5000	1312

(B)

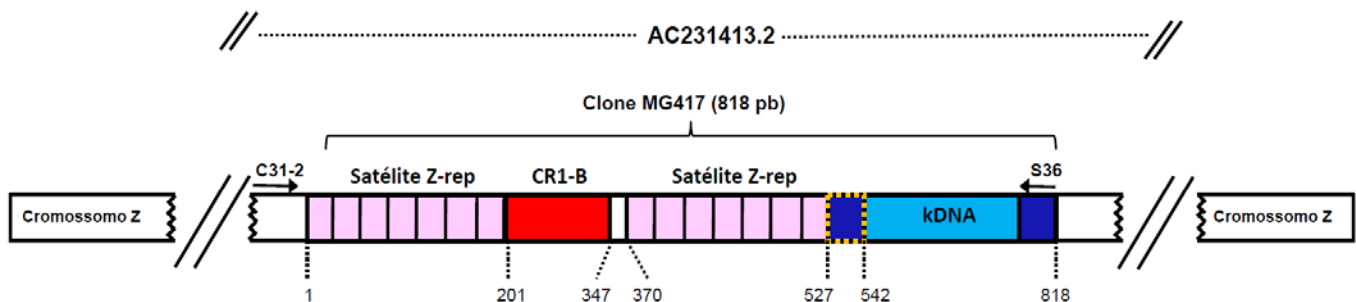


Figura 20. Inserção de sequência de kDNA em regiões satélites com inserto de CR1. (A) O clone MG417, da ave F3 K1-752 (família 3) ilustra a entrada do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) no locus AC231413.2 do cromossomo Z, que apresenta um CR1-B (vermelho) intercalado por duas regiões de DNA satélite Z-rep (rosa claro) da ave. O segmento verde representa região repetitiva do cromossomo Z não identificada. A região de micro-homologia está destacada em amarelo. Abaixo do clone estão presentes os resultados da análise no BLASTn e no CENSOR. (C) Esquema ilustrativo desta inserção. CR1-B, vermelho; DNA satélite Z-rep, rosa claro; o inserto de kDNA, região conservada em azul escuro e região variável em azul claro; micro-homologia, linha amarela tracejada.

2.1.3. Características estruturais dos minicírculos de kDNA inseridos no genoma da galinha

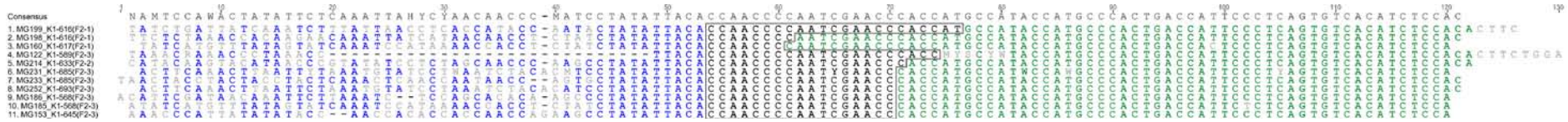
As regiões de insertos de kDNA encontradas neste trabalho alcançaram até 624 nts e, na média, as seqüências de kDNA tinham 242 ± 98 nts. Considerando-se que um minicírculo completo do *T. cruzi* possui 1,4 kb, os achados sugerem que apenas fragmentos parciais de kDNA foram revelados pela técnica *tpTAIL* PCR com primers aninhados. Talvez, a extensão real das seqüências de minicírculos seja variável não se descartando a possibilidade de integrações de seqüências completas em tandem (Nitz e cols. 2004). A análise das seqüências de kDNA presentes em nossos clones foi um ponto interessante neste estudo. O alinhamento dos diversos fragmentos de kDNA identificados nesta tese demonstrou que os minicírculos apresentavam grande variabilidade. Foram encontradas diversas seqüências de minicírculos de kDNA com diferenças estruturais marcantes nas regiões variáveis, as quais não alinharam entre si. Mas, a partir dos alinhamentos parciais foram identificadas seqüências consenso de kDNA (Figura 21A a D). Em alguns casos, não existia um consenso no inserto de kDNA, apesar de existir similaridade entre as regiões de micro-homologia e do local de inserção no genoma da ave (Figura 21E). Em outros casos, o consenso ocorria apenas nas regiões de micro-homologia (Figura 21F).

Os insertos de minicírculos de kDNA muitas vezes apresentavam o final de uma região conservada, uma região variável inteira (com cerca de 230-250 pb) e o início da próxima região conservada, como ilustrado na Figura 17. Em outros casos, foram encontradas seqüências truncadas de kDNA, com pequenos fragmentos de regiões variáveis, geralmente entre 50-100 pb, intercalados por fragmentos de regiões conservadas, conforme mostra a Figura 19, ou até por regiões conservadas inteiras com ~130 pb.

(D)



(E)



(F)

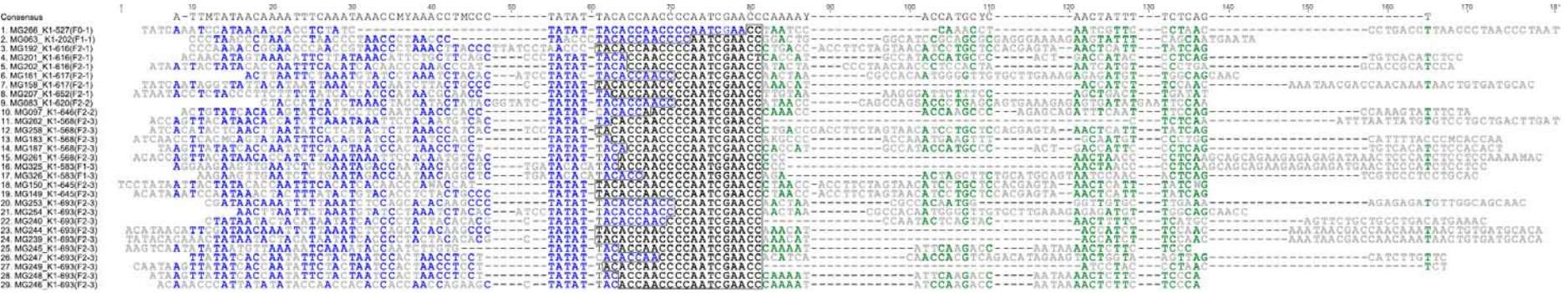


Figura 21. Alinhamento de seqüências quimeras nos sítios de integração de minicírculos de kDNA no genoma de *Gallus gallus*. A a D) Consensos gerados pelo alinhamento das micro-homologias e das regiões de kDNA. E) Consenso gerado pelo alinhamento das micro-homologias e das seqüências flanqueadoras no genoma da galinha. F) Consenso gerado pelo alinhamento apenas da micro-homologia. Nucleotídeos com o contorno em preto, micro-homologias; nucleotídeos em azul, kDNA; nucleotídeos em verde, DNA de *Gallus gallus*; nucleotídeos em cinza, mismatches.

Acredita-se que o truncamento, e o subsequente rearranjo da seqüência inserida de minicírculo de kDNA, pode estar relacionado com uma imensa diversidade genética que acompanha a herança e fixação do kDNA no genoma hospedeiro. A enorme diversidade tem imenso potencial devido à grande massa de minicírculos cujas regiões variáveis não se repetem. Considerando que cada gameta tem integração de seqüência jamais repetida, a ave produzida pela fecundação artificial não repete a estrutura de uma mutação no mesmo *locus*, visto que cada gameta resulta de célula germinativa originariamente parasitada por tripanossomas com milhares de minicírculos, cada um deles com um kDNA diferente. Essa variação na estrutura das regiões variáveis de minicírculos nas mutações em *loci* específicos do genoma humano foi descrita em trabalhos prévios (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a).

2.2. Resultados obtidos com a *tpTAIL* adaptada pra genes específicos

A maioria dos eventos de integração (39%) de minicírculos de kDNA ocorreu em regiões codificadoras do genoma da galinha. Entre esses, foram selecionados para análise mais detalhada as mutações nos genes: i) transportador de metal CNNM2 (localizado no cromossomo 6 – *locus* NW_003763812.1); ii) gene tetraspanina-18 (cromossomo 5 – *locus* NW_003763785.1); iii) gene da distrofina (cromossomo 1 – *locus* NW_001471534.2) descrito em trabalho previo do LMPDC (Teixeira e cols, 2011a). Esses genes são cópia única no genoma da galinha, facilitando as análises.

A *tpTAIL* PCR (vide Materiais e Métodos) foi utilizada na tentativa de amplificar as mutações de kDNA integradas em regiões flaqueadoras específicas desses genes. No caso do CNNM2 e da distrofina foram identificadas seqüências no genoma de diferentes aves de uma mesma família. No caso da tetraspanina-18 os primers que deram resultado no teste inicial de padronização não trouxeram os resultados esperados. Contudo, foram obtidos clones CG (referentes às quimeras de kDNA com a região CNNM2 da galinha) e DG (referentes às quimeras de kDNA com a região da distrofina da galinha), que estão exemplificados na Figura 22.

Foram gerados oito clones CG referentes a cinco aves da família 3 (uma ave F0, três F1 e uma F3), descritos na Tabela A2 do anexo II. Os clones DG geraram 17 seqüências quimeras, sendo seis clones de três aves da família da família 1 (duas aves F1 e uma F3) e 11 clones de sete

aves da família 2 (uma ave F0, duas F1, três F2 e uma F3), conforme Tabela A3 do anexo III. A análise destes clones CG e DG no CENSOR-GIRI revelou ausência de elementos repetitivos.

(A) **CM2-s1**

```

1      ACCATTCCTG TGACTGCCCT GATACCGTAA CAAGTCAGCT GCAGTCTGTA TTTATCTGAC
61     CCCTTTGCTC GTTAGGGAGA AGTCCAGCAC AGAATTATGC CTCACAGGTA GGTATCCTGA
121    ACTTCTGTTT GTGGTAAC TG TAGCAACGT GACGGAGTGG TCCAAATGGG AAGAACTAAA
181    AACATGTTTT AGAAAGTGCG TTTGTTAATG TGTTCTGATT TCTCTCATGT GAACTGGTGG
241    GAGATTAGGG TGGGAGATCT TCAAAGAAGA TCTTCTCCCC CACGCTGAGG TTTAAGAGCT
301    GAAAAGTTTC CTGGAGAAAA TGCATTTGGC AAAGGGGAAT GTGTGCTGCT GAACTGCCCTT
361    AAAAGGAGAA CTTATATGAA AGAATCTTA TATCTCCTA CGGGTAAATT CTATGGTTTG
421    AATAATGCTT GGCCATTTCA AGTGCTCAA AACCTTGAAT TTTCTTTCAA TGAGGTTAAT
481    GCTGTGATAA TGTACGGGTG AGATGCATGA TTTTTCGGCC ATAAATTTGA AGGCCCTCC
541    CAAAACCAA CCAGGAAGAA GTTGAATCTC TGAATAGACC AATAACAGGT TCTGATACAC
601    ATACACCAAC CCAATCGAA CCACCACCTC CCGTAAACAC ACCCATTTT CGGGCATATA
661    ACGTACGGGG GAGATGCATG ATTTTTCGGC CATAAATTTG AAGGCCCTC CCAAACCAA
721    ACCAGGAAGA AGTTGAATCT CTGAATAGAC CAATAACAGG TTCTGATACA NATACACCAA
781    CCCAATCGA ACC

```

S36

ref|NW_003763812.1|**D** Gallus gallus breed Red Jungle fowl, inbred line UCD001 chromosome 6 genomic scaffold, Gallus_gallus-4.0, whole genome shotgun sequence
Features in this part of subject sequence: metal transporter CNNM2 isoform 2
Score = 888 bits (984), Expect = 0.0, Identities = 494/495(99%), Gaps = 0/495(0%)

gb|FJ854352.1| Homo sapiens clone 447 trypanosome minicircle DNA integration region.
Score = 405 bits(448), Expect = 3e⁻¹⁰⁹, Identities = 276/307(90%), Gaps = 4/307(1%)

(B) **S67as**

```

1      GAAGGCCCTC CCAAACCA CAATTTCTCA ATTTTCCGTA CCCAAATTT AATAACCAAT
61     GTGTTATCAA CAACCAAACA CCAACCCTAAC GTTACACCCA CAACACCAGC ATACACAAAC
121    TTTATACATA TTATAATTCA GACAATTAAC TATAATAACT AACTTAAGAC AATTTTACT
181    GTAACCAAT CTACTACTCA GTTTGTACAT TCATATATCA CAAAATCCAA TAACATACAT
241    AACATTGAT AACAAATCT TAAATCTCCA GCACACAAGC CCTATATTAC ACCAACCCCA
301    ATCGAACCAA GACCAAAACC AGAAAACCAA ACCAAAACAA AGTTCACGTC TATACTTCAA
361    AAAACAAACA AACAAAAGCT ATTTTTTCTCT CTCACAATAA CTTACAGTG CTTACAAAC
421    ATTTAGTTAC AGCATTCTTG ACAAAGTAGT ATTGGCCACA ATGGCAAAC TGC'TTAATAC
481    TAAATTTGAA CAGGAGCGGA CTAGAA

```

DG-s3

ref|NW_001471534.2|**D** Gallus gallus breed Red Jungle fowl, inbred line UCD001 chromosome 1 genomic scaffold, Gallus_gallus-4.0, whole genome shotgun sequence
Features in this part of subject sequence: dystrophin
Score = 369 bits(408), Expect = 4e⁻¹⁰⁰, Identities = 214/218(98%), Gaps = 3/218(1%)

dbj|AB434513.1| Trypanosoma cruzi kinetoplast DNA, kinetoplast minicircle hypervariable region, isolate: CEN 076
Score = 358 bits (396), Expect = 3e⁻⁹⁵, Identities = 250/283(88%), Gaps = 1/283(0%)

Figura 22. Sequências quimeras mostrando o kDNA do *T. cruzi* inserido em regiões codantes no genoma da galinha. A) Clone CG004, da ave K1-516, contendo o kDNA inserido na região do transportador de metal CNNM2. B) Clone DG-441, da ave K1-627, que apresenta a inserção de kDNA no gene da distrofina.

Para o estudo da herança das seqüências de kDNA inseridas nestes *loci* específicos, realizou-se o alinhamento dos clones CG das aves das diferentes gerações da família 3 entre si. A análise revelou que as seqüências não tinham homologia completa entre as quimeras kDNA-CNNM2, e, portanto, encontrou-se ausência de identidade na região de seqüência variável de kDNA, como já era esperado. Não obstante, em todos os casos o kDNA continuava inserido na mesma base do locus NW_003763812.1 do cromossomo 6 (Figura 23A). O alinhamento dos clones DG também mostrou o mesmo padrão descrito nos clones CG, com o kDNA inserido no mesmo ponto no *locus* NW_001471534.2 do cromossomo 1, com diferenças reconhecidas no alinhamento das regiões de kDNA (Figura 23B).

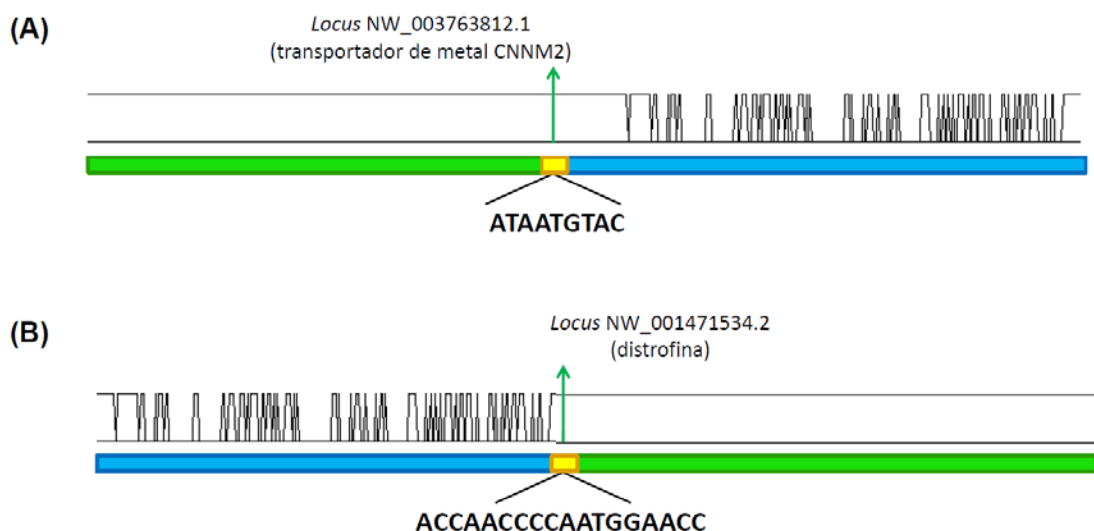


Figura 23. Alinhamentos dos clones CG e DG. A) Esquema representando o alinhamento dos clones CG. As seqüências de kDNA estão inseridas no gene do CNNM2 no *locus* NW_003763812.1 do cromossomo 6 da galinha. B) Esquema representando o alinhamento dos clones DG. As seqüências do kDNA integram no gene da distrofina no *locus* NW_001471534.2 do cromossomo 1 da galinha. Para cada gene, ocorreu a manutenção do local e da base de inserção do kDNA no genoma da galinha (em verde) e da seqüência de micro-homologia (em amarelo) em aves de diferentes gerações de uma mesma família. Essa manutenção é representada pela linha preta contínua. Porém, para ambos os genes, as regiões de kDNA (em azul) tiveram uma alta variabilidade entre aves de diferentes gerações de uma mesma família, representada pelos picos.

O modelo de fixação das mutações de kDNA nos genes do CNNM2 e da distrofina (Figura 23) não obedece a herança conservativa canônica que segue as Leis de Mendel. A herança de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* via LkDT e fixação VkDT nas progênes não segue as leis de Mendel, em primeiro lugar, porque as mutações ficam localizadas estrategicamente em elementos transponíveis, que são mobilizados ao longo do tempo no genoma das espécies, e que são transferidas para as progênes via cruzamento entre homozigotas e heterozigotas. Em segundo lugar, a herança de tipo Mendeliano requer que a estrutura de DNA da mutação parental seja encontrada homologamente na progênie. Esse requerimento da herança Mendeliana também não é encontrada em centenas de casos de LkDT e LvDT documentados em nossos estudos. Não obstante as peculiaridades desse novo tipo de herança de kDNA de *T. cruzi*, as mutações permanecem fixadas ao genoma das progênes. Em apenas um caso, observou-se a fixação do kDNA transferido da fêmea parental F0 K1-331 para sua progênie F1 K1-516 (família 1). O alinhamento das seqüências CG027 e CG004 mostrou homologia documentada na Figura 24. De fato, o clone CG004 revelou a seqüência idêntica de DNA da galinha, região compartilhada de micro-homologia e 136 pb do inserto de kDNA do clone CG027, inclusive a mesma região variável truncada do kDNA. Esse caso representa a fixação da herança Mendeliana conservativa típica na ave parental e na sua progênie.

Nos clones DG a inserção do kDNA no *locus* do gene da distrofina ocorreu sempre na mesma posição gênica. Porém, algumas seqüências DG apresentaram outras particularidades. Por exemplo, as seqüências DG156 e DG157 (ave F1 K1-202) tinham evidência topológica de *hitchhiking*, pois, em adição ao kDNA inserido na mesma base do *locus* da distrofina no cromossomo 1, identificou-se uma seqüência de outro cromossomo indeterminado carregado junto ao kDNA, conforme mostra a Tabela A3, anexo III. A seqüência do clone DG516, da ave F3 K1-760, tinha duplicação do sítio de inserção no *locus* de distrofina, cuja duplicação estava intercalada por um regiao de kDNA com 360 pb (Tabela A3, anexo III).

O estudo das mutações em gene específico mostrou truncamento resultante de recombinação no inserto de kDNA no curso da transferência vertical para a progênie. Outras informações sobre integrações de seqüências de minicírculos de kDNA em *loci* específicos foram obtidas em experimentos de *Southern blot* genômico, após digestão enzimática do DNA da ave mutada no gene em estudo, conforme descritos no tópico a seguir.

```

CG027 ACCATTCTTGTGACTGCCCTGATACCGTAACAAGTCAGCTGCAGTCTGTATTTATCTGAC
CG004 ACCATTCTTGTGACTGCCCTGATACCGTAACAAGTCAGCTGCAGTCTGTATTTATCTGAC
*****

CG027 CCCTTTGCTCGTTAGGGAGAAGTCCAGCACAGAATTATGCCTCACAGGTAGGTATCCTGA
CG004 CCCTTTGCTCGTTAGGGAGAAGTCCAGCACAGAATTATGCCTCACAGGTAGGTATCCTGA
*****

CG027 ACTTCTGTTTGTGGTAACTGGTAGCAACGTGACGGAGTGGTCCAAATGGGAAGAACTAAA
CG004 ACTTCTGTTTGTGGTAACTGGTAGCAACGTGACGGAGTGGTCCAAATGGGAAGAACTAAA
*****

CG027 AACATGTTTAAGAAAGTGTGTTTGTAAATGTGTTCTGATTTCTCTCATGTGAAGTGGTG
CG004 AACATGTTTAAGAAAGTGCCTTTGTAAATGTGTTCTGATTTCTCTCATGTGAAGTGGTG
*****

CG027 GAGATTAGGGTGGGAGATCTTCAAAGAAGATCTTCTCCCCACGCTGAGGTTTAAGAGCT
CG004 GAGATTAGGGTGGGAGATCTTCAAAGAAGATCTTCTCCCCACGCTGAGGTTTAAGAGCT
*****

CG027 GAAAAGTTTCTGGAGAAAATGCATTTGGCAAAGGGGAATGTGTGCTGCTGAACTGCCTT
CG004 GAAAAGTTTCTGGAGAAAATGCATTTGGCAAAGGGGAATGTGTGCTGCTGAACTGCCTT
*****

CG027 AAAAGGAGAACTTATATGAAAGAATCTTATATTCTCCTACGGGTAAATCTATGGTTG
CG004 AAAAGGAGAACTTATATGAAAGAATCTTATATTCTCCTACGGGTAAATCTATGGTTG
*****

CG027 AATAATGCTTGGCCATTTCAAGTGCTCAAAAACCTTTGAATTTCTTTCAATGAGGTTAAAT
CG004 AATAATGCTTGGCCATTTCAAGTGCTCAAAAACCTTTGAATTTCTTTCAATGAGGTTAAAT
*****

CG027 GCTGTGATAAATGTACGGGTGAGATGCGTGATTTTTCGGGCCAAGTTGAACGCCCTCC
CG004 GCTGTGATAAATGTACGGGTGAGATGCGTGATTTTTCGGGCCAATAATTGAAGGCCCTCC
*****

CG027 CAAAACCAACCAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATAGACCAATAACGGGCTCTGATACAC
CG004 CAAAACCAACCAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATAGACCAATAACAGGTTCTGATACAC
*****

CG027 ATACACCAACCCAATCGAACC-----
CG004 ATACACCAACCCAATCGAACCACACCTCCCCTAAACACACCCCATTTTCGGGCATATA
*****

CG027 -----
CG004 ACGTACGGGGGAGATGCATGATTTTTCGGCCATAAATTGAAGGCCCTCCCAAACCAA

CG027 -----
CG004 ACCAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATAGACCAATAACAGGTTCTGATACANATACACCAA

CG027 -----
CG004 CCCCATCGAACC

```

Figura 24. Fixação da mutação de kDNA em aves da família 3. A sequência presente no clone CG027 obtido do parental F0 K1-331 foi alinhada com aquela do clone CG004 da progênie F1 K1-516. Os asteriscos presentes abaixo do alinhamento indicam que as bases são correspondentes entre as duas seqüências. Em verde, DNA de *Gallus gallus* no locus NW_003763812.1; em azul escuro, região conservada do kDNA; em azul claro, região variável do kDNA; em amarelo, região de micro-homologia.

2.3. Southern blot genômico

A análise por *Southern blot* genômico possibilitou a identificação de variação no padrão de bandas do kDNA que confirmam a integração das seqüências de minicírculos no genoma da galinha. Inicialmente, foi utilizada a enzima *EcoRI*, com apenas um sítio de clivagem no kDNA. Devido a esta característica, a digestão do kDNA do *T. cruzi* com esta enzima gera uma banda de 1,4 kb, que equivale ao tamanho de um minicírculo de kDNA linearizado. A análise da digestão enzimática do DNA extraído de sangue, baço, coração, esôfago, fígado, intestino grosso, músculo esquelético e rim da ave kDNA-positiva K1-639 (F2, família 1) mostrou bandas específicas após hibridização com sonda de kDNA (Figura 25). O tamanho das bandas (~20 kb) é muitas vezes superior que a banda de 1,4 kb de um minicírculo de kDNA. A presença destas bandas em diferentes tecidos de ave F2 demonstra que as seqüências de kDNA integradas no parental F0 foram transferidas verticalmente para as progênes.

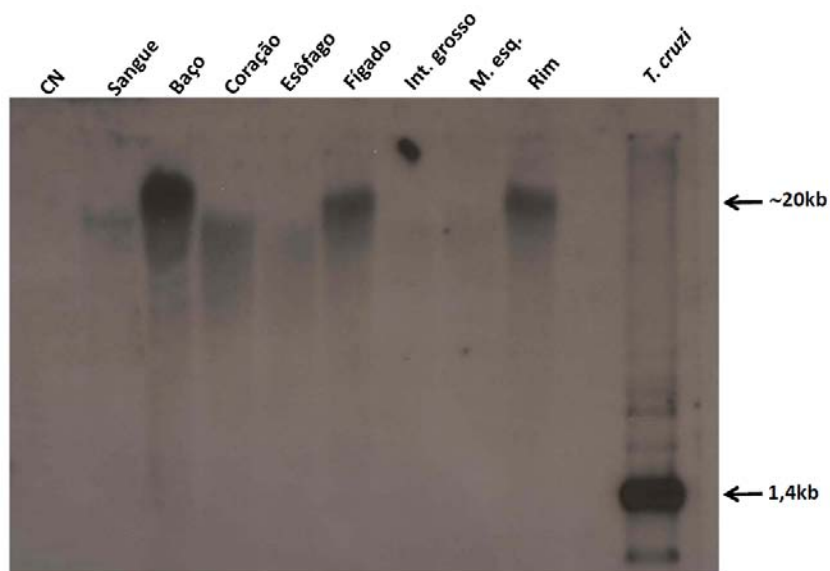


Figura 25. Southern blot de DNA extraído de diferentes tecidos da ave F2 K1-639. Digestão com *EcoRI* do DNA extraído do sangue, baço, coração, esôfago, fígado, intestino grosso, músculo esquelético e rim. Nota-se a presença de bandas de ~20 kb após a hibridização com sonda radiomarcada específica para kDNA. O controle positivo (DNA de *T. cruzi*) forma a banda específica de 1,4 kb. CN, controle negativo.

A identificação de minicírculo de kDNA inserido em genes específicos também sugeriu a análise do DNA hospedeiro pelo *Southern blot*. Supondo que a inserção de kDNA altera a sequência gênica na região de integração, tais modificações poderão formar fragmentos de restrição de tamanhos diferentes. Assim, foram usadas enzimas que clivam o DNA genômico à montante e à jusante do sítio de inserção do kDNA. Os fragmentos formaram bandas separadas em gel de agarose que foram hibridizadas com sondas específicas do gene e do minicírculo de kDNA. Após o estudo dos sítios de restrição destes *loci*, foi possível escolher as enzimas adequadas para cada caso. Esta análise revelou padrões diferentes de bandas em aves kDNA-positivas F0 e nas progênies mutadas nos genes da tetraspanina-18, distrofina e CNNM2.

Para o estudo da região da tetraspanina-18, foram empregadas as enzimas *Bgl*III e *Pst*I para clivagem do DNAs das aves da família 1. O produto da clivagem com as enzimas formou uma banda de 0.7 kb no DNA de uma ave controle, negativa. Esperava-se encontrar uma banda maior que 0.7 kb nas aves kDNA-positivas, já que o kDNA estaria inserido nessa região. Porém, após hibridização da membrana com sonda específica para tetraspanina-18, verificou-se que as aves positivas apresentavam bandas de tamanho menor que 0,5 kb (Figura 26A). A hibridização da mesma membrana com sonda específica de minicírculo de kDNA revelou ausência de bandas nas aves negativas. De grande interesse, as aves kDNA-positivas apresentaram uma banda específica para a sonda de kDNA de ~0.5kb, sobrepondo-se a banda reconhecida pela sonda do gene (Figura 26B).

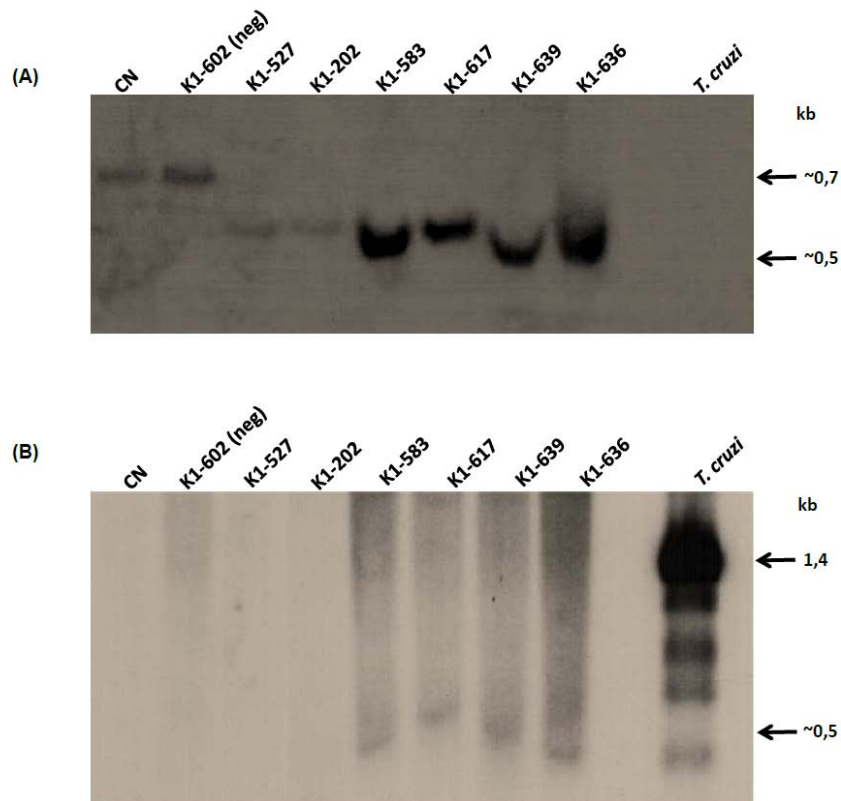


Figura 26. Hibridização das bandas no *Southern blot* genômico mostrando mutações de kDNA no locus NW_003763785.1 da tetraspanina-18. DNA genômico do coração de galinhas da família 1 foi digerido com *Bgl*II e *Pst*I para gerar fragmentos de 0,7 kb. *Southern blot* genômico apresentou bandas após ser hibridizado com sonda radiomarcada: **A)** específica para tetraspanina-18; **B)** específica para kDNA. O DNA controle de *T. cruzi* apresenta a banda específica de 1,4 kb. CN, controle negativo. Ave kDNA-negativa: K1-602 (F0). Aves kDNA-positivas: K1-527 (F0), K1-202(F1), K1-583(F1), K1-617(F2), K1-639 (F2), K1-636 (F2).

No caso da análise relacionada ao gene da distrofina, usou-se as enzimas *Eco*RI e *Xho*I para clivar o DNA genômico das aves da família 2. A digestão do DNA de uma ave controle kDNA-negativa gera uma banda de ~1kb. A ave K1-581 (F0 positiva) apresentava uma banda na mesma altura do controle negativo, enquanto que as outras aves apresentam bandas com tamanhos variados, cerca de 200 a 400 pb menores que 1 kb (Figura 27). A hibridização desta mesma membrana com sonda específica para kDNA não hibridizou com o DNA de nenhuma das

aves positivas e nem com o DNA do controle negativo, sendo observada apenas a banda de 1,4 kb do *T. cruzi*.

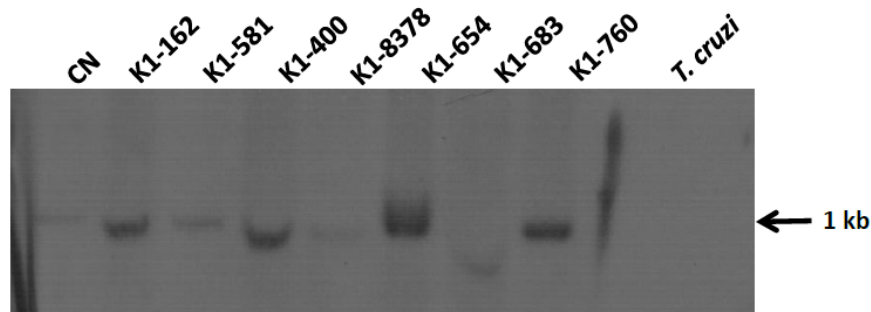


Figura 27. Hibridização das bandas de *Southern blot* genômico mostrando mutações de kDNA no locus NW_001471534.2 da distrofina. DNA genômico do coração de galinhas da família 2 foi digerido com *EcoRI* e *XhoI* para gerar fragmentos de 1 kb. *Southern blot* genômico apresentou bandas após ser hibridizado com sonda radiomarcada específica para distrofina. CN, controle negativo. Aves kDNA-positivas: K1-162 (F0), K1-581 (F0), K1-400(F1), K1-8378 (F1), K1-654 (F2), K1-683(F2), K1-760(F3).

Na região do gene do CNNM2, a digestão com a enzima *SphI* gera uma banda de ~0,7 kb em ave negativa. Os DNAs de aves da família 3 foram digeridos com esta enzima. Após a hibridização com sonda específica para o gene (Figura 28), o DNA clivado da ave negativa formou a banda esperada de 0,7 kb. Foi interessante observar que quatro aves positivas apresentavam a banda de 0,7 kb e, ao mesmo tempo, apresentavam outra banda de ~3,5 kb. Esta banda de ~3,5 kb encontrada apenas em aves kDNA-positivas pode ter sido gerada por modificações subsequentes a recombinação e *hitchhiking* no genoma de progênie kDNA-positivas mutadas no gene CNNM2. Na hibridização da mesma membrana com sonda específica para kDNA, observou-se um padrão semelhante ao dos DNAs digeridos apenas com *EcoRI* (bandas de ~20kb). O DNA da ave negativa não hibridizou com esta sonda. O DNA do *T. cruzi* formou a banda de 1,4 kb.

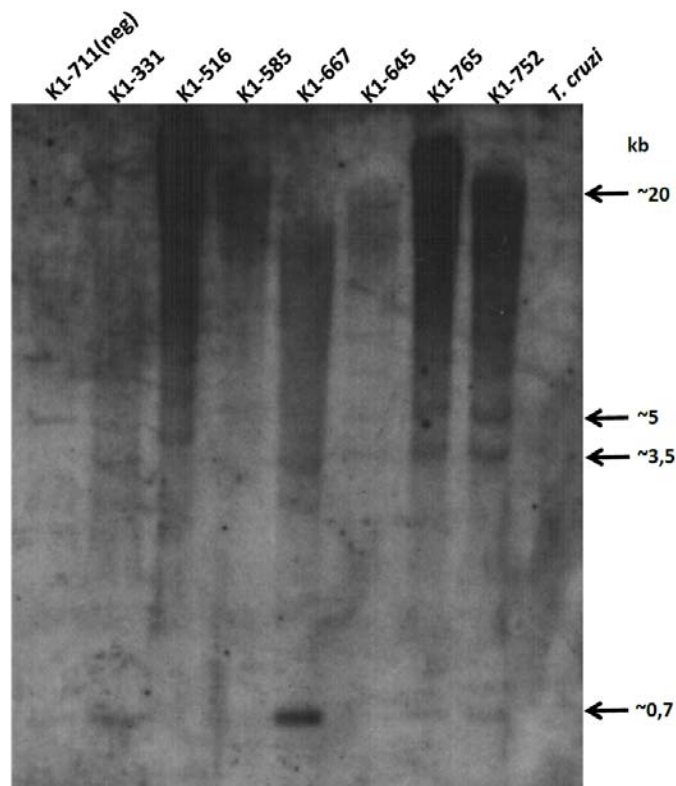


Figura 28. Hibridização das bandas de *Southern blot* genômico mostrando mutações de kDNA no locus NW_003763812.1 do transportador de metal CNNM2. DNA genômico do sangue de galinhas da família 3 foi digerido com *SphI* para gerar fragmentos de 0,7 kb. *Southern blot* genômico apresentou bandas após hibridização com sonda radio marcada específica para CNNM2. CN, controle negativo. Aves kDNA-negativa: K1-711 (F0). Aves kDNA-positivas: K1-331 (F0), K1-516 (F1), K1-585 (F1), K1-667 (F2), K1-645 (F2), K1-765 (F3), K1-752 (F3).

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

A integração dos minicírculos de kDNA pode gerar novas fases de leitura aberta (ORFs) no genoma do hospedeiro, com o potencial de serem traduzidas em proteínas quimeras. O estudo *in silico* dos 175 clones com quimeras de kDNA e DNA de galinha deste estudo revelou 172 ORFs putativas. A análise no algoritmo blastp revelou que destas 172 proteínas quimeras, 62 não possuíam qualquer similaridade significativa e 89 codificavam proteínas hipotéticas.

Adicionalmente foram identificadas 21 proteínas que tinham semelhança significativa com proteínas já existentes de diferentes espécies, duas das quais de *G. gallus*. Uma proteína revelou identidade com proteína quimera putativa (gb|AAR88804.1) encontrada em investigação prévia do LMPDC. Estes resultados estão descritos em detalhe na Tabela A4, anexo IV.

Os clones específicos para a região do CNNM2 apresentaram 20 novas ORFs, que representam seis proteínas quimeras putativas sem similaridade significativa, 12 com similaridade com proteínas hipotéticas e 2 semelhantes a proteínas já existentes (tabela A5 do anexo V). Os clones específicos para a região da distrofina apresentaram apenas 10 novas ORFs, sendo três das proteínas quimeras putativas sem similaridade significativa e sete com similaridade com proteínas hipotéticas (tabela A6 do anexo VI).

4. Ocorrência de cardiomiopatia inflamatória na ausência de parasitismo

As galinhas das gerações F0, F1, F2 e F3 tiveram seus tecidos coletados após a morte natural ou quando foram eutanasiadas para o estudo histopatológico. Os exames mostraram miocardite resultante da confluência de múltiplas unidades mínimas de rejeição em aves de todas as gerações deste estudo. A Figura 29 ilustra a presença de infiltração linfocitária e rejeição de miofibras no tecido cardíaco de uma ave da geração F3.

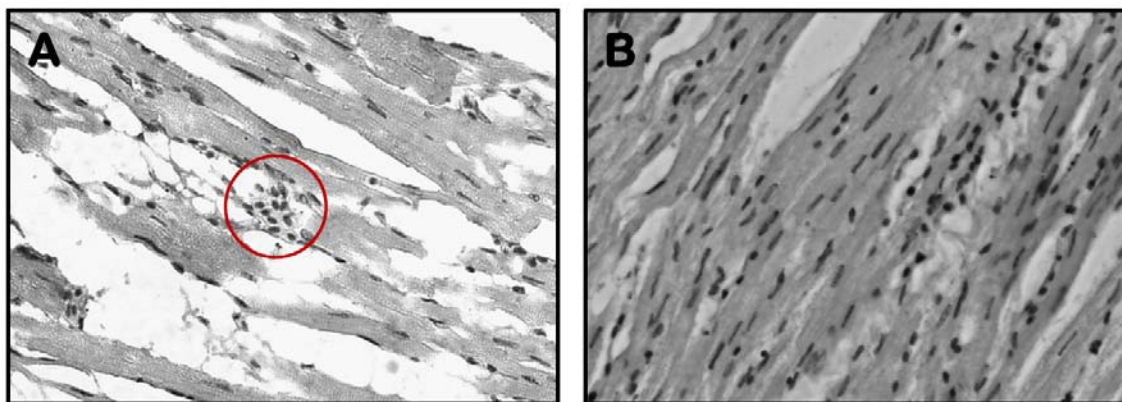


Figura 29. Lesões teciduais no coração de ave F3 kDNA positiva. A) Histopatologia da ave kDNA-positiva F3 apresentando lise de fibras alvo pelo infiltrado de células mononucleares do sistema imune. Uma unidade mínima de rejeição encontra-se destacada pelo círculo em vermelho (HE, 40X). **B)** Histologia de uma ave controle kDNA negativa (HE, 40X). Figuras cedidas por Rozeneide Magalhães Alves.

A miocardite de intensidade variável presente em diversas aves kDNA-positivas é exemplificada na Figura 31. Diversas alterações foram encontradas no coração de aves F2 deste estudo, tais como: cardiomegalia (Figura 30A), destruição de fibras cardíacas por infiltrados de células mononucleares (Figura 31B), e fibrose (Figura 30C).

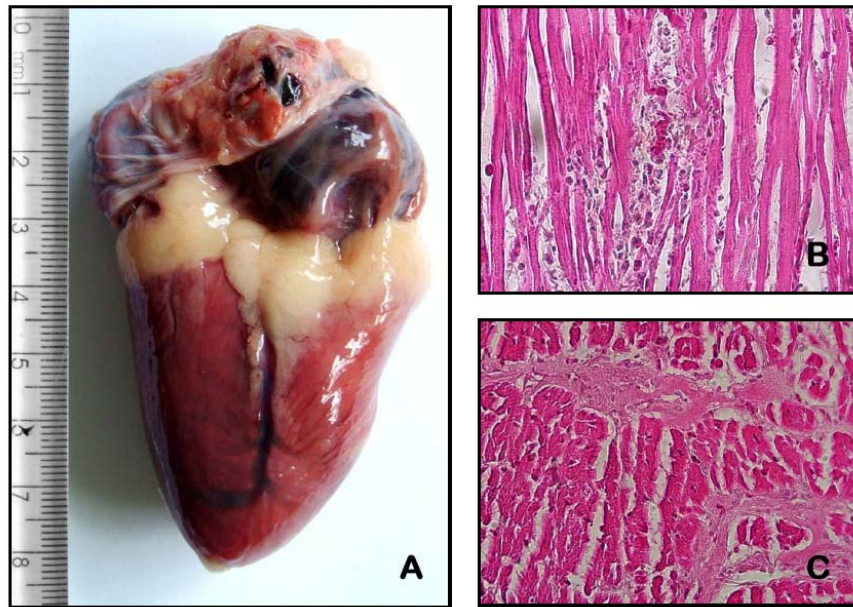


Figura 30. Cardiomegalia e lesões teciduais no coração de aves F2 kDNA positivas. **A)** Cardiomegalia com volume três vezes maior que o de uma ave negativa da mesma idade. **B)** Histopatologia mostrando a presença de miocardite com infiltrado de células mononucleares do sistema imune e destruição das fibras cardíacas alvo (HE, 100X). **C)** Presença de fibrose no tecido cardíaco (HE, 100X). Figuras cedidas por Rozeneide Magalhães Alves e Paulo H.B. Leite.

As lesões microscópicas com destruição das células alvo originam as lesões macroscópicas patológicas, que tem manifestações clínicas diversas no hospedeiro chagásico. As alterações encontradas em diversas aves kDNA-positivas deste estudo são semelhantes às descritas na doença de Chagas humana e em coelhos e camundongos chagásicos estudados no LMPDC. Verificou-se que a grande maioria das aves mutadas desenvolveu insuficiência cardíaca. Ao falecer, estas aves mostravam cardiomegalia (Figura 31) e esplenomegalia.

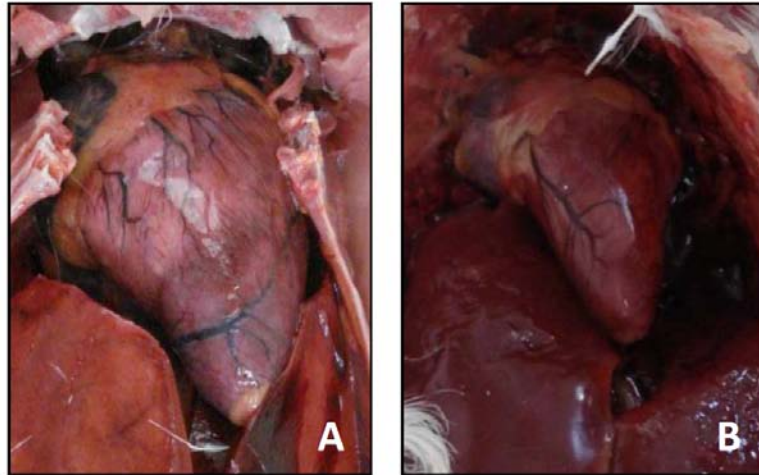


Figura 31. Manifestações clínicas apresentadas por aves mutadas com kDNA. A) Cardiomegalia em ave kDNA-positiva da geração F0. B) Coração de ave negativa da mesma idade com tamanho normal.

Essas alterações foram notadas em aves de todas as gerações, com maior presença na geração F0. A análise estatística indicou que a razão de massa corporal e tamanho de coração é significamente diferente de F0 para o grupo negativo e de F0 para os grupos F1, F2, F3. Entretanto, os grupos F1, F2, F3 não são significativamente diferentes dos controles negativos (ANOVA, $p < 0,06$).

V. DISCUSSÃO

1. Aspectos gerais

O modelo *Gallus gallus* refratário às infecções pelo *T. cruzi* foi empregado neste estudo com a finalidade de excluir a persistência do parasito e permitir o estudo sobre transferência horizontal e vertical de mutações de kDNA-parasita, sem possibilidade de contaminação por infecção críptica. Este modelo trans-filo representa um exemplo de aquisição de material genético pela transferência gênica horizontal entre espécies de eucariotos distantes no reino animal. A troca de DNA entre o protozoário e o vertebrado documentada neste trabalho é o elo perdido na cadeia da evolução das espécies, visto que as parentais transferem verticalmente a herança do DNA para as progênes. Evolução é “descendência com modificação” (Darwin e Wallace, 1858).

A transferência lateral do DNA mitocondrial do *T. cruzi* (kDNA) para aves F0 foi seguida de transferência vertical para 100% das progênes F1, F2 e F3. Nas três famílias estudadas a técnica de *tpTAIL* PCR identificou seqüências quimeras kDNA-DNA hospedeiro, com até 1500 pb e identidade de até 100% com suas homólogas em bancos de dados.

2. Sítios de integração do kDNA no genoma de *Gallus gallus*

O mapeamento de sítios de integração de seqüências de minicírculos de kDNA no genoma da galinha mostrou que ~28% das inserções estavam em elementos CR1, que equivalem aos retrotransposons L1 de mamíferos. Em humanos, 71% das integrações também foram encontradas em elemento L1 (Hecht e cols, 2010), e em camundongos esta porcentagem alcançou 79% (Sousa, 2012). A taxa de integração em CR1 mais baixa em aves é consistente com a menor quantidade de elementos repetitivos no genoma deste modelo experimental, no qual alcança aproximadamente 10%, enquanto que nos humanos a densidade desses elementos alcança 40 a 50%. Diferentemente do que foi descrito em humanos (Hecht e cols. 2010) neste estudo 38,8% das mutações estavam presente em regiões codificadoras de diversos cromossomos. Porém, as mutações foram distribuídas em regiões com maior teor de elementos transponíveis: macro-cromossomos e cromossomo sexual Z (58%). Entre esses, o macro-cromossomo 1 concentrou

16% das inserções, das quais 37% estavam em elementos transponíveis. O cromossomo intermediário 9 foi destacado com 8% das mutações, todas no retrotransposon CR1-L, o que faz este retroelemento um *hostspot* de integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*.

Quando um elemento de inserção é transposto, uma seqüência de DNA do hospedeiro é duplicada no sítio de inserção. Neste sítio, o DNA do transposon é sempre flanqueado por duas cópias da seqüência repetida na mesma orientação direta. A comparação do sítio alvo antes e depois da inserção permite revelar a natureza desta duplicação, pois a topologia do gene antes da inserção revela apenas uma seqüência repetida, e, após a transposição, a seqüência aparece duplicada em cada lado do inserto. A extensão das seqüências repetidas diretas varia de um evento para outro, mas sua extensão mais comum alcança 9 pb. O esquema da união dos clones na Figura 19C representa um evento de transposição de seqüência de minicírculo kDNA com cópias de repetição direta. Porém, ao contrário das seqüências repetidas curtas (Lewin, 2001), a duplicação ilustrada na Figura 19C tem 75 pb. A documentação de repetições diretas do DNA do hospedeiro flanqueando o inserto é mais um indicativo de que a seqüência repetida resultou de um evento de transposição.

A integração do kDNA gera instabilidade que pode levar à mobilização do inserto de DNA exógeno para outros pontos do genoma. Essa possibilidade explicaria as regiões de kDNA truncadas presentes nos insertos, que podem surgir por remodelamento durante a mobilização do kDNA vinculado a elementos transponíveis (Nitz, 2001). Essa mobilidade (transposição) do kDNA também poderia explicar recombinação em mosaico e *hitchhiking* observados no genoma do hospedeiro kDNA-positivo (Hecht e cols, 2010).

A inserção dos minicírculos em sítios ricos em A/C compartilhados com o genoma do hospedeiro sugere que essa integração ocorre via recombinação homóloga mediada por micro-homologia. A natureza dispersa dessas integrações no genoma da galinha indica que grande número de *loci* é suscetível a esta mutação. A extensão completa deste fenômeno será determinada pelo seqüenciamento completo do genoma de uma ave kDNA-mutada. Abaixo serão discutidos os diversos sítios de integração encontrados no genoma da galinha.

As regiões de micro-homologia ricas em A/C seriam *hotspots* para a integração do kDNA, como observado em trabalhos anteriores que estudaram as mutações de kDNA no genoma humano (Hecht e cols, 2010), de galinha (Teixeira e cols, 2011), e de camundongo (Sousa, 2012). Essas regiões (CSB1, CSB2, e CSB3) conservadas no minicírculo de kDNA alinham com micro-

homologias no sítio de integração flanqueando a mutação no genoma hospedeiro. A presença ubíqua desses motivos repetidos na região conservada do minicírculo de kDNA e no genoma do vertebrado orienta as seqüências de minicírculos para os *hotspots* e limita o potencial de troca genética entre o parasita e o hospedeiro. Essa característica do fenômeno de integração de minicírculos de kDNA no genoma das espécies limitaria os efeitos da mutação à autoimunidade e não ao desenvolvimento de câncer (Teixeira e cols, 2011b).

2.1. Associação do kDNA a genes

A presença de inserções em regiões codificadoras sugere que as mutações de kDNA poderiam alterar a expressão de genes do hospedeiro. Simões-Barbosa (2006) relatou que a inserção de seqüência de kDNA ligada a fragmento de elemento L1 no gene da proteína p15 no cromossomo 5 levou a uma alteração desse *locus*, resultando na eliminação do mRNA p15 em macrófago humano. Os minicírculos de kDNA têm potencial de inserir-se na seqüência de um gene alterando sua expressão e podendo, por exemplo, romper sua ORF. Neste trabalho, foram encontrados diversos exemplos de minicírculos inseridos em genes no genoma da galinha. Em alguns casos, os genes estavam associados a elementos transponíveis, porém, na maioria dos casos o kDNA estava diretamente ligado a seqüência do gene sem intermediação de retroelemento.

Entre os diversos genes identificados, dois chamaram a atenção por codificarem produtos com função importante: o CNNM2 e a tetraspanina-18. O transportador de metal CNNM2 é um membro de uma família de quatro proteínas, CNNM1-4, com quatro a cinco domínios transmembrana e um C-terminal extracelular. A expressão gênica do CNNM2 é ubíqua, com níveis mais elevados nos rins e no cérebro. Mutações neste gene alteram o transporte de magnésio e causam à perda do magnésio renal e intestinal; a hipomagnesemia produz sintomas como tetania, convulsões e arritmias cardíacas (Stuiver e cols, 2011). Variações na região do gene CNNM2 também estão relacionadas a hipertensão arterial (Takeuchi e cols, 2010).

A tetraspanina-18 é uma proteína transmembrana com quatro domínios. Existem 33 tetraspaninas descritas no genoma humano, mas essas proteínas estão presentes em diversos organismos, como aves, plantas e fungos. Vários estudos genéticos demonstraram papéis fisiológicos para algumas das tetraspaninas, em particular resposta imunitária, fecundação,

desenvolvimento vascular, manutenção da função de fotorreceptores e de certos epitélios (Rubenstein, 2011). Além disso, essas proteínas têm efeito nas metástases e infecções virais, atuando nos processos de adesão, motilidade, ativação e proliferação celular (Boucheix e cols, 2001). A tetraspanina-18, especificamente, participa numa via de sinalização do cálcio. Essa proteína mimetiza a ionomicina, um ionóforo de cálcio solúvel em lipídios que atua no seu transporte através da membrana celular. A ionomicina induz a proliferação de células T e já foi demonstrado que o mRNA da tetraspanina-18 é altamente expresso em células endoteliais e linfócitos periféricos, onde atua na regulação da entrada de cálcio (Colombo, 2010).

Os genes CNNM2 e tetraspanina-18 foram selecionados para o estudo da herança das seqüências de minicírculos de kDNA. Com esta finalidade, usamos a inovação da *tpTAIL-PCR* e experimentos *Southern blot* genômico. Mutações de kDNA no gene da distrofina foi relatado em trabalho anterior (Teixeira e cols, 2011a) e, por isso, a análise deste gene foi incluída neste estudo. A distrofina e as glicoproteínas associadas formam um complexo que contribui para a manutenção do formato da célula, para sua resistência mecânica e força de contração nos cardiomiócitos. Estudos prévios demonstraram que mutações no gene da distrofina causam danos na membrana e necrose que levam a degeneração muscular na presença de infiltrado inflamatório crônico (Prado e cols, 2012). A perda ou redução da distrofina pela clivagem de proteases virais foi descrita na cardiomiopatia pós-viral por Coxsackie B, produzindo insuficiência cardíaca (Bardoff e Knowlton, 2000). Estudos em camundongos confirmaram que a infecção inicial pelo *T. cruzi* na fase aguda induz redução da distrofina cardíaca ao longo do tempo, sugerindo sua relação com desenvolvimento tardio da cardiomiopatia (Prado e cols, 2012).

O experimento de *Southern blot* e a hibridização com sonda específica para cada gene mostrou padrões diferentes de migração das bandas formadas. Possivelmente, as variações no padrão de migração das bandas se devem à recombinação e deleção que ocorrem ao longo do tempo de vida das aves. Outras possibilidades para a origem das variações no padrão de migração das bandas seria a ocorrência de *hitchhiking* com mobilização da quimera kDNA-DNA hospedeiro para outro *locus* do genoma distante do sítio de integração original. Nesses experimentos, a digestão do DNA genômico apenas com *EcoRI* mostrou bandas de ~20 kb após hibridização com sonda específica de kDNA. Essas bandas bem maiores do que a banda de 1,4 kb do minicírculo linearizado indicam que o kDNA ficou inserido no genoma da ave parental e na progênie.

O estudo de novas fases abertas de leitura (ORFs) *in silico* revelou que as alterações genóticas podem criar um potencial teórico de expressão de proteínas quimeras. Neste trabalho foram identificadas 172 novas ORFs putativas com potencial para codificar proteínas quimeras. Em algumas ORFs foi identificada, *in silico*, proteína putativa com característica de transcriptase reversa (PRO1094), semelhante àquela codificada pelo LINE1. Outras quimeras tinham seqüências codificadoras de proteínas já descritas, com destaque para o fator de replicação do DNA, a dipeptidil peptidase 4, e, ainda, a proteína preS/S do vírus da hepatite B.

O fator de replicação do DNA atua na regulação da origem de replicação, restringindo-a a apenas uma duplicação por cada ciclo celular (Chong e Blow, 1996). A dipeptidil peptidase 4 é uma glicoproteína transmembrana também conhecida como antígeno de ativação de células T CD26. Essa proteína possui ampla distribuição em diversos tecidos e está associada com o metabolismo da glicose, transdução de sinal intracelular, e apoptose (Engel e cols, 2003). O gene preS/S, derivado de um fragmento de integração do vírus da hepatite B no carcinoma hepatocelular no genoma humano, contém o promotor preS/S e uma ORF truncada do preS/S. A proteína preS/S estimula o promotor do antígeno nuclear de proliferação das células do hepatoma (Cho e cols, 2001).

A complexidade das funções dos genes descritos acima sugere que as respectivas proteínas quimeras poderiam alterar o funcionamento das células do sistema imune associadas com autoimunidade na doença de Chagas. Possivelmente, as mutações de kDNA, alterando genes já existentes e/ou gerando novas ORFs, produzem alterações no genótipo e modificações fenotípicas nessas aves kDNA-positivas. A patogênese da doença de Chagas está de alguma forma relacionada a essas alterações no genoma do hospedeiro.

3. Herança das seqüências de kDNA de *T. cruzi* inseridas no genoma de *Gallus gallus*

As técnicas de *Southern blot* e *tpTAIL* PCR mostraram herança das mutações de kDNA nos genes CNNM2 e distrofina e documentaram a inserção de seqüência de minicírculos no genoma da ave parental e sua fixação nas progênes. Interessantemente, as regiões variáveis dos minicírculos de kDNA integradas nesses genes eram diferentes. Adicionalmente, a ausência de

alinhamentos dos minicírculos de kDNA identificados nas 178 mutações analisadas nesta tese também demonstraram a imensa diversidade das regiões variáveis das seqüências.

A explicação para este achado não é encontrada no conhecimento canônico. No caso em estudo, numa rede de kDNA na mitocôndria única do *T. cruzi* existe aproximadamente 20 mil minicírculos de 1,4 kb (Degraive e cols, 1988; Junqueira e cols, 2005). Como cada minicírculo é constituído por quatro regiões variáveis, então 80 mil regiões variáveis diferentes são encontradas em um único parasito. Considerando ainda que uma célula hospedeira, germinativa pode ser parasitada por muitas dezenas de amastigotas de *T. cruzi*, chega-se a quase um milhão de seqüências de minicírculos candidatas a integração em um *locus* do genoma. Nesse estudo, a média de 5 ± 3 mutações por ave foi obtida, e este é mais um fator de multiplicação. Ademais, a análise poderá sugerir diversidade infinita porque cada indivíduo é fecundado pelos gametas que trazem dos parentais quatro possibilidades de minicírculos com regiões variáveis (até 220 pb) diferentes. Essa análise sugere que cálculos preditivos poderão predizer a diversidade genética decorrente desses fatores que associam trocas genéticas entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros vertebrados. São esses aspectos quantitativos e qualitativos das mutações de minicírculos de kDNA que sugerem uma herança semi-quantitativa, não Mendeliana. Não obstante, preferimos considerar essa herança como semi-quantitativa porque a diversidade é restrita à região variável da seqüência do minicírculo de kDNA.

As regiões variáveis do minicírculo de kDNA apresentam um conteúdo elevado de bases A/T e esta característica estrutural favorece a formação de alças que conferem conformação não-B ao DNA. A replicação dessas estruturas tridimensionais cria oportunidade de pareamentos alternativos dentro da seqüência de DNA (Wells e cols, 2005) e propicia rearranjos genômicos do tipo deleções, inserções, inversões e duplicações. Loci ricos em A/T estão associados a um alto grau de mutabilidade devido a eventos defeituosos de reparo do DNA. Estudos em linhagens germinativas mostraram que seqüência rica em A/T tem propensão à instabilidade e remodelamentos são esperados (Bacon e cols, 2001). A identificação de regiões hipervariáveis de minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro é tarefa complicada pelas características físicas do evento e pelas modificações do DNA exógeno subseqüentes a recombinação, deleção e remodelamentos que truncam o minicírculo integrado.

4. Modelo de integração dos minicírculos de kDNA no genoma de *Gallus gallus*

Ainda existem várias dúvidas sobre o processo de transferência lateral do kDNA do parasito para o hospedeiro. Acredita-se que a quebra da dupla fita de DNA do hospedeiro poderia ser induzida pelo estresse resultante da infecção ativa pelo *T. cruzi*. Nesse contexto, seqüências de minicírculos de kDNA liberadas durante o processo de replicação do parasito podem ser transportadas para dentro do núcleo celular, onde pareiam com as regiões de micro-homologia ricas em C/A durante o processo de divisão dos cromossomos (Figura 32). Os insertos de minicírculos guiados por proteínas ligantes de DNA são transferidos para o ponto de quebra da dupla fita e as enzimas de reparo (PARP e outras) selam as extremidades da seqüência do minicírculo (Hecht e cols, 2010).

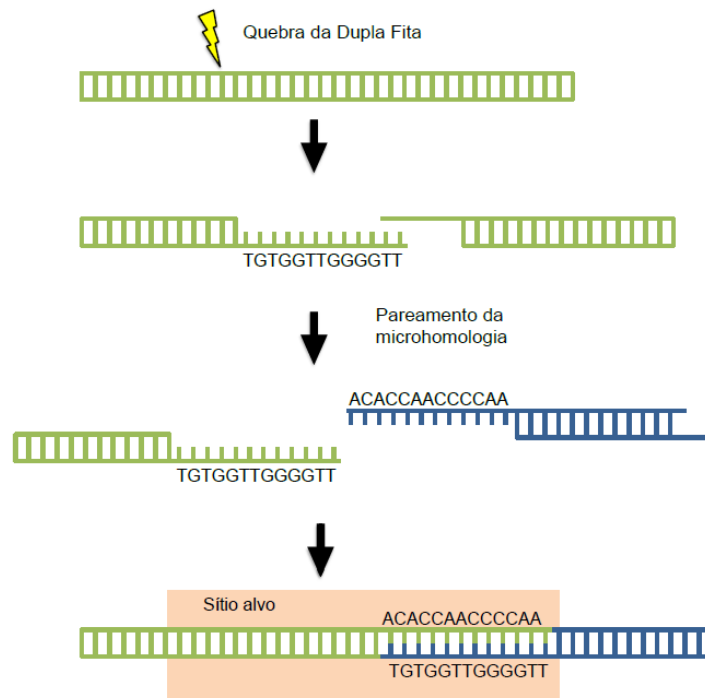


Figura 32. Modelo de integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro humano. A quebra da fita dupla do DNA do hospedeiro (em verde) seria induzida pela infecção pelo *T. cruzi*. A integração do minicírculo de kDNA (em azul) ocorreria por recombinação mediada por micro-homologia. Adaptado de Hecht e cols (2010).

Neste estudo, a maioria dos insertos em regiões repetitivas está associada aos elementos CR1, considerados quase completamente inativos no genoma da galinha. Porém, se poucos CR1 ativos, ou cópias truncadas, fossem reativados nas regiões flangeadoras do kDNA talvez sua maquinaria interna (ORF2) de transcrição reversa faça a cópia da quimera instável, possibilitando sua replicação e transposição.

O subtipo mais encontrado de CR1 nesta tese foi o CR1-L, ancestral de um elemento tipo-SINE que se associou com um CR1 tipo-LINE. Apesar de não terem sido identificados SINEs ativos no genoma da galinha, a origem desse subtipo CR1-L levanta a hipótese de que à inserção do kDNA altera a região flangeadora e ativa o elemento. A esse respeito, foi documentada inserção de kDNA em retrovírus endógeno ainda ativo no genoma da ave. As sugestões apresentadas podem ser alternadas pelas alterações na seqüência do minicírculo do kDNA integrado em associação com modificações que geram instabilidade na região vizinha, talvez, associando atividade tipo-transposon autônomo.

Neste trabalho, foi encontrado fragmento de CR1 inserido no meio de uma região repetitiva contendo inserto de kDNA. O fragmento de 145 pb de CR1 encontrado neste estudo sugere a possibilidade de associação aleatória de diferentes elementos repetitivos, ou, talvez, guiada pela inserção do kDNA no genoma. Nesta circunstância elementos truncados e inativos estariam atuando como elementos completos e ativos. A reativação de elementos repetitivos no genoma da ave poderia explicar a mobilização do kDNA para outros pontos do genoma, conforme sugerido na Figura 33. Alternativamente, o kDNA atuaria como elemento transponível que mobiliza seqüências localizadas à distância.

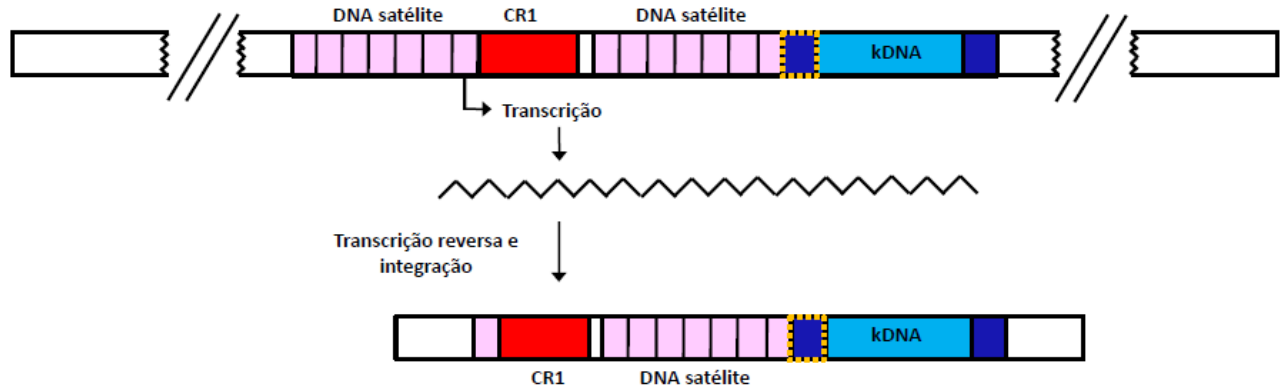


Figura 33. Esquema sugerido para reativação de elementos transponíveis inativos e truncados pela associação com outras seqüências repetitivas. O esquema ilustra a entrada do kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) num *locus* que apresenta um CR1 (vermelho) intercalado por duas regiões de DNA satélite de galinha (rosa claro). O esquema sugere mobilização do CR1 (vermelho) acompanhado de uma região da seqüência do DNA satélite (rosa claro). Aqui fica considerada a possibilidade da seqüência CR1-DNA ter o papel de 5' UTR carreador do inserto de kDNA (região conservada em azul escuro e região variável em azul claro) para outra região do genoma. O tracejado amarelo indica a região de micro-homologia.

5. Evolução do genoma relacionada à integração do kDNA no genoma

A transferência de material genético do parasito eucariota para o hospedeiro vertebrado (TGH) e a subsequente transferência vertical para os descendentes pode ter um forte impacto nos conceitos de evolução do genoma. O importante papel da TGH na inovação de genomas e evolução das espécies revela que o processo evolutivo não depende apenas de seleções adaptativas. A transferência lateral de material genético entre espécies distantes no filo, e às vezes entre espécies de diferentes reinos, colabora para o aumento da diversidade genética dos seres vivos na contemporaneidade.

Muitos estudos ainda são necessários para responder às novas perguntas que tem surgido ultimamente sobre relação entre as modificações genotípicas e as lesões autoimunes na doença de Chagas. Os resultados descritos nesta tese estendem o conhecimento sobre a origem e a composição das mutações de kDNA subsequentes à infecção do *T. cruzi* que possibilitariam o desencadeamento de mecanismos autoimunes na doença. Mas o papel de cada uma dessas mutações nas reações imunes contra o próprio corpo do chagásico ainda não foi decifrado. Em

um caso específico a mutação no gene da distrofina foi associada à fraqueza muscular e cardiomiopatia inflamatória auto-imune (Teixeira e cols, 2011a). Mutações em genes de crescimento e diferenciação celular, e de respostas imunes foram encontradas em chagásico humano (Hecht e cols. 2010).

A inoculação de *T. cruzi* em ovos férteis pode resultar em aborto, morte durante a eclosão e peri-natal. Esse desfecho pode ser relacionado à mutação deletéria de kDNA, incompatível com a sobrevivência da ave. Este tipo de mutação letal favorece a seleção negativa. Porém, na maioria dos casos as mutações neutras não produzem patologia e essas aves reproduzem progênes sadias. As mutações neutras contribuem para o crescimento do genoma e evolução pela seleção positiva. Entretanto, mutações de kDNA também têm o potencial de alterar gradualmente seqüências do genoma, via recombinações, deleções, e *hitchhiking*, produzindo novos genes, pseudogenes e *knockouts* de genes. Nesses casos as mutações representam a origem genética da patogênese que traduz em autoimunidade da doença de Chagas.

Neste trabalho foi observado que aves F0 que receberam diretamente a transferência lateral do kDNA manifestam cardiopatia autoimune de grande intensidade. Essas aves nascidas dos ovos inoculados com *T. cruzi* desenvolveram manifestações clínicas características da doença humana e evoluíram para insuficiência cardíaca. As progênes que receberam as mutações pela reprodução sexuada foram atingidas menos frequentemente pela doença manifestada no coração. Ainda que as aves F1-F3 tivessem as alterações genotípicas, seus efeitos foram atenuados em comparação com as F0. Essa atenuação ao longo das gerações é uma característica de doenças autoimunes nas famílias que mantêm apenas a mutação referente a um passado de doença que desapareceu depois de muitas gerações (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011b). Esse aspecto revela que mutações podem ter seus efeitos atenuados por mecanismos de sinalização intra-genômica favorecendo no longo prazo à evolução da espécie (Teixeira e cols, 2011a).

6. Manifestações clínicas e patológicas da doença de Chagas em aves kDNA-mutadas

A patogênese da doença de Chagas foi esclarecida em ‘modelo limpo’ para produção de cardiomiopatia em aves com mutações de kDNA (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2011a). As aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* eliminaram a infecção, mas mantiveram as

mutações de kDNA no genoma e desenvolveram cardiomegalia autoimune semelhante àquela da doença de Chagas humana. As aves controle nascidas de ovos nunca expostos ao parasito eram isentas de patologia. Este achado reforça o papel importante das mutações de kDNA no desenvolvimento do quadro clínico típico da cardiopatia chagásica. Nos estudos desenvolvidos no LMPDC vários animais de laboratório infectados com *T. cruzi* desenvolveram cardiopatia chagásica (Nitz, 2001; Teixeira e cols, 2011a, Sousa, 2012) indistinguível da miocardiopatia autoimune documentada nas aves. Como nos mamíferos, a cardiopatia nas aves também tem a característica de tempo-dependência, visto que se manifesta nos adultos. Entretanto, a infecção viva pelo *T. cruzi* foi excluída no modelo ave com mutações de kDNA e cardiopatia.

O sistema imune adaptativo dos vertebrados reconhece rapidamente estruturas moleculares em patógenos e as guarda na ‘memória’ ao longo da vida. Uma gama de receptores de reconhecimento das moléculas ‘não-próprias’ funciona sobre controle de genes das respostas imunes. Conseqüentemente o sistema imune produz moléculas efetoras que interagem com antígenos não replicáveis e microorganismos. Ao longo da evolução do sistema imune de aves e de mamíferos as moléculas efetoras das respostas imunes reconhecem antígenos ‘próprios’ e, por isso, não reagem contra o próprio corpo. A este mecanismo hipotético dá-se a designação de tolerância imunológica. Esse mecanismo de indução da tolerância requer que o sistema imunológico anule a autorreatividade natural (Schwartz, 2012). Em algumas circunstâncias a regulação genética das interações entre as moléculas efetoras do sistema imune e os antígenos teciduais pode burlar a tolerância imunológica. Nestes casos surgem autoimunidade e doenças autoimunes que escapam da tolerância central (Hedrick, 2004).

A tolerância imunológica é burlada nas aves que apresentam modificações genóticas decorrentes de mutações de kDNA e desenvolvem cardiopatia inflamatória autoimune (Teixeira e cols, 2011a). A destruição de células do coração pelos linfócitos T citotóxicos significa quebra da tolerância imune central e desregulação do mecanismo de vigilância. As células citotóxicas efetoras do sistema imune passam do papel fisiológico para o fisiopatológico devido às modificações genóticas, pois as células das aves controles saudáveis não reagem contra seu próprio tecido. Aqui cabe considerar que as células imunes efetoras com modificações genóticas e que destroem o coração da ave kDNA-positiva tem origem em linfoblastos progenitores que ganharam a mutação na primeira semana de vida embrionária (Teixeira e cols, 2011a) e, portanto, são consideradas próprias e não rejeitadas pelo sistema imune de vigilância.

A variação das manifestações clínicas nas aves mutadas com kDNA poderiam ser explicadas pela integração dos minírculos em diversos *loci* do genoma. Então, cada caso de cardiopatia chagásica tem sua dinâmica própria ainda não decodificada pelo conhecimento científico. Entretanto, o conhecimento nascente sugere que o tratamento da doença de Chagas humana requer mais que apenas droga tripanocida para eliminar a infecção na expectativa de aliviar os sintomas clínicos. Os resultados apresentados nesta tese revelam que o tratamento da cardiopatia chagásica humana precisa levar em conta a necessidade de interrupção dos efeitos das modificações genotípicas que produzem a lesão autoimune. Este conceito sugere que o tratamento efetivo precisa eliminar o repertório de linfócitos efetores citotóxicos autorreativos. A pesquisa em desenvolvimento no modelo aves congênicas de Praga indica que a ablação de progenitores dos clones de linfócitos efetores com drogas citostáticas e antimetabólitas e sua substituição pelo transplante de medula óssea sadia de ave controle, histocompatível pode interromper a destruição progressiva do coração, em caso com a doença grave. O transplante de medula óssea pode remover as células imunes autodestrutivas, mas seu uso na prática clínica ainda depende de uma droga tripanocida para erradicar a infecção chagásica. Mas, já há uma ponta de esperança para milhares de chagásicos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F; MONTEIRO, FA. **Molecular research and the control of Chagas disease vectors.** *An. Acad. Bras. Cienc.* 77(3): 437-454, 2005.

ABRUSÁN, G; KRAMBECK, HJ; JUNIER, T; GIORDANO, J; WARBURTON, PE. **Biased distributions and decay of long interspersed nuclear elements in the chicken genome.** *Genetics.* 178(1): 573-81, 2008.

ANDERSSON, JO. **Lateral gene transfer in eukaryotes.** *Cell Mol. Life Sci.* 62(11): 1182-1197, 2005.

BACON, AL; DUNLOP, MG; FARRINGTON, SM. **Hypermutability at a poly(A/T) tract in the human germline.** *Nucleic Acids Res.* 29(21): 4405-13, 2001.

BADORFF, C; LE, GH; KNOWLTON, KU. **Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex.** *Herz.* 25(3): 227-32, 2000.

BARRETT, MP; BURCHMORE, RJ; STICH, A; LAZZARI, JO; FRASCH, AC; CAZZULO, JJ; KRISHNA, S. **The trypanosomiases.** *Lancet.* 362(9394): 1469-1480, 2003.

BERN, C. **Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease.** *N Engl J Med.* 364(26): 2527-34, 2011.

BILATE, AM; CUNHA-NETO, E. **Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease.** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 50(2): 67-74, 2008.

BIOLO, A; RIBEIRO, AL; CLAUSELL, N. **Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years?** *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52(4): 300-316, 2010.

BONNEY, KM; ENGMAN, DM. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?** *Curr. Mol. Med.* 8(6): 510-518, 2008.

BONNEY, KM; TAYLOR, JM; DANIELS, MD; EPTING, CL; ENGMAN, DM. **Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity.** *PLoS One.* 6(1): e14571, 2011.

BOUCHEIX, C; DUC, GH; JASMIN, C; RUBINSTEIN, E. **Tetraspanins and malignancy.** *Expert Rev Mol Med.* 2001: 1-17, 2001

BURCH, JB; DAVIS, DL; HAAS, NB. **Chicken repeat 1 elements contain a pol-like open reading frame and belong to the non-long terminal repeat class of retrotransposons.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(17): 8199-203, 1993.

BURT, DW. **Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology.** *Poult. Sci.* 86(7): 1460-1471, 2007.

CARDOSO, CG. **LesõesTípicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma Alterado por Integração de Sequências de Minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília-DF, Brasil, 2006.

CASTRO, E. **Chagas' disease: lessons from routine donation testing.** *Transfus. Med.* 19(1): 16-23, 2009.

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

CHO, EW; PARK, JH; YOO, OJ; KIM, KL. **Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus.** *J Cell Sci.* 114(6): 1115-23, 2001.

CHONG, JP; BLOW, JJ. **DNA replication licensing factor.** *Prog Cell Cycle Res.* 2: 83-90, 1996.

COLOMBO, D. **Characterization of the tetraspanin protein tspan18.** Tese (Doctor of Philosophy - School of Clinical and Experimental Medicine). University of Birmingham, Reino Unido, 2010.

CUERVO, P; DOMONT, GB; DE JESUS, JB. **Proteomics of trypanosomatids of human medical importance.** *J. Proteomics.* 73(5): 845-867, 2010.

CUNHA-NETO, E; DURANTI, M; GRUBER, A; ZINGALES, B; DE MESSIAS, I; STOLF, N; BELLOTTI, G; PATARROYO, ME; PILLEGGI, F; KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(8): 3541-3545, 1995.

DARWIN, CR; WALLACE, AR. **On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection.** *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London.* 3: 45-50, 1858.

DEGRAVE, W; FRAGOSO, SP; BRITTO, C; VAN HEUVERSWYN, H; KIDANE, GZ; CARDOSO, MA; MUELLER, RU; SIMPSON, L; MOREL, CM. **Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 27(1): 63-70, 1988.

DELANY, ME; ROBINSON, CM; GOTO, RM; MILLER, MM. **Architecture and Organization of Chicken Microchromosome 16: Order of the NOR, MHC-Y, and MHC-B Subregions.** *Journal of Heredity.* 100(5): 507-514, 2009.

DEVERA, R; FERNANDES, O; COURA, JR. **Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(1): 1-12, 2003.

DIAS, E. **Non-receptivity of the domestic pigeon to the *Schizotrypanum* infection.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 40(2): 191-193, 1944.

ENGEL, M; HOFFMANN, T; WAGNER, L; WERMANN, M; HEISER, U; KIEFERSAUER, R; HUBER, R; BODE, W; DEMUTH, HU; BRANDSTETTER, H. **The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(9): 5063-8, 2003.

GARCIA, ES; RATCLIFFE, NA; WHITTEN, MM; GONZALEZ, MS; AZAMBUJA, P. **Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions.** *J. Insect Physiol.*53(1): 11-21, 2007.

GILBERT, C; SCHAACK, S; PACE 2ND, JK; BRINDLEY, PJ; FESCHOTTE, C. **A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla.** *Nature.* 464(7293): 1347-1350, 2010.

GIRONÈS, N; CARRASCO-MARIN, E; CUERVO, H; GUERRERO, NA; SANOJA, C; JOHN, S; FLORES-HERRÁEZ, R; FERNÁNDEZ-PRIETO, L; CHICO-CALERO, I; SALGADO, H; CARRIÓN, J; FRESNO, M. **Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1107: 434-444, 2007.

GIRONÈS, N; CUERVO, H; FRESNO, M. ***Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 296: 89-123, 2005.

GLICK, B. Immunophysiology. In: Causey Whittow, G. **Sturkie's Avian Physiology.** 5. ed. Maryland Heights: Elsevier, 2000. 704 p. cap. 5, p. 657-670.

GUTIERREZ, FR; GUEDES, PM; GAZZINELLI, RT; SILVA, JS. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite Immunol.* 31(11): 673-685, 2009.

HECHT, MM; NITZ, N; ARAUJO, PF; SOUSA, AO; ROSA, AC; GOMES, DA; LEONARDECZ, E; TEIXEIRA, ARL. **Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts.** *PLoS One.* 5(2): e9181, 2010.

HEDRICK, SM. **The acquired immune system: a vantage from beneath.** *Immunity.* 21(5): 607-15, 2004.

HUDA, A; POLAVARAPU, N; JORDAN, IK; MCDONALD, JF. **Endogenous retroviruses of the chicken genome.** *Biol Direct.* 3: 9, 2008.

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (ICGSC). **Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution.** *Nature.* 432(7018): 695-716, 2004.

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

JURKA, J. (1999) **CR1L.** *Rebase Rep.* http://www.girinst.org/protected/rebase_extract.php?access=CR1L&format=EMB. Acessado em 20/10/2012.

KATZ, LA. **Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(5): 1893-1900, 2002.

KAZAZIAN, HH JR. **Mobile elements: drivers of genome evolution.** *Science.* 303(5664): 1626-32, 2004.

KAZAZIAN, HH JR. **Mobile DNA transposition in somatic cells.** *BMC Biol.* 9: 62, 2011.

KEELING, PJ. **Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19(6): 613-619, 2009.

KEELING, PJ; PALMER, JD. **Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution.** *Nat. Rev. Genet.* 9(8): 605-618, 2008.

KIERSZENBAUM, F; GOTTLIEB, CA; BUDZKO, DB. **Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection.** *J. Parasitol.* 67(5): 656-660, 1981.

KIERSZENBAUM, F; IVANYI, J; BUDZKO, DB. **Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Immunology.* 30: 1-6, 1976.

KIVITY, S; AGMON-LEVIN, N; BLANK, M; SHOENFELD, Y. **Infections and autoimmunity--friends or foes?** *Trends Immunol.* 30(8): 409-414, 2009.

KLINGBEIL, MM; DREW, ME; LIU, Y; MORRIS, JC; MOTYKA, SA; SAXOWSKY, TT; WANG, Z; ENGLUND, PT. **Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication.** *Protist.* 152(4): 255-262, 2001.

KLINGBEIL, MM; ENGLUND, PT. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication.** *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 101(13): 4333-4334, 2004.

KOHANY, O; GENTLES, AJ; HANKUS, L; JURKA, J. **Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor.** *BMC Bioinformatics.* 7:474, 2006.

KORDIS, D. **Transposable elements in reptilian and avian (sauropsida) genomes.** *Cytogenetic Genome Res.* 127(2-4): 94-111, 2009.

KOVALSKAYA, E; BUZDIN, A; GOGVADZE, E; VINOGRADOVA, T; SVERDLOV, E. **Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions.** *Virology*. 346(2): 373-8, 2006.

LAURIA-PIRES, L; BRAGA, MS; VEXENAT, AC; NITZ, N; SIMÕES-BARBOSA, A; TINOCO, DL; TEIXEIRA, AR. **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** *Am J Trop Med Hyg*. 63(3-4): 111-8, 2000.

LEE, SH; ELDI, P; CHO, SY; RANGASAMY, D. **Control of chicken CR1 retrotransposons is independent of Dicer-mediated RNA interference pathway.** *BMC Biol*. 7: 53, 2009.

LEON, JS; ENGMAN, DM. **Autoimmunity in Chagas heart disease.** *Internacional Journal of Parasitology*. 31: 555-561, 2001.

LEWIN, B. Transposons. In: Lewin, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001. 7 ed. p. 435-461.

LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, SA; AGBO, EE; ENGLUND, PT. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *Trends Parasitol*. 21(8): 363-369, 2005.

LIU, YG; WHITTIER, RF. **Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking.** *Genomics*. 25: 674-681, 1995.

LIU, Z; HE, L; YUAN, H; YUE, B; LI, J. **CR1 retroposons provide a new insight into the phylogeny of Phasianidae species (Aves: Galliformes).** *Gene*. 502(2): 125-32, 2012.

LORETO, EL; CARARETO, CM; CAPY, P. **Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*.** *Heredity*. 100(6): 545-554, 2008.

LUKES, J; GUILBRIDE, DL; VOTÝPKA, J; ZÍKOVÁ, A; BENNE, R; ENGLUND, PT.

Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot. Cell.* 1(4): 495-502, 2002.

LUKES, J; HASHIMI, H; ZÍKOVÁ, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates.** *Curr. Genet.* 48(5): 277-299, 2005.

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

NERY-GUIMARÃES, F; LAGE, HA. **A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. II – Refratariedade das galinhas desde o nascimento; persistência da refratariedade após bursectomia; infecções em ovos embrionados.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 70(1): 97-107, 1972.

NITZ, N. **Evidência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de coelhos chagásicos.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília-DF, Brasil, 2001.

NITZ, N; GOMES, C; ROSA, AC; D’SOUZA-AULT, MR; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, ARL. **Heritable integration of kDNA minicircles sequences from *Trypanosoma cruzi* into avian genome: Insight into Human Chagas Disease.** *Cell.* 118(2): 175-186, 2004.

PÉREZ-MORGA, DL; ENGLUND, PT. **The attachment of minicircles to kinetoplast DNA networks during replication.** *Cell.* 74(4): 703-711, 1993.

PRADO, CM; CELES, MR; MALVESTIO, LM; CAMPOS, EC; SILVA, JS; JELICKS, LA; TANOWITZ, HB; ROSSI, MA. **Early dystrophin disruption in the pathogenesis of experimental chronic Chagas cardiomyopathy.** *Microbes Infect.* 14(1): 59-68, 2012.

PROMEGA. **Protocols and Application Guide.** *Promega Corporation*, cap. 3. V 45, 1996.

RAY, DS. **Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes.** *Mol Cell Biol.* 9(3): 1365–1367, 1989.

ROGERS, SL; VIERTLBOECK, BC; GÖBEL, TW; KAUFMAN, J. **Avian NK activities, cells and receptors.** *Semin. Immunol.* 20(6): 353-360, 2008.

RUBINSTEIN, E. **The complexity of tetraspanins.** *Biochem Soc Trans.* 39(2): 501-5, 2011.

SAMBROOK, J; RUSSEL, DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3ed.

SÁNCHEZ, LV; RAMÍREZ, JD. **Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects.** *Parasitology.* 25: 1-13, 2012.

SANTOS-BUCH, CA; TEIXEIRA, ARL. **The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** *J. Exp. Med.* 140(1): 38-53, 1974.

SCHAACK, S; GILBERT, C; FESCHOTTE, C. **Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution.** *Trends Ecol. Evol.* 25(9): 537-546, 2010.

SCHWARTZ, RH. **Historical overview of immunological tolerance.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(4): a006908, 2012.

SFRISO, P; GHIRARDELLO, A; BOTSIOS, C; TONON, M; ZEN, M; BASSI, N; BASSETTO, F; DORIA, A. **Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship.** *J. Leukoc. Biol.* 87(3): 385-395, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, MA; CARVALHO, NB. **Oral transmission of Chagas disease.** *Clin Infect Dis.* 54(6):845-52, 2012.

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

SOUSA, AO. **Transferência de DNA de *Trypanosoma cruzi* para retrotransposons LINE-1 de camundongos chagásicos tratados com nitroderivado benzonidazol.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília-DF, Brasil, 2012.

ST JOHN, J; QUINN, TW. **Identification of novel CR1 subfamilies in an avian order with recently active elements.** *Mol Phylogenet Evol.* 49(3): 1008-14, 2008a.

ST JOHN, J; QUINN, TW. **Recent CR1 non-LTR retrotransposon activity in coscoroba reveals an insertion site preference.** *BMC Genomics.* 9: 567, 2008b.

STUIVER, M; LAINEZ, S; WILL, C; TERRY, S; GÜNZEL, D; DEBAIX, H; SOMMER, K; KOPPLIN, K; THUMFART, J; KAMPIK, NB; QUERFELD, U; WILLNOW, TE; NĚMEC, V; WAGNER, CA; HOENDEROP, JG; DEVUYST, O; KNOERS, NV; BINDELS, RJ; MEIJ, IC; MÜLLER, D. **CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia.** *Am J Hum Genet.* 88(3): 333-43, 2011.

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

TAKEUCHI, F; ISONO, M; KATSUYA, T; YAMAMOTO, K; YOKOTA, M; SUGIYAMA, T; NABIKA, T; FUJIOKA, A; OHNAKA, K; ASANO, H; YAMORI, Y; YAMAGUCHI,

S; KOBAYASHI, S; TAKAYANAGI, R; OGIHARA, T; KATO, N. **Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population.** *Circulation.* 121(21): 2302-9, 2010.

TANOWITZ, HB; MACHADO, FS; JELICKS, LA; SHIRANI, J; DE CARVALHO, AC; SPRAY, DC; FACTOR, SM; KIRCHHOFF, LV; WEISS, LM. **Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease).***Prog. Cardiovasc. Dis.* 51(6): 524-539, 2009.

TEIXEIRA, A. Patologia da doença de Chagas humana. In: Teixeira, A. **Doença de Chagas e evolução.** Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2007. 1 ed. p. 89-101.

TEIXEIRA, ARL; ARGANÃRAZ, ER; FREITAS, JR; LAÇAVA, ZGM; SANTANA, JM; LUNA, H. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mut. Res.* 305: 197-209, 1994.

TEIXEIRA, ARL; GOMES, C; NITZ, N; SOUSA, AO; ALVES, RM; GUIMARO, MC; CORDEIRO, C; BERNAL, FM; ROSA, AC; HEJNAR, J; LEONARDECZ, E; HECHT, M. **Trypanosoma cruzi in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism.** *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 5(3): e1000, 2011a.

TEIXEIRA, AR; HECHT, MM; GUIMARO, MC; SOUSA, AO; NITZ N. **Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity.** *Clin Microbiol Rev.* 24(3): 592-630, 2011b.

TEIXEIRA, AR; JUNQUEIRA JÚNIOR, LF; SOLÓRZANO, E; ZAPPALÁ, M. **Experimental Chagas' disease in isogenic III/J rabbits. I. Physiopathology of arrhythmia and sudden death in Chagas' disease patients.** *AMB Rev Assoc Med Bras.* 29(5-6): 77-83, 1983.

TEIXEIRA, AR; NITZ, N; GUIMARO, MC; GOMES, C; SANTOS-BUCH, CA. **Chagas disease.** *Postgrad Med. J.* 82(974): 788-798, 2006.

TEIXEIRA, AR; SANTOS-BUCH, CA. **The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens.** *Immunology*. 28(3): 401-10, 1975.

THOMPSON, JD; HIGGINS, DG; GIBSON, TJ. **Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap 105 penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-80, 1994.

VALDEZ Jr, MB; MIZUTANI, M; FUJIWARA, A; YAZAWA, H; YAMAGATA, T; SHIMADA, K; NAMIKAWA, T. **Histocompatible Chicken Inbred Lines: Homogeneities in the Major Histocompatibility Complex Antigens of the GSP, GSN/1, PNP/DO and BM-C Inbred Lines Assessed by Hemagglutination, Mixed Lymphocyte Reaction and Skin Transplantation.** *Experimental Animals*. 56 (5): 329-338, 2007.

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

WELLS, RD; DERE, R; HEBERT, ML; NAPIERALA, M; SON, LS. **Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological disease.** *Nucleic Acids Res.* 33(12): 3785-98, 2005.

WICKER ,T; ROBERTSON, JS; SCHULZE, SR; FELTUS, FA; MAGRINI, V; MORRISON, JA; MARDIS, ER; WILSON, RK; PETERSON, DG; PATERSON, AH; IVARIE, R. **The repetitive landscape of the chicken genome.** *Genome Res.* 15(1): 126-36. 2005.

WICKER ,T; SABOT, F; HUA-VAN, A; BENNETZEN, JL; CAPY, P; CHALHOUB, B; FLAVELL, A; LEROY, P; MORGANTE, M; PANAUD, O; PAUX, E; SANMIGUEL, P; SCHULMAN, AH. **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** *Nat Rev Genet.* 8(12): 973-82, 2007.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** Geneva, WHO, 2011 (http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/, acessado em outubro de 2012).

YORK, IA; GOLDBERG, AL; MO, XY; ROCK, KL. **Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation.** *Immunol. Rev.* 172: 49-66, 1999.

YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity.** *Parasitol. Int.* 57(2): 105-109, 2008.

ANEXO I

Tabela A1. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi*.

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
1	K1-527 (F0)	MG266	1-285	284-460	CC	1e ⁻¹³⁶	Indeterminado	NW_001479132.1 (Indeterminado)	1e ⁻²⁹	78%
		MG513	427-682	1-447	TATAATGTACGGG GGAGATGC	1e ⁻¹¹⁹	5	NW_003763785.1 (fator de transcrição SOX-6)	0.0	98%
		MG517	321-611	1-328	GACCGCCC	6e ⁻¹³⁶	2	NW_003763668.1 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁵⁶	98%
1	K1-207 (F1)	MG525	102-182	1-101	-	6e ⁻²⁸	14	NW_003763931.1 (Indeterminado)	5e ⁻⁴²	98%
		MG529	166-453	1-98 / 99-174	GACCGCCCC	5e ⁻²²	14 / 5	NW_003763931.1 (Indeterminado) / NW_003763785.1 (Indeterminado)	1e ⁻³⁵ / 6e ⁻²⁷	95% / 97%
1	K1-202 (F1)	MG063	1-137	128-599	CAATCGAACC	4e ⁻⁰⁶	20	NW_003764128.1 (Indeterminado)	0.0	96%
		MG066	173-441	1-185	GACCCCCCTCCC	2e ⁻⁰⁶	3	NW_001471668.2 (palmitoiltransferase ZDHHC14, isoformas 1 e 2)	4e ⁻⁸⁷	99%
		MG069	236-317	1-247	GAACCCCCCTCC	6e ⁻¹⁰	2	NW_001471639.1 (Indeterminado)	7e ⁻¹¹³	96%
		MG075	102-244	1-125	GAAGCCCCCTCCC AAAACCATAAT	4e ⁻²³	8	NW_001471740.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁴²	91%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG076	523-647	1-538	AAATAATGTACGG GGG	4e ⁻²²	8	NW_001471740.1 (Indeterminado)	0.0	95%
		MG078	148-290	1-155	GACCGCCC	1e ⁻⁵⁶	1	NW_001471551.1 (Similar a protocaderina-9 isoforma 1 e 2)	2e ⁻⁶⁸	97%
1	K1-224 (F1)	MG341	102-316	1-110	GAACCCCCC	3e ⁻⁴⁶	9	XM_419045.2 (ORF 4 do cromossomo 9 - C9orf4)	1e ⁻²⁵	86%
		MG343	86-361	1-103	GAACCCCCCTCCC AAAAC	1e ⁻⁶⁴	Indeterminado	NW_001477517.1 (Indeterminado)	7e ⁻³²	92%
		MG344	89-414	1-98	TGAACGCCCC	3e ⁻⁹⁹	8	NW_001471740.1 (Similar a proteína tirosina fosfatase receptora tipo F – PTPRF)	9e ⁻³¹	92%
		MG347	55-261	1-70 / 253-379	GAACGCCCTCCC AA A / AACCATTAT	2e ⁻⁹⁵	1 / Indeterminado	NW_001471556.1 (Indeterminado) / NW_001479132.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁵ / 1e ⁻¹⁶	89% / 76%
		MG348	192-457	1-199	TTTGAACG	1e ⁻¹³⁰	1	NW_001471512.1 (Tetraspanina 12)	4e ⁻⁹³	99%
		MG349	152-485	1-166	ATAA TGTACGGTGA	4e ⁻¹¹¹	13	NW_001471446.1 (Indeterminado)	8e ⁻⁷¹	96%
		MG352	197-468	1-208	CCCTTCCCAAAA	2e ⁻⁷¹	Indeterminado	NW_001475305.1 (Similar a proteína FLJ20433)	3e ⁻⁷⁶	94%
		MG353	265-590	1-281	GACGGCCCCCTCCC AAAA	2e ⁻¹¹⁵	2	NW_001471633.1 (Indeterminado)	3e ⁻¹³³	98%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG354	91-233	1-108	GAACCCCCCTCCC AAAAC	1e ⁻⁵⁵	2	NW_001471633.1 (Similar a fator 1 de domínio-POU derivado da retina)	4e ⁻³²	95%
		MG355	407-549	1-408	GA	7e ⁻⁵⁸	1	NW_001471519.1 (Proteína hipotética)	0.0	99%
1	K1-662 (F2)	MG174	71-391	1-93	ATAATGTACGGGT GA GATGCATG	3e ⁻²¹	15	NW_001471461.1 (Indeterminado)	3e ⁻³¹	93%
		MG175	223-513	1-234	GACGGCCCCCTCC	2e ⁻⁰⁶	Z	AC193222.4 (Indeterminado)	8e ⁻¹⁰⁰	93%
1	K1-613 (F2)	MG177	1-68	51-393	TCGAACCATCTATC CCAA	3e ⁻⁰⁹	16	NW_001471464.1/ AB268588.1 (Região de MHC - tenascina-XB)	7e ⁻¹⁶⁵	97%
		MG179	61-133	1-76	GATAATGTACGGG TGA	2e ⁻¹⁷	11	NW_001471434.1 (Metaloproteinase de matriz 2 - MMP2)	3e ⁻²⁴	93%
		MG180	194-353	1-202	ATAATGTAC	1e ⁻²⁰	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	2e ⁻⁹⁵	98%
1	K1-617 (F2)	MG158	1-283	263-506	TACACCAACCCCA ATCGA ACC	1e ⁻¹³⁴	1	NW_001471554.1 (Similar ao fator de crescimento B derivado da medula espinal- SCDGF-B)	5e ⁻¹¹¹	96%
		MG160	1-286	270-465	CCAACCCCAATCG AACC	2e ⁻¹³⁴	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	9e ⁻⁸⁹	97%
		MG161	1-286	276-400	CCAATCGAACC	6e ⁻⁰⁵	5	NW_003763785.1 (Tetraspanina-18)	1e ⁻⁵⁴	98%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
1	K1-616 (F2)	MG192	1-81	61-169	TACACCAACCCCA ATCGAACC	0.002	1	NW_001471554.1 (Indeterminado)	6e ⁻³⁵	90%
		MG198	1-279	262-457	CCAACCCCAATCG AACCC	4e ⁻¹⁴	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹¹	98%
		MG199	1-284	262-457	CCAACCCCAATCG AACCCACCAT	1e ⁻¹³³	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹⁰	97%
		MG201	1-276	261-449	CCAACCCCAATCG AAC	3e ⁻²¹	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	1e ⁻⁸⁶	97%
		MG202	1-291	275-496	CCAACCCCAATCG AACCC	2e ⁻¹⁴⁴	3	NW_001471679.1 (Indeterminado)	4e ⁻¹⁰⁰	96%
		MG204	184-468	1-197	GGACGCCCTCC C	8e ⁻⁰⁸	2	NW_001471633.1 (Similar ao gene B1 responsivo ao hormônio da paratireóide - gene PTHB1)	3e ⁻⁸⁸	96%
1	K1-652 (F2)	MG206	1-94	86-536	AATCGAACC	0.002	10	NW_001471429.1 (Indeterminado)	0.0	99%
		MG207	1-281	263-315	CACCAACCCCAAT CGAACC	2e ⁻⁰⁴	1	NW_001471548.1 (Proteína hipotética)	3e ⁻¹¹	90%
2	K1-581 (F0)	MG299	51-315	1-59	TGAACGCCC	2e ⁻¹⁰⁵	5	NW_001471710.1 (Indeterminado)	5e ⁻²⁰	99%
		MG301	64-327	1-80	GAACGCCCTCCC AAAA	2e ⁻¹⁰⁶	21	NW_001471571.1 (Proteína hipotética)	1e ⁻²⁷	97%
		MG303	49-338	1-63	GAAGCCCCCTCCC AA	2e ⁻⁹⁹	22	NW_001471585.1 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁸	94%
2*	K1-162 (F0)	MG505	306-391	1-324	GACCGCCCCTCCC AAAACC	5e ⁻¹⁰	3	NW_001471668.2 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁴⁵	96%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
2	K1-669 (F1)	MG374	1-152	140-461	GGGAGATGCGTGA	2e ⁻⁵³	2	NW_001471654.1 (Similar a RIM2-5B)	2e ⁻¹⁵³	98%
		MG375	1-149	127-262	ATATAATGTACGG GTGAGATGCA	1e ⁻⁵⁴	1	NW_001471554.1 (Similar ao fator de crescimento B derivado da medula espinhal- SCDGF-B)	3e ⁻⁵⁵	96%
		MG377	268-489	1-288	AATTTTGAAGGCC CCTCCCAA	8e ⁻⁶⁶	2	NW_001471637.1 (Similar a proteína 1 tipo 1 associada à subunidade regulatória do CDK5- CDKAL1)	2e ⁻¹⁴¹	99%
		MG378	185-381	1-195	ATAATGTACGG	7e ⁻⁵⁴	14	NW_001471454.1 (Similar a proteína de chechagem mitótica)	6e ⁻⁹⁰	98%
		MG379	86-362	1-103	GAACCCCCCTCCC AAAAC	6e ⁻⁹³	Indeterminado	NW_001476599.1 (Indeterminado)	7e ⁻³²	92%
		MG380	269-485	1-272	TGAA	5e ⁻⁶²	10	NW_001471426.1 (Protogenina)	2e ⁻¹²¹	95%
		MG382	125-560	1-137	GACCCCCCTCCC	6e ⁻¹¹⁶	8	NW_001471740.2 (Indeterminado)	2e ⁻⁵²	94%
		MG383	71-165	1-79	TGAAGCCCC	1e ⁻²⁹	1	NW_001471534.1 (Indeterminado)	6e ⁻²⁸	95%
		MG385	134-393	1-145	CCCTCCCAAAA	8e ⁻¹⁰⁰	Indeterminado	NW_001475305.1 (Similar à proteína FLJ20433)	3e ⁻⁵⁰	96%
		MG388	67-203	1-88	AATAATGTACGGG GGAGATGCA	4e ⁻⁴⁹	6	NW_001471715.1 (Indeterminado)	2e ⁻²⁹	94%
		MG389	68-264	1-88	ATAATGTACGGGG GAGATGCA	1e ⁻⁵⁶	6	NW_001471715.1 (Indeterminado)	2e ⁻²⁹	94%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
2	K1-8378 (F1)	MG390	51-320	1-73	AACCTGAACCCCC CTCCCAAAC	3e ⁻¹⁰³	4	NW_001471681.1 (Indeterminado)	1e ⁻²¹	94%
		MG357	251-393	1-262	TGACGGCCCCTC	1e ⁻⁵⁴	3	NW_001471669.1 (Similar a fosfodiesterase 7B)	6e ⁻¹¹⁵	96%
		MG359	86-411	1-103	GAAGCCCCCTCCC AAAAC	6e ⁻¹³³	Indeterminado	NW_001476599.1 (Indeterminado)	8e ⁻³²	92%
		MG361	335-497	1-339	GTGAC	2e ⁻⁷¹	7	NW_001471733.1 (Indeterminado)	8e ⁻¹⁷²	99%
		MG362	181-384	1-193	GACGGCCCCTCCC	2e ⁻⁸³	1	NW_001471550.1 (Indeterminado)	7e ⁻⁸³	96%
		MG363	264-468	1-284	TGAAGCCCCCTCCC AAAACCA	2e ⁻⁸⁴	2	NW_001471638.1 (Similar a GDP- manose 4,6 dehidratase)	2e ⁻¹¹⁵	97%
		MG365	301-429	1-319	TGAACCCCCCTCCC AAAAC	4e ⁻⁵⁵	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁴³	96%
		MG366	122-325	1-134	GACCGCCCCTCCC	8e ⁻⁸⁶	8	NW_001471740.2 (Indeterminado)	2e ⁻⁴⁹	93%
		MG368	264-468	1-281	TGACCGCCCCTCCC AAAA	5e ⁻⁸⁶	2	NW_001471633.1 (Indeterminado)	3e ⁻¹³³	98%
		MG370	152-350	1-163	CCCTTCCCAAAA	1e ⁻⁸²	1	NW_001471513.1 (Indeterminado)	3e ⁻⁵⁵	96%
		MG372	1-277	265-365	GGAGGGGGCGTCA	2e ⁻¹²⁰	18	NW_001471505.1 (Proteína hipotética)	7e ⁻³⁸	97%
MG373	1-311	300-400	GGAGGGGGGTTC	3e ⁻⁹²	18	NW_001471505.1 (Proteína hipotética)	4e ⁻³¹	90%		
2	K1-400 (F1)	MG019	418-480	1-437	ATAATGTACGGGG GAGATGC	6e ⁻¹²	5	NW_001471698.1 (Proteína hipotética)	0.0	96%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG020	90-397	1-103	GAAGCCCCCTCCC A	1e ⁻⁹⁵	1	NW_001471513.1 (Similar a proteína de ligação ao domínio SH3 tipo 1)	4e ⁻⁴¹	97%
		MG028	109-396	1-120	CCCTTCCCAAAA	2e ⁻¹³³	1	NW_001471526.1 (Proteína de membrana associada ao sistema límbico)	7e ⁻³⁹	88%
		MG032	143-433	1-143	A	2e ⁻¹³¹	1	NW_001471534.1 (piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 3)	5e ⁻⁵³	92%
2	K1-486 (F1)	MG539	424-559	1-443	ATAATGTACGGGG GAGATGC	1e ⁻⁴⁹	5	NW_003763785.1 (fator de transcrição SOX-6)	0.0	98%
		MG541	236-376	1-252	ATAATGTACGGGT GAGA	4e ⁻⁶¹	3	NW_001471673.2 (precursor da proteína 17 contendo domínio de desintegrina e metaloproteinase)	3e ⁻¹¹⁹	98%
		MG543	834-920	1-851	ATGGTATGAACCT CCCTC	2e ⁻¹²⁷	1	NW_003763584.1 (Indeterminado)	0.0	96%
		MG545	229-418	1-244	GAACGCCCTCCC AAA	4e ⁻⁸⁰	15	NW_003763985.1 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁰⁸	96%
		MG547	81-446	1-101	ATAATGTACGGGT GAGATGCA	2e ⁻¹⁷¹	2	NW_003763673.1 (Indeterminado)	4e ⁻³⁶	94%
2	K1-454 (F1)	MG444	231-524	1-236	GAAGCC	2e ⁻²⁸	7	NW_003763822.1 (proteína dedo de zinco 804A)	4e ⁻¹¹³	99%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG531	1-203	197-525	GAGATGC	1e ⁻⁹³	15	NW_003763985.1 (Proteína 2 contendo domínio de WSC de ligação a carboidrato)	6e ⁻¹⁶¹	98%
		MG532	1-455	433-1065	CATATAATGTACG GGTGAGATGC	0.0	1	NW_003763645.1 (Indeterminado)	0.0	96%
		MG533	1-296	285-705	CCCAATCGAACC	9e ⁻¹⁴¹	7	NW_003763823.1 (colágeno alfa-1 (VI) precursor de cadeia)	0.0	97%
		MG536	161-555	1-160	-	2e ⁻¹¹⁸	1	NW_001471534.2 (piruvato desidrogenase quinase, isoenzima3)	6e ⁻⁶³	94%
		MG537	142-640	1-148	GAACGCC	1e ⁻¹³¹	4	NW_001471685.2 (proteína de ligação precursora da beta- amilóide A4, família B, membro 2)	3e ⁻⁵³	92%
		MG538	147-418	1-165	GACCCCCCTCCCA AAACC	1e ⁻⁹²	2	NW_003763668.1 (fator de iniciação de tradução 1b)	3e ⁻⁶²	94%
2	K1-661 (F2)	MG424	270-546	1-288	GAAGCCCCCTCCC AAAACC	1e ⁻¹²⁵	1	NW_003763584.1 (subunidade gama-3 do receptor gama- aminobutírico)	6e ⁻¹³⁶	98%
		MG431	707-985	1-713	GAACGCC	3e ⁻¹³⁶	6	NW_003763812.1 (Indeterminado)	0.0	97%
2	K1-633 (F2)	MG214	1-286	269-464	CCAACCCCAATCG AACCC	3e ⁻⁰⁷	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	1e ⁻⁸⁷	96%
		MG215	71-403	1-90	ATAATATACGGGT GAGATGC	5e ⁻¹⁹	15	NW_001471461.1 (Indeterminado)	1e ⁻²⁸	91%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
2	K1-620 (F2)	MG083	1-281	271-492	CCAATCGAACC	4e ⁻⁵²	1	NW_001471549.1 (Indeterminado)	4e ⁻⁸⁶	91%
		MG084	1-285	277-564	AATCGAACC	2e ⁻⁶²	15	NW_001471461.1 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁴⁰	98%
2	K1-683 (F2)	MG110	185-408	1-197	GACGCCCCCTCCC	6e ⁻¹⁰⁸	2	NW_001471633.1 (Similar ao gene B1 responsivo ao hormônio da paratireóide - gene PTHB1)	2e ⁻⁸⁹	97%
		MG112	185-447	1-197	GAACCCCCCTCCC	3e ⁻¹²⁵	2	NW_003763668.1 (proteína PTHB1 - proteína B1 responsiva ao hormônio da paratireóide)	6e ⁻⁸⁴	95%
2	K1-646 (F2)	MG097	1-293	280-380	ACCCAATCGAAC C	2e ⁻⁰⁴	3	NW_001471679.1 (Similar à proteína Eml4)	5e ⁻⁴⁰	97%
2	K1-735 (F3)	MG397	1186- 1479	1-1189	TTGA	3e ⁻¹⁴⁴	2	NW_001471639.1 (Indeterminado)	0.0	99%
		MG399	288-579	1-305	GAACGCCCCCTCCC AAAAC	1e ⁻¹⁴³	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	3e ⁻¹³⁴	94%
3	K1-331 (F0)	MG309	47-311	1-60	GAACGCCCCCTCCC A	5e ⁻¹⁰¹	3	NW_001471667.1 (Similar ao homólogo da proteína bege)	8e ⁻¹⁸	95%
		MG310	403-670	1-416	CTTGAACCCCCCTC	4e ⁻¹⁰⁰	4	NW_001471687.1 (Indeterminado)	0.0	98%
		MG312	1218- 1435	1-1222	GGTAG	3e ⁻⁷⁶	3	NW_001471668.1 (Indeterminado)	0.0	96%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG314	75-344	1-88	AACCTGAACCCCC C	2e ⁻¹⁰⁰	3	NW_001471671.1 (Indeterminado)	6e ⁻³²	96%
		MG316	481-615	1-488	ATAATGTA	6e ⁻⁴⁷	1	NW_001471545.1 (Proteína hipotética)	0.0	99%
		MG318	406-845	1-416	GAAGCCCCCTC	4e ⁻¹¹⁴	4	NW_001471687.1 (Indeterminado)	0.0	98%
		MG322	398-843	1-420	GAACGCCCTCCC AAAACCACAG	6e ⁻¹⁷⁵	25	NW_001471602.1 (Indeterminado)	0.0	96%
3	K1-516 (F1)	MG001	193-482	1-194	GA	9e ⁻⁰⁴	2	NW_001471633.1 (Indeterminado)	3e ⁻⁵³	95%
		MG002	345-636	1-86 / 87-360	TTGAAGCCCCCTCC CA	3e ⁻⁰⁵	15 / 2	NW_001471461.1 (Indeterminado)/ NW_001471646.1 (Indeterminado)	3e ⁻³³ / 6e ⁻¹³¹	96%
		MG003	267-558	1-268	GA	2e ⁻⁰⁵	2	NW_001471633.1 (Indeterminado)	5e ⁻¹²⁵	99%
		MG004	43-333	1-58	GAACCCCCCTCCC AAA	3e ⁻⁰⁷	4	NW_001471688.1 (Indeterminado)	4e ⁻¹⁶	93%
		MG005	262-524	1-275	GAACGCCCTCCC A	2e ⁻⁰⁵	12	NW_001471441.1 (Indeterminado)	8e ⁻⁵²	99%
		MG006	194-327	1-202	ATAATGTAC	2e ⁻²¹	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	2e ⁻⁹⁵	98%
		MG011	1-150	145-335	CATTAT	9e ⁻²¹	2	NW_001471633.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁶⁴	87%
		MG016	142-216	1-160	GACCCCCCTCCCA AAACC	2e ⁻²⁸	1	NW_001471534.2 (piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 3)	5e ⁻⁶⁸	96%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG018	521-585	1-534	AAATAATGTACGG G	6e ⁻¹³	8	NW_001471740.1 (Indeterminado)	0.0	99%
3	K1-308 (F1)	MG455	102-399	1-107	AAAGTG	8e ⁻¹⁴⁵	19	NW_003764121.1 (polipeptídeo putativo N-acetilgalacto- saminiltransferase tipo proteína 3)	6e ⁻⁴⁶	99%
		MG456	296-558	1-308	GAACCCCCCTCCC	6e ⁻¹²⁹	1	NW_003763493.1 (Indeterminado)	5e ⁻¹⁴³	97%
		MG458	304-593	1-313	GAACCCCCCT	5e ⁻¹⁴³	3	NW_001471668.2 (Indeterminado)	3e ⁻¹⁴⁷	97%
		MG459	421-686	1-442	TTTGACCCCCCTC CCAAAACC	2e ⁻¹¹¹	2	NW_003763661.1 (precursor da integrina alfa-8)	0.0	97%
		MG463	137-203	1-146	AAAATAATAA	7e ⁻²²	3	NW_003763720.1 (Indeterminado)	1e ⁻⁶³	97%
		MG464	760-813	1-767	TATAGTGT	2e ⁻⁰⁴	Indeterminado	NW_003764339.1 (Indeterminado)	0.0	98%
		MG469	204-328	1-210	CATAATG	1e ⁻⁴⁶	2	NW_003763661.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁰³	100%
3 **	K1-583 (F1)	MG324	1-148	142-251	GAGATGC	5e ⁻⁵³	5	NW_001471698.1 (Homólogo ao Dickkopf 3-DKK3)	6e ⁻⁴³	97%
		MG325	1-94	77-869	ACCAACCCCAATG GAACC	1e ⁻³²	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	0.0	99%
		MG326	1-94	80-534	AACCCCAATGGAA CC	5e ⁻³²	17	NW_001471503.1 (Indeterminado)	0.0	93%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG327	1-100	79-217	CAACCCCAATGGA ACCAGACCT	1e ⁻³²	17	NW_001471503.1 (Proteína O- manosiltransferase 1 - POMT1)	7e ⁻⁶¹	98%
		MG328	301-395	1-319	TGAACGCCCTCCC AAAAC	2e ⁻³²	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁴³	96%
		MG329	194-329	1-202	ATAATGTAC	2e ⁻⁵⁷	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	2e ⁻⁹⁵	99%
		MG330	150-244	1-165	TGAACGCCCTCCC AA	2e ⁻³²	11	NW_001471432.1 (Domínio repetitivo WD 59)	3e ⁻⁵³	93%
		MG331	240-334	1-253	TGAACGCCCTCCC	7e ⁻³²	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁰⁹	95%
		MG332	341-738	1-349	GAACCCCCC	1e ⁻¹¹⁰	13	NW_001471449.1 (Indeterminado)	1e ⁻¹⁶⁶	98%
		MG335	125-647	1-127	GAC	4e ⁻¹⁵¹	8	NW_001471740.2 (Indeterminado)	1e ⁻⁵⁰	96%
		MG336	139-484	1-163	ATTCTCACTTCCTC CCTCCCAAAA	3e ⁻¹¹¹	1	NW_001471513.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁵³	95%
		MG434	302-589	1-319	GACCCCCCTCCCA AAAC	3e ⁻¹⁴⁰	3	NW_001471673.2 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁴²	95%
		MG435	301-540	1-319	GAACGCCCTCCC AAAACC	8e ⁻¹¹⁷	3	NW_001471673.2 (Indeterminado)	6e ⁻¹⁴²	96%
		MG436	265-358	1-284	GAACGCCCTCCC AAAACCA	2e ⁻³³	2	NW_003763673.1 (Indeterminado)	5e ⁻¹²²	95%
3	K1-585 (F1)	MG445	99-162	1-108	CATAATGTAC	4e ⁻²³	8	NW_001471740.2 (Indeterminado)	6e ⁻⁴¹	96%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG449	362-424	1-377	ATAATGTACGGGG GAG	3e ⁻²⁰	4	NW_003763740.1 (receptor de mineralocorticoide)	0.0	99%
		MG450	289-351	1-317	ATAATGTACGGGG GAGATGCATGAAT TTC	2e ⁻²⁰	13	NW_003763912.1 (Indeterminado)	2e ⁻¹⁴⁷	97%
3	K1-624 (F2)	MG135	1-263	245-298	CACCAACCCCAAT CGAACC	1e ⁻¹⁰⁸	2	NW_001471639.1 (Similar a KIAA0222)	8e ⁻¹¹	90%
		MG136	1-263	247-332	CCAACCCCAATCG AACC	1e ⁻⁰⁶	5	NW_001471698.1 (UDP-N-acetil-alfa- D-galactosamina - polipeptídeo N- acetilgalactosaminil- transferase tipo 4)	9e ⁻³⁰	94%
3	K1-685 (F2)	MG231	1-286	270-465	CCAACCCCAATYG AACC	1e ⁻⁰⁴	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	3e ⁻⁷⁵	90%
		MG233	1-290	274-469	CCAACCCCAATCG AACC	3e ⁻¹³²	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹¹	98%
		MG234	81-363	1-89	GACCGCCCC	2e ⁻⁰⁵	1	NW_003763647.1 (Indeterminado)	3e ⁻³⁶	99%
		MG235	138-425	1-144	AAGCTGA	1e ⁻⁰⁵	3	NW_001471671.1 (Indeterminado)	4e ⁻⁶¹	96%
		MG238	141-423	1-142	GA	4e ⁻⁰⁶	Z	NW_001488823.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁵⁷	95%
3	K1-667 (F2)	MG548	1-394	373-496	ACACACCAACCCC AATCGAACC	5e ⁻¹⁶¹	2	NW_003763686.1 (Indeterminado)	1e ⁻⁴⁹	96%
		MG549	1-624	608-801	CCAACCCCAATCG AACC	0.0	6	NW_003763812.1 (Indeterminado)	3e ⁻⁷³	92%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG550	1-214	208-232	GAGATGC	5e ⁻⁸³	13	NW_003763912.1 (proteína 1 de interação com canal de Kv, isoforma 2)	1e ⁻⁴⁷	94%
		MG551	1-301	292-893	GGGAGATGCA	2e ⁻¹³⁰	4	NW_003763740.1 (cadeia de colágeno alfa 1 (XXV))	0.0	96%
		MG552	1-316	310-573	GAGATGC	1e ⁻¹⁴⁵	17	NW_003764072.1 (Indeterminado)	3e ⁻¹²⁷	99%
3	K1-645 (F2)	MG146	1-290	279-445	CCCAATCGAACC	2e ⁻⁰⁶	2	NW_001471642.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁷⁷	98%
		MG149	1-290	270-350	TACACCAACCCCA ATCGAACC	5e ⁻⁰⁵	1	NW_003763650.1 (enzima málica mitocondrial dependente de NADP)	4e ⁻²⁸	95%
		MG150	1-290	270-381	TACACCAACCC CAATCGAACC	4e ⁻⁰⁷	1	NW_003763650.1 (enzima málica mitocondrial dependente de NADP)	7e ⁻³²	89%
		MG152	1-288	271-476	ACCAACCCCAATC GAACC	3e ⁻⁵⁴	Z	AC200647.3 (Indeterminado)	6e ⁻⁸⁸	96%
		MG153	1-294	278-473	CCAACCCCAATCG AACC	4e ⁻¹⁴³	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹¹	98%
3	K1-568 (F2)	MG183	1-297	279-352	CACCAACCCCAAT CGAACC	6e ⁻⁰⁴	Indeterminado	NW_001477862.1 (Indeterminado)	6e ⁻²⁰	90%
		MG185	1-286	270-465	CCAACCCCAATCG AACC	8e ⁻¹³⁹	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	9e ⁻⁸⁹	99%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG186	1-308	292-487	CCAACCCCAATCG AACC	2e ⁻¹²⁷	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹¹	98%
		MG187	1-267	247-442	CCAACCCCAATCG AACCACC	2e ⁻¹²⁸	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	6e ⁻⁹¹	97%
		MG258	1-283	263-373	TACACCAACCCCA ATCGAACC	4e ⁻⁰⁶	1	NW_001471554.1 (Indeterminado)	6e ⁻³³	90%
		MG261	1-278	254-775	ACCAACCCCAATC GAACCCCAACT	3e ⁻⁰⁶	3	NW_001471673.1 (Indeterminado)	0.0	89%
		MG262	1-271	253-306	CACCAACCCCAAT CGAACC	2e ⁻⁰⁴	2	NW_001471639.1 (Similar a KIAA0222)	8e ⁻¹¹	90%
		MG264	1-263	250-658	ACCCAATCGAAC C	1e ⁻⁰⁴	4	NW_001471687.1 (Receptor de fator de crescimento de fibroblasto tipo 3)	0.0	97%
3	K1-589 (F2)	MG122	1-70	71-239	—	2e-08	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	1e ⁻⁷⁷	98%
3	K1-693 (F2)	MG239	1-302	282-525	TACACCAACCCCA ATCGAACC	2e ⁻⁰⁶	1	NW_001471554.1 (Similar ao fator de crescimento B derivado da medula espinhal- SCDGF-B)	2e ⁻¹⁰⁹	96%
		MG240	1-301	290-365	CCCAATCGAACC	4e ⁻⁰⁶	10	NW_001471428.1 (ST8 alfa-N-acetil- neuraminida alfa-2,8- sialiltransferase 2)	1e ⁻²³	93%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
		MG244	1-308	288-531	TACACCAACCCCA ATCGAACC	7e ⁻¹³⁴	1	NW_001471554.1 (Similar ao fator de crescimento B derivado da medula espinhal- SCDGF-B)	2e ⁻¹¹⁰	96%
		MG245	1-291	274-324	ACCAACCCCAATC GAACC	5e ⁻⁰⁵	Z	NW_001488823.1 (3-oxoácido-CoA- transferase 1)	4e ⁻⁰⁹	88%
		MG246	1-295	277-328	ACCAACCCCAATC GAACCC	3e ⁻⁰⁸	Z	NW_001488823.1 (3-oxoácido-CoA- transferase 1)	1e ⁻⁰⁸	87%
		MG247	1-263	252-505	CCCAATCGAACC	0.001	2	NW_001471651.1 (similar a aminopeptidase)	5e ⁻⁸⁶	91%
		MG248	1-264	246-297	ACCAACCCCAATC GAACCC	1e ⁻⁰⁴	Z	NW_001488823.1 (3-oxoácido-CoA- transferase 1)	1e ⁻⁰⁹	88%
		MG249	1-263	244-279	ACACCAACCCCAA TCGAACC	0.002	3	NW_001471673.1 (Supressor do homólogo de Ty3)	7e ⁻⁰⁵	91%
		MG252	1-287	271-466	CCAACCCCAATCG AACC	4e ⁻¹²⁴	9	NW_001471744.1 (Indeterminado)	2e ⁻⁹⁰	97%
		MG253	1-308	298-423	CCAATCGAACC	6e ⁻¹⁵¹	5	NW_003763785.1 (Tetraspanina-18)	2e ⁻⁵²	98%
		MG254	1-286	276-400	CCAATCGAACC	5e ⁻⁰⁶	5	NW_003763785.1 (Tetraspanina-18)	1e ⁻⁵⁵	99%
3	K1-880 (F3)	MG403	91-306	1-103	CCCCTCCCAAAC	2e ⁻¹⁰⁰	Z	AC216895.3 (Indeterminado)	9e ⁻²⁹	90%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
3	K1-752 (F3)	MG412	74-366	1-92	TGACCCCCCTCCC AAAAC	7e ⁻¹⁴⁵	12	NW_003763892.1 (dedicador de citocinese 3 – proteína de sinalização intracelular)	3e ⁻²⁹	91%
		MG413	376-668	1-389	TGAACCCCCCTCCC	5e ⁻¹⁴⁴	18	NW_003764078.1 (proteína não- caracterizada LOC100858297)	0.0	99%
		MG414	181-475	1-200	TTTGAACCCCCCTC CCAAAA	2e ⁻¹⁴⁶	10	NW_003763854.1 (imunoglobulina , subclasse DCC, membro tipo 4)	4e ⁻⁸⁷	96%
		MG415	388-679	1-395	GAAGCCCC	1e ⁻¹⁴⁴	14	NW_003763931.1 (hidrolase carboxi- terminal da ubiquitina 22-A)	0.0	99%
		MG417	527-818	1-534	GAACGCC	4e ⁻¹⁴⁰	Z	AC231413.2 (Indeterminado)	0.0	96%
		MG418	382-673	1-389	GAAGACCC	1e ⁻¹⁴⁴	Z	NW_003764323.1 (Indeterminado)	0.0	96%

* Ave K1-162 (F0) pertencente à família 2 também entrou no cruzamento da família 3 como F0.

* *Ave K1-583 (F1) pertencente à família 3 também entrou no cruzamento da família 1 como F1.

ANEXO II

Tabela A2. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no locus CNNM2.

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
3	K1-331 (F0)	CG27	487-622	1-495	ATAATGTAC	1e ⁻⁵⁰	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	100%
3	K1-516 (F1)	CG04	487-793	1-495	ATAATGTAC	3e ⁻¹⁰⁹	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	99%
		CG08	487-880	1-495	ATAATGTAC	7e ⁻¹¹²	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	99%
3	K1-585 (F1)	CG55	487-791	1-495	ATAATGTAC	2e ⁻¹⁴⁹	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	100%
		CG116	487-724	1-495	ATAATGTAC	9e ⁻⁴⁰	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	100%
		CG118	488-603	1-496	ATAATGTAC	7e ⁻³⁴	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	99%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
3*	K1-583 (F1)	CG72	487-741	1-502	ATAATGTACGGGT GGG	5e ⁻¹¹⁹	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	99%
3	K1-765 (F3)	CG94	514-806	1-525	GTTGAACCCCCC	3e ⁻¹⁴¹	6	NW_003763812.1 (transportador de metal CNNM2 isoforma 2)	0.0	99%

*Ave K1-583 (F1) pertencente à família 3 também entrou no cruzamento da família 1 como F1.

ANEXO III

Tabela A3. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no locus da distrofina.

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	Locus	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
1	K1-207 (F1)	DG162	1-310	293-508	ACCAACCCCAATG GAACC	1e ⁻⁰⁴	1	NW_001471534.2 (distrofina)	5e ⁻⁹⁹	98%
		DG164	1-266	249-464	ACCAACCCCAATG GAACC	2e ⁻¹²⁸	1	NW_001471534.2 (distrofina)	3e ⁻⁹⁵	96%
		DG165	1-231	214-429	ACCAACCCCAATG GAACC	2e ⁻¹⁰⁸	1	NW_001471534.2 (distrofina)	2e ⁻⁹⁷	97%
1	K1-202 (F1)	DG156	1-263 / 459-600 / 740-835	246-461 / 597-742	ACCAACCCCAATG GAACC / GAA / GAGA / TAC	1e ⁻¹²⁶ / 5e ⁻⁵⁹ / 4e ⁻²⁰	1 / Indeterminado	NW_001471534.2 (distrofina) / NW_001471746.1 (Indeterminado)	8e ⁻⁹⁹ / 3e ⁻⁶⁶	98% / 99%
		DG157	1-149	140-305 / 288-503	GGGAGATGCA	4e ⁻⁴⁸	Indeterminado / 1	NW_001471746.1 (Indeterminado) / NW_001471534.2 (distrofina)	2e ⁻⁷² / 2e ⁻⁹⁶	98% / 97%
1	K1-627 (F2)	DG441	1-308	291-506	ACCAACCCCAATC GAACC	3e ⁻⁹⁵	1	NW_001471534.2 (distrofina)	4e ⁻¹⁰⁰	98%
2*	K1-162 (F0)	DG469	1-153	136-351	ACCAACCCCAATC GAACC	4e ⁻⁰⁴	1	NW_001471534.2 (distrofina)	6e ⁻¹⁰²	99%
2	K1-400 (F1)	DG478	1-260	243-458	ACCAACCCCAATC GAACC	-	1	NW_001471534.2 (distrofina)	3e ⁻¹⁰⁰	98%
		DG479	1-263	246-459	ACCAACCCCAATC GAACC	5e ⁻¹²⁹	1	NW_001471534.2 (distrofina)	9e ⁻¹⁰¹	99%

Família	Ave	Clone	kDNA	<i>Gallus gallus</i> DNA	Micro-homologia compartilhada	kDNA <i>E-value</i>	Cromossomo	<i>Locus</i>	<i>G. gallus</i> <i>E-value</i>	<i>G. gallus</i> Identidade
2	K1-8378 (F1)	DG488	1-281	264-464	ACCAACCCCAATC GAACC	-	1	NW_001471534.2 (distrofina)	1e ⁻⁹³	99%
		DG556	1-129	113-327	ACCAACCCCAATCG AACC	1e ⁻⁴⁵	1	NW_001471534.2 (distrofina)	8e ⁻¹⁰⁰	98%
2	K1-654 (F2)	DG496	1-270	247-462	ACCAACCCCAATC GAACCAAGACC	-	1	NW_001471534.2 (distrofina)	8e ⁻¹⁰²	99%
2	K1-643 (F2)	DG500	1-93	70-285	ACCAACCCCAATC GAACCAAGACC	-	1	NW_001471534.2 (distrofina)	5e ⁻¹⁰²	99%
2	K1-683 (F2)	DG509	1-336	319-534	ACCAACCCCAATC GAACC	1e ⁻⁴⁹	1	NW_001471534.2 (distrofina)	9e ⁻¹⁰²	99%
2	K1-760 (F3)	DG513	1-433	416-631	ACCAACCCCAATC GAACC	1e ⁻¹⁶⁹	1	NW_001471534.2 (distrofina)	1e ⁻¹⁰¹	99%
		DG516	1-136 / 332-691	119-335 / 684-877	ACCAACCCCAATC GAACC / GAAG / CCAAAACC	2e ⁻⁵⁶ / 2e ⁻¹⁶⁹	1 / 1	NW_001471534.2 (distrofina) / NW_001471534.2 (distrofina)	4e ⁻¹⁰² / 2e ⁻⁹⁴	99% / 100%
		DG588	1-111	94-308	ACCAACCCCAATC GAACC	2e ⁻⁴³	1	NW_001471534.2 (distrofina)	7e ⁻¹⁰⁰	98%

* Ave K1-162 (F0) pertencente à família 2 também entrou no cruzamento da família 3 como F0.

ANEXO IV

Tabela A4. Sequências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas *in silico*, formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de *Gallus gallus*.

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
1	K1-527 (F0)	MG513	MGAVHRRVSGLRSTFGVEIHASPPYIIIQDLWD TYKV	gi 242381001 emb CAR63130.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	113	1,09E ⁻⁰⁶	24/27 (88.89%)
		MG517	1)MADLRGLFSGPPLPKPNFVIFRYHILRAITPY TTTIYHTSPTTNAIILIR	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MWYLKIKTKFGFGRGGPENNPLKSAIHRSDRT FNVNYYEV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
1	K1-202 (F1)	MG063	MAVGAGGADPDRILIFSSVYLFLPPPLRFNPVS WEIPVEIYSLKYYFSLALRMPSPVRLGLV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG066	1)MGLYDCVCVMV?EYEVWKFVKYWFWEWG STTSLGNLQCLTTLTVQNFFLISSLNLP	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MEIREILVLGGGVHNLSGQPVPVSHHPHSTE FLPNI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG069	MHLTRTLWFWEGGSHEPCSRAICWVLLGASS FQRLFWEL	gi 242380892 emb CAR63085.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	68	2,84906	13/14 (92.86%)
		MG076	1)MGLVSTFGVEIH?SHPYIMVLGGAVKFGPEN SCISPVHYFI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)M?LTRTLWFWEGRSNLGRKIHASPPYIILYK YSVYKSPRARRSFSVSFNYSYL?YSVQT	Não possui similaridade significativa	--	--	--
	MG078	1)MQLEAIPSSPITSYTSKEADRPSQNHNVVRV CMNFPAQI	Não possui similaridade significativa	--	--	--	

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
1	K1-224 (F1)		2)MVLGGAVKFGPENSCISPVHYGFGRGGRPL CLCN	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	138	8,36E ⁻¹⁰	26/27 (96.3%)
		MG341	MVLGGGFRLLDIRNNFCPERVVRHCNRLPREV AESLSL	gi 118086255 ref XP_001236146.1 PREDITA: proteína não caracterizada LOC776634 [<i>Gallus gallus</i>]	99	0,00029696	22/33 (66.67%)
		MG344	1)MAEKSCISLVHYMPENGVCLREVVRGLV YVYQSLLL VYSEIQLLPGLVLGGAFRKSQKAE IVFGCF	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	90	0,00723847	18/21 (85.71%)
			2)MHLTRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCS EPVIGLFRDSTSSWFGFRGVQEESKSRNCIW MLLKTERLFASVAL	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	83	0,0815274	17/20 (85%)
		MG347	1)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVW AGKFMHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYI MVLGGAFIC	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	231	1,54E ⁻²³	43/48 (89.58%)
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVHLLRGRIV GV	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	195	1,05E ⁻¹⁷	35/39 (89.74%)
			3)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVW AGKFMHLTRTLWFWEGRSFVERADLGSVADL I	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	144	3,05E ⁻¹⁰	26/26 (100%)
		MG348	MGLYDCVCMVTEYEVWKFVKYWFWEGRS KICTKRETLFFNINPMSYREKKRDGNIVSPEEI MV	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	104	6,37E ⁻⁰⁵	21/30 (70%)
MG349	1)MHLTRTLWFWE?GSEIWFWEGRSS??RKIHA SHPYIMVLGGAFKFGPENSC?SPVHYGFGRGV QVWAGKFMHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHAS HPYIINPYQMMR	Não possui similaridade significativa	--	--	--		

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			2)MVLG?GVRDMVLGGAFK??PENSICISPVHYG FGRGVQVWAGKFMH?T?TLWFWEGRSSLGRK IHASHPYIMVLGGAFKFGPENSICISPVHYQSL DDEIK?EISPSSSCTISKKENKYF?HFVMQTDM NSKSRGREKKS	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			3)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHA?H?YIMVL GGAFKFGPENSICISPVHYGFGRGVQVWAGKF MHLTRTLPIR	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG352	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSSLGRKI HASHPYIMVLGGVFKFGPENSICISPVHYGFGR GVQVWAGKFMHLTRTLWFWEGRK	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	247	1,14E ⁻²⁵	46/52 (88.46%)
			2)MHLTRTLWFWEGCSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSICISPVHYGFSGKGGSER	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	198	2,99E ⁻¹⁸	35/40 (87.5%)
			3)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GREEVRGDLCTDWLRLLWVLDGEGV	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	136	9,30E ⁻¹⁰	29/31 (93.55%)
		MG353	1)MCIRAC??SIQRFNFFLVWFWEGRSNLWPKI HASHPYIICPKMGCVYGRWWFDWGWCMCIR ACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLWPKNHASH PYIMVLGGAVTL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MAENSCISPVHYMPENGVCLREVVRRLGLV YVYQSLLL VYSEIQLLPGLVLGGAFKFMMAEKS CISPVHYGFGRGRHFVRLCFSGALVETKAALC FYRKATSDCRSQQVSK	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	129	1,06E ⁻⁰⁷	26/29 (89.66%)
		MG354	MHYSFQCNSLSENFPPNFQAEPPSQNHNVVRV CMNFPAQI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG355	1)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVL GGVSLFTVCSNAQQHTPTHEGVLS	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	146	2,70E ⁻¹¹	31/34 (91.18%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			2)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGGQFIY CVQ	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	153	5,99E ⁻¹²	27/27 (100%)
			3)MHLPRTLWFEGGSVYLLCAVMPSTPRP MKVCCHEESAQWSFS	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	70	1,57854	12/12 (100%)
1	K1-662 (F2)	MG174	MTENSCISPVHYVPLMPTKTQQPRV?LTWAVS C	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG175	MDSVLASDLFC?KVSAFLQNGHLVSGIFIKG?R LLTWTAPPKTANSQNFILILATPTTHTNTPIP IPYHYTFYNILIINIHTLLTTFTIQTFLYQCTHN TF?YYHTIT	Não possui similaridade significativa	--	--	--
1	K1-613 (F2)	MG180	1)MKEFLYSPTGK?YGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVN?VIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MVLGGAVKFGPENSCISPVHYGFGRGR?IW AGKFMHLTRTLSQH	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			3)MHLTRTLWFEGASNLGRKIHASHPYIIT?L TSLKENSFLST	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			4)MVLGGGV?FGPENSCISPVHYH?INLIERKFK VFEHLKWPSIIQTI?FTRRRI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
1	K1-617 (F2)	MG160	MGSPSLKVLQKCGDVTLEREWSVGMVWHGGF DWGWCNIDRGGFMDLIL	gi 358253606 dbj GAA53490.1 dipeptidil peptidase 4 [<i>Clonorchis sinensis</i>]	78	1,40468	15/37 (40.54%)
1	K1-616 (F2)	MG198	MGSPSLKVLQKCGDVTLEREWSVGMVWHGGF DWGWCNIDRGCYDNLFLWFRECGYGMVRVE	gi 358253606 dbj GAA53490.1 dipeptidil peptidase 4 [<i>Clonorchis sinensis</i>]	84	0,268587	20/50 (40%)
		MG199	MGSPSLKVLQKCGDVTLEREWSVGMVWHGGF DWGWCNIVLVW	gi 358253606 dbj GAA53490.1 dipeptidil peptidase 4 [<i>Clonorchis sinensis</i>]	71	8,35065	14/35 (40%)
		MG201	MGSPSLKVLQKCGDVTLRVWSVGMVWHGEF DWGWCNIGAEAECL	Não possui similaridade significativa	--	--	--

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
		MG204	MVRHRNRLPIEVVDAPSQNQSSRILNTSFYPPPL PTTPTNIL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
2	K1-581 (F0)	MG299	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRLNLWPK NHASHPYIWPKMGVVYGRRGSIGVGVSEV AIGLFRDSTSSWFGFRGVHLSVAQFTN	gi 242380949 emb CAR63105.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	99	0,0005473	18/18 (100%)
			2)MAEKSCISPVHYMAENGGCLREARFDWGW CMCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSFVSGTI H	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	184	9,34E ⁻¹⁷	34/36 (94.44%)
		MG301	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRLNLWPK NHASHPYIICPKMGVVYGRRGSIGVGVSEV VIGLFRDSTSSWFGFRGVPPRF	gi 242380949 emb CAR63105.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	99	0,00062284	18/18 (100%)
			2)MAEKSCISPVHYMPENGGCLREARFDWGW CMCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSL	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	179	3,95E ⁻¹⁶	33/36 (91.67%)
		MG303	MGVAYGRWWFDWGWCMCIRACYWSIQRFN FFLVWFWEGPSNLWPKNHASPPYVICPKMGC VYGRWWFDWGWCMCIRACYWSIQRFNFFLV WFWEGASTARQSFRSF	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	123	2,30E ⁻⁰⁷	23/24 (95.83%)
2	K1-669 (F1)	MG377	1)MDGALSNPLYREVSPLIAGRLEIDNFEGPSQ NHNVRVRCMNFPAQI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLGRK IHASHPYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGR GLQNYLFPTSLL	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	196	1,30E ⁻¹⁷	35/39 (89.74%)
			3)MHLTRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMVL GGAFKIIYFQPPCYRQGHLPVERVAQSPIHPGL EHLPEGGIHNLTGQVPVSHHPHSKAFFPNI	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	144	1,76E ⁻¹⁰	29/33 (87.88%)
		MG378	1)MYQSLLLVYSEIRLLSGLVLGGGFKLGPEKS CISPVHYGFGRGVQIWAGKFMHLTRTLFIYAK K	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	161	7,83E ⁻¹³	32/38 (84.21%)

Familia	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			2)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYSFMQRSQDQRLYQL	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	125	4,75E ⁻⁰⁸	22/23 (95.65%)
		MG379	MHLTRTLWFWEGRSNLGRKIHASHLYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGVQVGY	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	188	1,21E ⁻¹⁶	34/39 (87.18%)
		MG380	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGPSNLWPKNHASPPYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGVHVKLIWNTK	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	172	3,71E ⁻¹⁴	32/33 (96.97%)
			2)MAEKSCISPVHYGFRGVQIWAGKFMHLTRTLWFWEGRSCEANMEYQMNASKSRVLQSCICQCGDGNLFFHLSLMP	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	180	8,75E ⁻¹⁶	33/37 (89.19%)
			3)MHLPRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMVLGGAFM	gi 242380891 emb CAR63084.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	155	1,96E ⁻¹²	29/34 (85.29%)
		MG382	MAEKSCISPVHYMPENGVCLREVVRLGLVYVYQSLLLVYSEIQLLPGLVLGGAFKFMMAEKSCISPVHYMPENGVCLREVVRLGLVYVYQSLLLVYSEIQLLPGLVLGGVILCGESVIF	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	101	0,00070086	19/21 (90.48%)
		MG385	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGPSNLWPKNHASHPYIICPKMGCVYGRWWFDWGWCMCI RACYWSIQRFNFFLVWFWEGRK	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	123	1,43E ⁻⁰⁷	23/24 (95.83%)
			2)MAEKSCISPVHYMPENGVCLREVVRLGLVYVYQSLLLVYSEIQLLPGLVLGREEVRGDLRADWLRLWVLDWVGIRV	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	101	0,00036747	19/21 (90.48%)
			3)MHLTRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCS EPVIGLFRDSTSSWFGFGKGGSER	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	80	0,10242	17/25 (68%)
		MG389	MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLGRKIHASHLYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYSFNMYEF	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	167	1,43E ⁻¹³	30/37 (81.08%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
2	K1-8378 (F1)	MG390	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLWPK NHASHPYIICPKMGCVYGRRWFDWGWCMCI RACYWSIQRFNFFLVWFWEGGSGWILGKTSQ EW	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	87	0,0181568	17/18 (94.44%)
			2)MHLTRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCS EPVIGLFRDSTSSWFGFGRGVQVGY	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	83	0,0475236	17/20 (85%)
		MG357	MVLGGAFKFGPE?HASHPYIMVLGGAVSLEK KRPRGDLIALYYNCLKGGCNEVEVSLFSHVTS DRTRWNDLKLHQGRFRLDIRKNFSKRVVRLW NELPTEVVESPFL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG359	MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGKGVQVWA GKFMHLTRTLWFWGGRSSLGRKIHASHPYIM VLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGLQVGY	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	219	2,43E ⁻²¹	41/48 (85.42%)
		MG361	1)MVLGGAVKFGPENSCISPVHYGFRGVQV WAGKFMHLTRTLWFWEGRSLDSWTLWSD	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	138	2,01E ⁻⁰⁹	25/26 (96.15%)
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAVTRLMDTLVRLKFWLL	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	151	4,71E ⁻¹²	32/36 (88.89%)
		MG362	1)MCDSLILCLYYFILHDGPSQNHNVVRVYMN FPAQI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVL GGAVKFGPENSCISPVHYGFRGRHG	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	177	4,51E ⁻¹⁵	33/39 (84.62%)
			3)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGGQIW AGKFMYLTRTLWFWEGPSWSMK	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	147	6,69E ⁻¹¹	27/27 (100%)
			4)MHLPRTLWFWEGRSNLGRKIHVSHPYIMVL GGAVMEYEIVKAQN	gi 242380891 emb CAR63084.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	149	2,83E ⁻¹¹	27/33 (81.82%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
		MG363	1)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGLQGA	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	196	5,66E ⁻¹⁸	35/39 (89.74%)
			2)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVW AGKFMHLTRTLWFWEWASGCLVLPFQA	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	142	4,32E ⁻¹⁰	26/26 (100%)
			3)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGGFRVLSSTFPSINKTYEEGKIWSTPNCTTAS LLISFFLRKKFPFELAIFSYHSPVHLNLPCTAY	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	152	1,27E ⁻¹¹	31/33 (93.94%)
		MG365	1)MHKQLLTNPQSNQLTPQAAEERDEPPSQN HNVRVRCMNFPAQT	gi 381211712 ref ZP_09918783.1 proteína hipotética LGrbi_17433 [<i>Lentibacillus</i> sp. Grbi]	67	6,59154	15/31 (48.39%)
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYVMVL GGGFISLFCCLRG	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	148	1,09E ⁻¹¹	30/33 (90.91%)
			3)MVLGGAFKFGPENSCISPVRYGFGRGVHLSL LLEGLVGSLLIGGW	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	117	8,49E ⁻⁰⁷	22/23 (95.65%)
		MG366	MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVLG GAVILCGESVIF	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	140	1,37E ⁻¹⁰	30/35 (85.71%)
		MG368	1)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGGHFVRLCFS GALVETKAALCFYRKATSDCRSQQVSK	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	204	1,44E ⁻¹⁸	36/40 (90%)
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVL GGAVTL	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	139	1,35E ⁻¹⁰	30/34 (88.24%)
		MG370	1)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGGSENNVS	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	189	8,09E ⁻¹⁷	34/40 (85%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			2)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGVQVW AGKFMHLTRTLWFWEGRK	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	142	3,02E ⁻¹⁰	26/26 (100%)
			3)MHLPRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GREEVRIMLANHINASKAYCE	gi 242380992 emb CAR63123.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	135	1,06E ⁻⁰⁹	28/31 (90.32%)
		MG372	MHLTRTLWFWEGRSNLGRKIHASPPYIMVLG GAFKFGPGNSCVSPVHYGFRGVQVWAGKF MHLPRTLWFWE GASWIRAFHFPLIFVS	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	258	3,16E ⁻²⁷	48/54 (88.89%)
2	K1-400 (F1)	MG020	MLGIKEAPSQNHNSIFRTQNLITNVLSTTKHQ PNVTPTPTTYTNFIHIIIQTINYYN	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG032	MQEK?PTPPPKTNSQNFILILATTLTTHNTP IPIPHHYTFYNLIINIHTLLTFTIQTSHLYQ?TH ?TFV?YHTIT	Não possui similaridade significativa	--	--	--
2	K1-486 (F1)	MG539	1)MCIRACYWSIQRLNFFLVWFEGPSNLWPK NHASPPYIIIQDLWDYKVV	gi 242380950 emb CAR63106.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	94	0,00089636	18/18 (100%)
			2)MAEKSCISPVHYNTRSMGYLQGLNIKEKEIL LYTEYC	gi 328876072 gb EGG24436.1 proteína contendo o domínio RhoGAP [<i>Dictyostelium fasciculatum</i>]	70	9,70799	11/27 (40.74%)
		MG541	MCIRACYWSIQRLNFFLVWFGFRGVQIWAG KFMHLTRTLSQFRGAVLVYQTYHYAHTSSFY LWLVRL	gi 242380874 emb CAR63079.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	97	0,0007909	17/18 (94.44%)
		MG543	1)MHLTCTLWFWE GGSYHHTPSMQPFIQLVLL LPTSQSSGKTEEQLPVLPIPSALPKRYKAFLN SLQFCSCGLL	gi 388546541 ref ZP_10149815.1 patatina [<i>Pseudomonas</i> sp. M47T1]	77	2,11059	15/37 (40.54%)
			2)MVLGGRFIPSHTIYAAIHSIGPASAHLSVFNW KD	Não possui similaridade significativa	--	--	--

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
		MG545	1)MLHMRANGTRSYSYDINNVHFSISGCVERPSQ TIFHEFPYLILRDHNTNQSYPPLTKYINCI	gi 255568418 ref XP_002525183.1 Fator de licenciamento da replicação MCM8, putativo [<i>Ricinus communis</i>]	74	4,31055	15/30 (50%)
			2)MVTEYEVWKFVKYGLGGAFDTSRNAEMNV VDVTVAPCSVCSHVQHTSVLQKKVGIKEKTV VIS	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	69	3,36168	13/13 (100%)
		MG547	1)MEIREILILGGAFKFMAEKSCISPVHYGFGRG VQIWAGKFMHLRTRTY	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	124	1,33E ⁻⁰⁷	22/27 (81.48%)
			2)MHLPRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIILKD LWKWHHIKKGKRCRV	gi 242380877 emb CAR63080.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	117	5,43E ⁻⁰⁷	21/27 (77.78%)
2	K1-454 (F1)	MG444	MSLFTEFPKDVLYNSQFSDEAPSQNQHFLKFP NPFYYPTYTQTNTKTL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG531	1)MVGLEDDPGGLFQSQPSDDSVASPPYIICPKM GCVYGRWGSIGVGI	gi 242381091 emb CAR63172.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	69	2,16899	14/18 (77.78%)
			2)MILEVFSNHNHLMILWHLPRTLYARKWGVF TGGGVRLGLV	gi 242380968 emb CAR63114.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	109	7,06E ⁻⁰⁶	21/24 (87.5%)
		MG532	MGLHLTRTLYAENGVCLRGVDFDWGCNIR GWELKTGECLT	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	86	0,0139569	17/21 (80.95%)
		MG533	MHKFPPQKLTSTPTLSGLQLPSYITPTPIEPLFF QVEGT	gi 242381090 emb CAR63171.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	149	5,84E ⁻¹²	31/32 (96.88%)
		MG536	MVVRLGLVYSEIQLLPGLVLGGAFKFGPEKSC ISPVHYGFGRGRRPLLLHN	gi 242380988 emb CAR63121.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	138	3,81E ⁻¹⁰	28/31 (90.32%)
		MG538	1)MAVRLGLVYSEIQLLPGLVLGGAFKFGPENS CISPVHYGFGRGRRPLFLCNKQ	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	144	1,92E ⁻¹⁰	26/27 (96.3%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			2)MVLGGGVDLFSYATSNRVRGNGLKLHQGM FRILGKNSYHK	gi 363729350 ref XP_003640634.1 PREDITA: proteína não caracterizada LOC100857505 [<i>Gallus gallus</i>]	97	0,00190102	20/34 (58.82%)
2	K1-661 (F2)	MG431	MLLYCVILCLCKLYYKMWLEIVETLVLGGAF NILEVSSDKC	Não possui similaridade significativa	--	--	--
2	K1-633 (F2)	MG214	MGSPSLK?LQKCGDVTLREWSVGMVWHGGF DWGWCNIGLGC	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG215	MQEFSAKKLNAPPKTTNSQNFILILATPTTT HNTPIPIPYHYTFYNILIINIHTLLTFTIQTFLY QCTHNTFIYYHTIT	gi 40716547 gb AAR88804.1 proteína quimérica putativa 173-56 [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	70	3,41751	15/19 (78.95%)
2	K1-683 (F2)	MG112	1)MVRHRNRLPIEVVEPPSQN??FTNFHTSYSVT ITQTQSYNPINQYKL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MGLYDCVCMVTEYEVWKFVK?WFWEGG STSMGNL?RCLTILTLKNFFLELDLV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
2	K1-735 (F3)	MG399	MHKQLLTNPQSNSQLTPQAAEERDERPSQNRT FGKFSTLLTP	Não possui similaridade significativa	--	--	--
3	K1-331 (F0)	MG309	MHLPRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCSVSEP VIGLFRDSTSSWFGFRGVHTRWK	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	84	0,0334751	18/25 (72%)
		MG310	1)MCI??CYWSIQRFN?FLVWFWEGRSNL?PKN HASHPIICPKMGCVYGRRWFDWGWCMCIR ACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSRSFPNVFLGK HKRSI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)M?EKSCISPVHYMPENGVCLREAVVRLGLV YVYQSLLLVYSEIQLLPGLVLGGGFKVLS	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			3)MHLTRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCSV EPVIGLFRDSTSSWFGFRGVQGPFLMCF	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	83	0,0487778	17/20 (85%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
		MG312	1)MKTTTTMHSTFENYILTIFSKELVESKALIIH QPQSNHHL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGPSNLWPK NHASPPYVICPKMGCVYGRWWFDWGWCMCI RALLSTSSLEKIVRM	gi 242380949 emb CAR63105.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	98	0,00060227	18/18 (100%)
			3)MAEKSCISPVRYMPENGVCLEVVRLGLV YVYQSLALYQLLGKDSQNVIFKSTVHCSCFHS SVYLYFCFLLVIKPFSLLFWYGLCEHLMPAV	gi 242380630 emb CAR63076.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	98	0,00091204	19/26 (73.08%)
			4)MHLPRTTYARKWGVFTGGGGSIGVGVSE PCSLPAPWKR	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG314	1)MYIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGGSNLWPK NHASPPYVICPKMGCVYGRWWFDWGWCMYI RACYWSIQRFNFFLVWFWEGGSWILGKISSP KEWSGTGTGCPRSW	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	117	1,80E ⁻⁰⁶	22/24 (91.67%)
			2)MHLPRTTYARKWGVFTGGGGSIGVGVSE PVIGLFRDSTSSWFGFGRGVQVGY	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	87	0,0120707	18/21 (85.71%)
		MG316	MCIRACYWS?QRFNFFLVWFWRGVQIYGRKI MHLTRTLHVVLEWKG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG318	1)MCIRACYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLWPK NHASPHYIICPKMGCVYGRWWFDWGWCMYI RACYWSIQRFNFFLVWFWEGGGFKFM?EKSCI SPVHYMPENGVCLEVVRLGLVYVYQ?LLL VYSEIQLLPLVGGGFK?LS	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MAEKSCISPVHYMPENGVCLEAVVRLGLV YVYQSLLLVYSEIQLLPLVGGRGVQIY?RKI MHLTRTTYARKWGVFTGGGGSIGVGVSE?P VIGLFRDSTSSWFGFGRGLQ?PFLMCF	Não possui similaridade significativa	--	--	--

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			3)MHLTRTLYARKWGVFTGGGGSIGVGVCISE PVIGLFRDSTSSWFGFGREGGSNL?PKNHASHP YIICPKMGCVYGRWWFDWGWCMCIR?CYWSI QRNFNFFLVWFWEWEGAS?SFPNVFLGKHKRSI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
3	K1-516 (F1)	MG001	1)MLSNDLKKKKKDKTQQNG?LYKSRG?HRPF P?AERHRPPLPKPQILKIL??	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MV?CTNPEE?TDPSPPPSQTDPSSQNHKFSKF Y??NFSNNTYYHTQ??NSD?TPLYIL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG003	MSAKHLRGSTRSESYKGHILCMFLVSVILAQS DPPSQNHKFSKFYTTNFSNNTYYHTQHTNSDT TPLYIL	gi 260948314 ref XP_002618454.1 proteína hipotética CLUG_01913 [<i>Clavispora lusitaniae</i> ATCC 42720]	75	3,68887	14/32 (43.75%)
		MG005	1)MNAKGAYGKSVVQFPPTGKHFENIKTPP VLPAEKCPPLQGKMRNVSGHPHLLRCPRLIS WERPSQNQYFTNFHTSYSVTITQTQSYNPIDQI YKL	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MGLYDCVCVMVTEYEVWKFVKYWFWEGR SHEMSLGQRRR	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	103	3,17E ⁻⁰⁵	22/28 (78.57%)
		MG006	MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFSF NEV?AVIMYGGDA	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG011	MHLTRTLYKGISPVHYSFGRGGQIWAGKFMH LPRTL	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	133	1,55E ⁻⁰⁹	25/26 (96.15%)
3	K1-308 (F1)	MG455	MLGQQDMQSAERPSQNQLFGIFNLLFIGITPQQ LSPIP	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG456	MDEPPSQNQYFTNFHTSYSVTITQTQSYNPINQ IYKL	gi 137277 sp P06724 V30K_HCMVE pré-proteína principal 30 kDa	73	2,31834	16/34 (47.06%)
		MG458	MLLILLVAHEPPSQNQQLFGIFNLLFIGITPQQLS PIP	Não possui similaridade significativa	--	--	--

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
		MG459	1)MVLPIKCMLREFISLLSLTPPKTNISRISIPHT P	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MGLYDCVCMATEYEVWKFVKYWFWEGG SKKAN	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	97	0,00025061	18/20 (90%)
			3)MEIREILVLGGGVKESKLMNSLSMHLIGNTI LLTVSSLKCARLWWTQRETSINQEGQYYCSG TELCLQEIAALGGKFHCNMQLAIETAPAFQVG QLHWTASNQKTIFPRS	gi 33862812 ref NP_894372.1 fosforibosilformilglicinamidina sintase I [<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313]	75	7,5392	24/72 (33.33%)
		MG469	1)MRHTRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMNR GLQICTHILTIPLSASR	gi 242380892 emb CAR63085.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	119	3,89E ⁻⁰⁷	22/28 (78.57%)
			2)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYESRTSDLYPY FNYSIVCLSLRI	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	118	7,30E ⁻⁰⁷	21/21 (100%)
3 *	K1-583 (F1)	MG329	MKEFLYSPTGKFGYGLNNAWPFQVLKNFEFSF NEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG331	1)MLIVQRTGCTDADGSQSLYSYEGKLHCSRN SGVFSGLLQIAALLPDKNFRLSQLNMHLHLCN ILFLLNAPPKTKPGRG	gi 15139869 emb CAC50076.1 NADH desidrogenase subunidade 2 [<i>Isoetes durieui</i>]	76	3,42981	20/47 (42.55%)
			2)MCIRACYWSIQRFNLFLVWFWEGRSEEIYY KDADAYLAVIT	gi 242380970 emb CAR63116.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	94	0,0008309	17/18 (94.44%)
		MG332	1)MQFPAAFGKSIRRHAVQNFCVNLYPGEPPSQ NHNVRVRCMNFPAQV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MKRRVRLGLVCVYQSLLLVYSEIQLLPGLV LGGAFRFMAEKSCISPVHYGFRGVQVWAGK FMHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKLGPENSCISPVHYGFRGVHLDKG	gi 242380891 emb CAR63084.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	239	1,84E ⁻²³	45/55 (81.82%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			3)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGLQTWAGKF MHLTRTLWFWEKGGSPG	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	198	7,16E ⁻¹⁸	35/39 (89.74%)
			4)MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVW AGKFMHLTRTLWFWEGPSNLGRKIHASHPYI MVLGGGFTWIKVNAEVLYCVASY	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	239	1,68E ⁻²⁴	44/48 (91.67%)
		MG335	MVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVWA GKFMHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASHPYIM VLGGA VILCGESVIF	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	233	1,33E ⁻²³	43/48 (89.58%)
		MG336	1)MCIRACYWSIQRFNLFVWFWEGRSNLGRK IHASHPYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFGR GVQTWAGKSMHLTRTLWFWEGRSSLGRKIH ASPPYIMVLGREEVRIMLANHINASKAYCE	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	246	6,27E ⁻²⁵	47/54 (87.04%)
			2)MHLTRTLWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQVWAGKF MHLPRTLWFWEGRK	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	254	7,64E ⁻²⁷	47/52 (90.38%)
			3)MHLPRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGGSSENNVS	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	198	3,39E ⁻¹⁸	35/40 (87.5%)
		MG434	MHKQLLTNPQSNSQLTPQAAEERDDPPSQNQI SAIS	gi 383810585 ref ZP_09966079.1 proteína hipotética HMPREF9969_1202 [<i>Prevotella</i> sp. oral taxon 306 str. F0472]	70	4,61072	11/29 (37.93%)
		MG435	1)MHKQLLTNPQSNSQLTPQAAEERDERPSQN QYFTNFHTSYSVTITQTQSYNPIDQIYKL	gi 198278233 dbj BAG70803.1 proteína pré S/S [Vírus da hepatite B]	72	8,01042	16/47 (34.04%)
			2)MGLYDCVCVMVTEYEVWKFVKYWFWEGR SSLSSAA	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	101	5,44E ⁻⁰⁵	19/20 (95%)
		MG436	MCIGACYWSIQRFNLFVWFWEGRSGCLVLP FQA	gi 242380949 emb CAR63105.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	83	0,0228223	16/18 (88.89%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
3	K1-685 (F2)	MG231	MGSPSLKVLQKCGDVTLREWSVG??WHGGF? WGWCNIG?VD?GYI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG233	MGSPSLKVLQKCGDVTLREWSVGMVWHGGF DWGWCNIALVIG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG238	1)MQEKTTPPKTIIEISYPRLCSNISTKRYHYTP PTTKLTMQTYKIYNIY	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MVLGGGVFSCINSKRTRGNGLKLCQGRFRL DI?NNFFSKIVVRH	Não possui similaridade significativa	--	--	--
3	K1-667 (F2)	MG549	1)MLLFGSSEGGQGCWDPFLFKCLGSIGVGVC VSELVTGLFRDSNFFLV	gi 168701252 ref ZP_02733529.1 proteína hipotética GobsU_17136 [<i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246]	73	3,37759	11/23 (47.83%)
			2)MLSGFDWGWCMCIRACYWSIQRFKLLPGL V?GGCMCIRACYWSIQRNLFLV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG552	MRRGEKWGAWRTSVIPFSSPQQISCVTVDESF SISPVHYMPENGVCLEVGFDWGCNIWRLV D	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	128	4,95E ⁻⁰⁸	24/30 (80%)
3	K1-645 (F2)	MG152	1)MYISHTSHIQIHTIHTNQTINTHSIFHLISHSN KPYITPTPIEPTNQPKKPNKNQTKPNHNNKKN PSKV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MVSGLSFHTFDGFFLLWFLVWFLFGFFG WLVSIGVGI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG153	MGSPSLKVLQKCGDVTLREWSVGMVWHGGF DWGWCNIGFWLVVWLVYIMGLYIF	gi 297616374 ref YP_003701533.1 proteína hipotética Slip_0168 [<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680]	75	3,28645	13/35 (37.14%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
3	K1-568 (F2)	MG185	MGSPSLKVLQKCGDVTLEWSVGMVWHGGF DWGWCNIDRGGFMDLIL	gi 358253606 dbj GAA53490.1 dipeptidil peptidase 4 [<i>Clonorchis sinensis</i>]	78	1,40468	15/37 (40.54%)
		MG186	MGSPSLKVLQKCGDVTLEWSVGMVWHGGF DWGWCNIGLVCWRFKNLLSNVMYVIGFCDI	gi 358253606 dbj GAA53490.1 dipeptidil peptidase 4 [<i>Clonorchis sinensis</i>]	73	6,10756	14/35 (40%)
		MG187	MGSPSLKVLQKCGDVTLEWSVGMVWHGGF DWGWCNIRRLVD	gi 242380955 emb CAR63108.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	80	0,0698678	14/14 (100%)
3	K1-589 (F2)	MG122	MGSPSLKVLQKCGDVTLEWSVGMV??GGFD WGWCKV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
3	K1-693 (F2)	MG239	MCITVICWSLFLVGRWYVWFDWGCNIACVV GVILCSIHVCV	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG244	MCITVICWSLFLVGRWYVWFDWGCNIGLVC WRFKNLLSNVMYVIGFCDI	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG252	MGSPSLKVLQKCGDVTLEWSVGMVWHGGF DWGWCNIGCVDLGYI	gi 242380614 emb CAR63070.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	92	0,00126041	17/17 (100%)
3	K1-880 (F3)	MG403	MHLTRTLWFWEGRSNLGRKIHASHLYIMVLG GAFKFGPENSISCISPVHYGFGRGVQVGY	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	188	1,21E ⁻¹⁶	34/39 (87.18%)
3	K1-752 (F3)	MG413	MKAVLYGRAGLAGSKWHQEAKRLNPPPKTT LSGNSQPYPYSHPKYTK	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		MG414	MSLLKSFFCNFTFLNPPPKTTLSGNSQPYPYSH KYTK	Não possui similaridade significativa	--	--	--

*Ave K1-583 (F1) pertencente à família 3 também entrou no cruzamento da família 1 como F1.

ANEXO V

Tabela A5. Sequências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas *in silico*, formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no gene transportador de metal CNNM2 de *Gallus gallus*.

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
3	K1-331 (F0)	CG27	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MCIRARYWSIQRFNFFLVWFWEGRSNLGPK NHASHPYIITALTSLKENSFLST	gi 242380949 emb CAR63105.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	91	0,00339309	17/18 (94.44%)
3	K1-516 (F1)	CG04	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MAEKSCISPVRYMPENGVCLREVVRGLV YVYQNLLL VYSEIQLL PGLVLGGAFKFMAEKS CISPVHYHSINLIERKFKVFEHLKWPSIIQTIEFT RRRI	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	94	0,00497523	18/21 (85.71%)
			3)MHLPRTLYARKWGVFTGGGSIGVGVCSVE PVI GLFRDSTSSWFGFGRGLQIYGRKIMHLTRT LSQH	gi 7959748 gb AAF71046.1 AF116721_23 - PRO1094 [<i>Homo sapiens</i>]	84	0,050035	17/20 (85%)
			4)MGCVYGRWVFDWGWCMCIRT CYWSIQRF NFFLVWFWEGPSNLWPKNHASHPYIITALTSL KENSFLST	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	124	7,83E ⁻⁰⁸	22/24 (91.67%)
		CG08	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MAEKSCISPVRYMPENGVCLREVVRGLV YVYQSLLL VYSEIQLL PGLVLGGAFKFMAEKS CISPVHYTRASHPYIIVLGGGAKFGPENSCISPV HYHSINLIERKFKVFEHLKWPSIIQTIEFTRRI	gi 242380982 emb CAR63119.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	126	3,46E ⁻⁰⁷	26/29 (89.66%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			3)MHLPRPLYARKWGVFTGGGSGVGVCVSE PVIGLFRDSTSSWFGFRGVQIYGRKIMHLTRT LYKGISPVHYSFGRGGQIWAGKFMHLTRLSQ H	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	127	9,12E ⁻⁰⁸	24/26 (92.31%)
3	K1-585 (F1)	CG55	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MEIREILILGGAFKFMKSCISPVHYHSINLI ERKFKVFEHLKWPSIIQTIEFTRRRRI	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	99	0,0004731	17/22 (77.27%)
		CG116	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MPENGSCRPEENVVLGGAFKFGPENSCISPVH YGFGRGVQIWAGKFMHLTRTLWFWEGRSNL GRKIHASHPYIITALTSLKENSFLST	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	142	1,37E ⁻⁰⁹	26/29 (89.66%)
			3)MGAVDRRTWFWEGRSSLGRKIHASPPYIMV LGGAFKFGPENSCISPVHYGFGRGVQIWAGKF MHLTRLSQH	gi 242380947 emb CAR63104.2 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	229	3,26E ⁻²³	44/47 (93.62%)
			4)MHLPRTLWFWEGRSNLGRKIHASHPYIMVL GGAFKFGPENSCISPVHYHSINLIERKFKVFEH LKWPSIIQTIEFTRRRRI	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	170	1,13E ⁻¹³	30/34 (88.24%)
		CG118	1)MHFGKGECVLLNCLKRRTYMKEFLYSPTGK FYGLNNAWPFQVLKNFEFSFNEVNAVIMYG	gi 347524893 ref YP_004831641.1 protein contend o domínio FIST [<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782]	79	0,977875	19/50 (38%)
			2)MPGNNGSCRPEENVVLGGAVKFGPENSCISPV HYHSINLIERKFKVFEHLKWPSIIQTIEFTRRRRI	gi 242380993 emb CAR63124.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	107	4,50E ⁻⁰⁵	20/24 (83.33%)
			3)MGAVDRRTWFWEGRSNLGRKIHASHPYIIT ALTSLKENSFLST	gi 242380877 emb CAR63080.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	157	6,52E ⁻¹³	27/30 (90%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
3	K1-583 (F1)	CG72	1)MKEFLYSPTGKFYGLNNAWPFQVLKNFEFS FNEVNAVIMYGWDA	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MGAVDRRVSGLRSTFGVEIHASHPYIITALTS LKENSFLST	gi 242381001 emb CAR63130.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	136	7,21E ⁻¹⁰	26/27 (96.3%)

ANEXO VI

Tabela A6. Seqüências de proteínas quimeras putativas traduzidas de ORFS obtidas *in silico*, formadas pela inserção de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no gene da distrofina de *Gallus gallus*.

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
1	K1-202 (F1)	DG156	1)MAENGGCLREARFDWGWCMCIRACYWSIQ RFNFFLVWFWEQSSPLLFNFSIKQVCHCDQYY FVRNAVTKCFVSTVKLL	gi 242380969 emb CAR63115.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	184	1,36E ⁻¹⁶	34/36 (94.44%)
			2)MCGWVPKISIGSQFASHPIIWPKMGVVCGR RGSIGVGVCVSEPVIGLFRDSTSSWFGFGRVLV RSCSILVLSKFAIVTNTLSEML	gi 242381063 emb CAR63156.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	80	0,145982	15/22 (68.18%)
			3)MANLLNTKIEQERTRTLKPNQEEVESLNRP ITGSDHTPTPIEPRLPQTTPIFGHIMYG	gi 242380916 emb CAR63092.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	135	1,78E ⁻⁰⁹	27/29 (93.1%)
			4)MLAPTLHHPK?PCVVGYYKALAPSLHLTRT LYGRKWGLFAGGEVRLGLVYVYQSLLLVYSE IQLLPLVLGGF	Não possui similaridade significativa	--	--	--
		DG157	1)MYGGDANWEPMLFGTQPHMDSLGDDEWEP TFWVNPHTWDHWVTQSGSQCFLYTNPNGTK TKTRKPNQNEVHVYTSKNKQAKAIFFSHNNFT VLTKHLVTAFLTK	gi 390438233 ref ZP_10226720.1 proteína hipotética MICAI_1440007 [<i>Microcystis</i> sp. T1-4]	72	4,24719	18/51 (35.29%)
			2)MQTGSQCFLVPNHTWILWVMKSGSQHFGY PTTPGITG	Não possui similaridade significativa	--	--	--
2	K1-760 (F3)	DG516	1)MANLLNTKIEQERTRRPLPKPIFHESPYLILR NHNTNTIIQPH	Não possui similaridade significativa	--	--	--
			2)MHDFSGPNLNAPPKTRKPNQNKVHVYTSKN KQTKAIFFSHNNFTVLTKHLVTAFLTK	gi 242380935 emb CAR63099.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	86	0,016547	15/16 (93.75%)

Família	Ave	Clone	Proteína Quimera Putativa	Resultado Blastp	Score	E-value	Identidade
			3)MGLYDCVCVMVTEYEVWRFVKYWFWEGP SSPLLFNFSIKQVCHCDQYYFVRNAVTKCFVS TVKLL	gi 242380904 emb CAR63089.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	108	1,42E ⁻⁰⁵	19/20 (95%)
		DG588	MHEFPPQKLTPTPTLSGLRLPSPYMTPTPIEPRP KPENQTKTKFTSILQKTNKQKLFFSLTITSQCL QNI	gi 242381021 emb CAR63138.1 proteína hipotética [<i>Homo sapiens</i>]	151	1,30E ⁻¹¹	30/32 (93.75%)

