

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



**Herança vertical de seqüências de minicírculos de  
kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma de  
células germinativas humanas**

**Aluna: Perla Fabíola de Araújo**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Teixeira**

**Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Nadjar Nitz**

Brasília – DF

2008

**Perla Fabíola de Araújo**

**Herança vertical de seqüências de minicírculos de  
kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma de  
células germinativas humanas**

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

**Brasília- DF  
Julho de 2008**

Trabalho desenvolvido  
no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa  
em Doença de Chagas, Universidade de  
Brasília, sob a orientação do Prof. Antônio R.  
L. C. Teixeira. Este trabalho teve apoio  
financeiro da CAPES e CNPq.

## *Dedicatória*

Dedico este trabalho a minha família que nos momentos de cansaço me motivaram. Minha mãe Maria José, meu pai Décio Alves, meus sobrinhos- Afilhados Thaynner, Thayenne, Yan, e os meus irmãos Patrícia e Pablo.

Dedico também ao meu noivo Carlos Thompson que, como um grande companheiro soube compreender minha ausência, além de, me oferecer colo quando precisei.

Amor, muito obrigada por todos os momentos.

## *Agradecimentos*

Como não poderia deixar de ser, inicio e centralizo meus agradecimentos a Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, pelas bênçãos diárias, pela capacidade intelectual e pela sua constante e marcante presença em tudo que faço e muito especialmente por todas as pessoas que coloca no meu caminho, dentre as quais destacarei neste momento, algumas que mais participaram desta conquista:

Aos pacientes e doadores que voluntariamente participaram deste trabalho demonstrando confiança nas propostas do mesmo.

Ao Professor Dr. Antônio Teixeira, pela amizade, oportunidade e confiança que possibilitou e incentivou meu crescimento científico, profissional e pessoal, e pelo otimismo durante a orientação deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. Nadjar Nitz, que esteve comigo desde o início da minha carreira como pesquisadora, que sempre me contagiou com sua paixão pela profissão e pela pesquisa, mas muito mais que isso, tornou-se uma grande amiga, companheira, conselheira. Obrigada pela orientação constante e pelos momentos em que ficamos conversando sobre biologia molecular. Grande mestre.

À querida, Mariana Hecht, pelo auxílio nos textos em inglês, nos experimentos e nas análises em bioinformática.

Aos membros do grupo LMPDC pela ajuda durante a execução do trabalho e pelas discussões que engrandeceram o mesmo: Ana de Cássia, Aninha, Carol, Cléver, David, Eduardo, Flávias, Izabela, Jaime, Marol, Malú, Meire, Roze, Silene.

Aos estagiários Bruno, Marília e Ronaldo, que sempre estiveram prontos a ajudar.

Aos funcionários do LMPC: Miguel, Seu Geraldo e Eliete pelos serviços prestados e pela atenção.

Às minhas queridas amigas: Adriana, Amira, Dominique, Francilene, Helena, Ideni e Nilma que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Enfim, sei que não conseguirei ser justa ao agradecer num único momento, e em poucas palavras, o muito que recebi durante estes dois anos. O que posso afirmar é que tudo que construí durante este tempo só foi possível pela presença de muitas pessoas especiais e importantes na minha vida.

Obrigada!

## *Reflexão*

*“Não fiquem maravilhado diante do novo,  
nem assustados pelo que ontem vos era  
desconhecido. Não recuem diante do mistério,  
mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo... Não  
se considerem os únicos donos da verdade e do  
conhecimento, pois um diploma não faz o  
cientista. Somente assim poderão cumprir sua  
missão, ser úteis ao próximo... E façam tudo  
com amor, pois será um dia esplêndido aquele  
em que dos progressos da ciência, participará  
também o coração”*

*(Pasteur)*

## Resumo

O presente trabalho é o primeiro relato de integração de seqüências provenientes de um protozoário para o genoma de células germinativas humanas. Neste estudo, nós documentamos a integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de células germinativas e a transferência vertical dessas mutações para os descendentes.

Foram analisadas amostras de esperma de 34 voluntários. Desses, 22 doadores foram agrupados em cinco famílias, cujos progenitores (F<sub>0</sub>) eram portadores da doença de Chagas. Doze amostras de esperma foram obtidas de indivíduos isolados. Foi possível observar a integração de kDNA de *T. cruzi* no genoma de todos os 17 chagásicos estudados. A transferência vertical apenas das seqüências de kDNA para as progênes F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> pôde ser observada em 6 descendentes de chagásicos. As análises das regiões do genoma humano que flanqueavam as seqüências de kDNA mostraram a integração de minicírculos de kDNA preferencialmente em elementos retrotransponíveis do tipo LINE-1, em 72,5% das seqüências quimeras. O encontro do mesmo *locus* em indivíduos chagásicos e seus descendentes é mais uma evidência mostrando a herança das mutações. Verificamos, também, que as seqüências de minicírculos de kDNA ligaram-se a outros elementos transponíveis (4%), tais como *Alu*, ERV e MER, e, também, em alguns genes (9%). Nos demais clones (14%), não foi possível determinar os *loci* de integração do kDNA no genoma devido á ausência de informação em bancos de dados.

Os achados deste estudo sugerem que as mutações decorrentes da inserção do kDNA poderiam causar alterações genótípicas e fenotípicas implicadas na auto-imunidade descrita na doença de Chagas. De fato, a incorporação de DNA exógeno na célula humana nos mostra a complexidade das interações do parasito com o hospedeiro humano. A descrição de mutação, recombinação e deriva genética, alterando genótipo e fenótipo do hospedeiro, poderão sugerir a base da auto-imunidade que se associa à patogênese da doença de Chagas.

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, transferência vertical de DNA, integração de DNA exógeno, retrotransposon LINE-1, evolução do genoma.



## SUMMARY

The present work shows by the first time the integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences into the human genome. This eukaryote-to-eukaryote lateral transfer of DNA is constantly seen in each patient harbouring the infections. The kDNA mutations are inherited by F1 and F2 progeny and undergo genetic drifts, recombination hitchhiking from primary to secondary chromosomes.

We analysed 22 samples of sperm of volunteers from five families whose founders have the active infections. Independently, we further analysed haploid cells DNA from 12 individuals. The vertical transfer of kDNA minicircle sequences was detected in 17 family members. Among these there were 11 with active *T. cruzi* infections, showing nDNA and kDNA signatures. The remaining six F1 and F2 progenie had the kDNA signatures only. In each of these 17 individuals we showed sequences of minicircles of kDNA from *T. cruzi* integrated into germ line cells. The main hotspot for the kDNA integration was retrotransposons LINE-1 (72.5%). In 9% of cases the integrations entered coding regions of genes. Besides, kDNA minicircles sequences integrated non-autonomous transposable elements (4%) Alu, ERV and MER, Finally, in (14%), the kDNA mutations entered undetermined sites into the human genome. The presence of the kDNA mutations are in agreement with the findings of lateral transfer of kDNA in somatic cells of same individuals (Hecht, M.M, Thesis, University of Brasilia, 2008).

Furthermore, the demonstration of kDNA mutations in haploid cells is brought here in the absence of active *T. cruzi* infections. Actually, the vertical inheritance could be appreciated in two marriages to which the marriages generated offsprings with kDNA mutations showing sequence alignments similar to the father.

In fact, an exogenous DNA incorporation by the human cell let us to see more complex process of parasite-host's interaction. The evolution of living creatures suggests that lateral transfer of exogenous DNA, mutations and hitchhiking, genetic drifts and social heterosis could be considered ongoing forces leading to genetic diversity and evolution.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, vertical DNA transference, exogenous DNA integration, Retrotransposons, LINE-1, genome evolution.

# Índice

<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1. A Doença de Chagas .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.2 Vias de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.3 Patogênese.....	6
1.3.1 Aspectos clínicos da doença de Chagas .....	6
1.3.2 Aspectos imunes da doença de Chagas .....	8
1.3.3 Doença de Chagas e auto-imunidade.....	9
1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	11
1.5 Organização gênica do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
1.6 Organização gênica do DNA mitocondrial (kDNA).....	15
1.7 Editoração do RNA .....	17
<b>2. Remodelamento do genoma .....</b>	<b>18</b>
2.1 Evoluções dos organismos e evolução gênica .....	18
2.2 Transferência vertical de genes .....	21
2.3 Elementos transponíveis.....	22
2.4 Características dos retrotransposons .....	24
2.5 Doenças relacionadas com retrotransposons.....	26
2.6 Elementos transponíveis em células germinativas .....	28
<b>3. Integração de seqüências de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma da célula hospedeira .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Justificativa .....</b>	<b>31</b>
<b>II. Objetivos .....</b>	<b>32</b>
<b>1. Objetivo geral .....</b>	<b>32</b>
<b>2. Objetivos específicos:.....</b>	<b>32</b>
<b>III. Materiais e Métodos .....</b>	<b>33</b>
<b>1. Descrição do grupo estudado .....</b>	<b>33</b>
1.1 Amostragem.....	34
<b>2. Extração do DNA .....</b>	<b>34</b>
2.1 Extração do DNA de células germinativas .....	34
2.2 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	35
2.3 Extração de kDNA .....	36
<b>3. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....</b>	<b>37</b>
<b>4. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) .....</b>	<b>37</b>

<b>5. Amplificação das regiões flanqueadoras do kDNA de <i>T. cruzi</i> integrado no genoma de células germinativas.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Clonagem e transformação em <i>E. coli</i> competente .....</b>	<b>43</b>
6.1. Ligação do inserto ao vetor.....	43
6.2. Preparo de células competentes .....	43
6.3. Transformação genética de <i>E. coli</i> .....	44
6.4. Seleção dos clones recombinantes de <i>E. coli</i> .....	44
6.5. Extração de DNA plasmidial.....	45
<b>7. Southern Blot dos produtos de PCR.....</b>	<b>46</b>
<b>8. Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon .....</b>	<b>46</b>
<b>9. Ensaio de hibridização .....</b>	<b>47</b>
9.1. Marcação de sondas radioativas.....	47
9.2. Purificação de sondas radioativas.....	47
9.3. Pré-hibridação e hibridação .....	48
<b>10. Seqüenciamento dos clones e análise em banco de dados .....</b>	<b>48</b>
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Estudo das Famílias .....</b>	<b>49</b>
<b>2. Amplificação de seqüências de kDNA e DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i> em esperma de indivíduos chagásicos e descendentes .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Obtenção de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas .....</b>	<b>54</b>
<b>4. Análise das seqüências obtidas mediante <i>psTAIL</i>- PCR.....</b>	<b>56</b>
<b>V. Discussão .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Aspectos gerais .....</b>	<b>65</b>
<b>2. Detecção de material genético do <i>Trypanosoma cruzi</i> em células germinativas humanas... </b>	<b>65</b>
<b>3. Identificação dos sítios de inserção do kDNA no genoma de células germinativas .....</b>	<b>67</b>
<b>4. Considerações finais.....</b>	<b>70</b>
<b>VI. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>86</b>

# I. Introdução

## 1. A Doença de Chagas

A doença de chagas ou Tripanossomíase Americana está amplamente distribuída no continente americano. A descoberta do seu vetor, agente etiológico e descrição da suas características clínicas foram relatadas pela primeira vez pelo médico e pesquisador Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909).

Atualmente, 25% de todos os habitantes da América Latina (100 milhões de pessoas) estão sob risco de adquirir a doença, e 18 milhões de pessoas já estão infectadas pelo *T. cruzi*. Estima-se a morte de 33 mil chagásicos por ano no Brasil (WHO, 2002). A morbidade desta zoonose é relativamente alta: 30 a 40% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam um grau variado de cardiopatia e, 8 a 10% desenvolvem formas digestivas caracterizadas por dilatações no esôfago e/ou cólon (Brener, 1987). A doença de Chagas representa ainda, a principal causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente produtivos nos países endêmicos de América Latina (Moncayo, 2003).

Do ponto de vista econômico, a perda anual para o continente Latino Americano foi calculada em cerca de 6,5 bilhões de dólares (1997); o Brasil gasta aproximadamente 750 milhões de dólares por ano no tratamento de pacientes chagásicos (2000). Calcula-se que o investimento anual dos governos dos países latino-americanos, visando o controle da doença de Chagas, é muito inferior à perda econômica causada por esta endemia.

A doença é característica de populações da área rural, com condições socioeconômicas que favorecem o contato do hospedeiro humano com triatomíneos e que são determinantes na manutenção da transmissão em vários locais da América Latina. Mudanças culturais e sociais têm permitido que a doença se estenda a áreas urbanas mudando radicalmente os aspectos da epidemiologia e convertendo a transmissão por transfusões sangüíneas em um fator importante dentro do aspecto geral da gênese e manutenção da patologia (Marin, 2003).

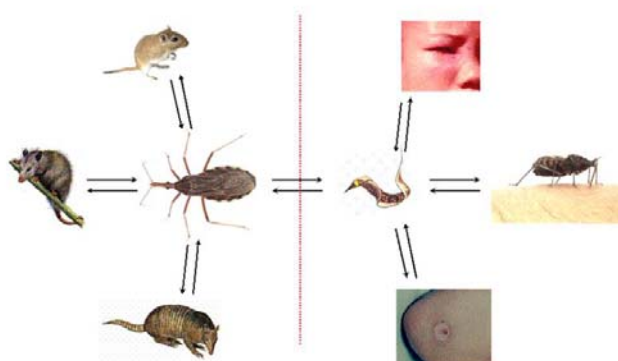
### **1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado heteroxeno, portanto seu ciclo biológico envolve uma passagem obrigatória em dois hospedeiros: um inseto vetor e o hospedeiro vertebrado mamífero. Durante o ciclo de vida, o parasita sofre alterações morfológicas, ultraestruturais, funcionais e bioquímicas que resultam na diferenciação em duas formas replicativas, epimastigota e amastigota, e uma forma não replicativa e infectiva, os tripomastigotas (Tyler e Engman, 2001).

As formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) do *T. cruzi* são eliminadas nas fezes e/ou urina dos insetos e depositadas na pele ou mucosa do mamífero durante o repasto do triatomíneo, este material biológico causa irritação e ao se coçar o indivíduo leva as fezes contaminadas para a abrasão da picada na pele, ou para a mucosa da boca ou conjuntiva dos olhos (Kollien e Schaud, 2000). O protozoário inicia a infecção invadindo as células fagocíticas no local de entrada no corpo do indivíduo. Ali, alguns dos flagelados invasores podem ser destruídos, mas muitos conseguem se

internalizar e se multiplicar no citoplasma da célula do hospedeiro (Teixeira, 2007). Quando os parasitos evadem o vacúolo fagocítico, ocorre a diferenciação para a forma amastigota e sua conseqüente divisão binária. Com o crescente número de parasitos no interior da célula, estes voltam a se diferenciar em tripomastigotas, são liberados no sangue com a destruição celular e tornam a parasitar células adjacentes. Eventualmente, o inseto hematófago ao fazer o seu repasto em um hospedeiro mamífero infectado, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas e estas, por sua vez, transformam-se em epimastigotas. No intestino médio do inseto, os epimastigotas multiplicam-se pela divisão binária, no intestino posterior, onde a população de epimastigotas se diferencia em tripomastigotas metacíclicos infectantes. Ao serem eliminados com as fezes os metacíclicos podem reiniciar o ciclo ao contaminar um animal ou homem (Tyler e Engman, 2001).

A relação parasita-hospedeiro (figura1) é complexa e tanto a genética do hospedeiro quanto do parasito interferem no processo de evolução da doença (Brenner e Barral-Netto, 2000).



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

## 1.2 Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi*

Existem várias vias de transmissão da Doença de Chagas, sendo que a principal ocorre por meio de insetos triatomíneos (Abad-Franch e Monteiro, 2005). Originalmente encontrados em muitas espécies animais, atingiu a espécie humana através de vetores insetos pertencente à família Hemíptera e subfamília *Triatominae*.

Atualmente, já foram descritas mais de 130 espécies de triatomíneos amplamente distribuídos em todo o continente americano e também nos continentes africano, asiático e australiano. Pelo menos quarenta dessas espécies de triatomíneos já foram encontradas contaminadas com *T. cruzi* e, portanto, elas são transmissoras potenciais das infecções (Futuyama, 1998).

A literatura registra muitos episódios de transmissão ativa do *T. cruzi* dos triatomíneos para as populações que vivem nas periferias das grandes cidades da América Latina (Teixeira, 2007).

A via vetorial, a mais representativa, as formas infectantes do parasita presente nas fezes dos triatomíneos entram em contato com a mucosa ou com a pele do indivíduo após o repasto do inseto vetor (Prata, 2001). Há três ciclos de transmissão vetorial. O ciclo doméstico é o de maior importância epidemiológica, pois perpetua a infecção em seres humanos. No ciclo silvestre, os triatomíneos, uma vez contaminados, infectam roedores, marsupiais e outros animais silvestres. O terceiro ciclo é o peridoméstico, no qual intervêm mamíferos que, livremente, entram e saem das residências, atraindo os triatomíneos. Este ciclo serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Brenner e Barral-Netto, 2000).

Na zona urbana, a transfusão sangüínea é considerada a principal via de transmissão, onde residem 70% da população das Américas (Bonametti e cols, 1998). Avalia-se que 20 mil novos casos são produzidos a cada ano apenas por transfusão de sangue contaminado. Com a intensa migração de populações de áreas rurais, em que a doença era mais freqüente, para as urbanas, cresceu o risco dessa modalidade de transmissão, devido ao fato de que o controle sorológico dos doadores não era adequadamente realizado (Wanderley e cols, 1993). Muitos países ainda não contam com este controle, já que contribui para a ampla disseminação da doença além das áreas endêmicas (Teixeira, 2007).

Muitas microepidemias de doença de Chagas aguda que se têm documentado têm sido associadas com a transmissão por via oral. Dias (2006) descreve dez episódios de contaminação humana pela ingestão do parasito, inclusive o surto ocorrido em Santa Catarina, em 2005, devido à ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado.

Outros modos de infecção como, congênita, transplantes de órgãos, aleitamento materno e acidente em laboratórios de pesquisas, também vem adquirindo importante papel na epidemiologia do *T. cruzi*, principalmente nesta última década com o controle da transmissão vetorial, pelo *Triatoma infestans* (Schofield e cols, 2006).



## **1.3 Patogênese**

### **1.3.1 Aspectos clínicos da doença de Chagas**

Após a infecção pelo *T. cruzi*, há um período de incubação (cerca de sete dias), com posterior invasão de vários tipos celulares como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Porém, o *T. cruzi* têm tropismo preferencial por fagócitos mononucleares, células musculares, e células adiposas (Rey, 2002). Após a invasão, a patogênese da doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica. Esta última pode se apresentar sob diferentes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (Ferreira e cols, 2002; Rey, 2002). A fase aguda geralmente passa despercebida; o paciente não relata ao médico aqueles sinais de febre, mal-estar, cefaléia, dores musculares e articulares que caracterizam o processo infeccioso agudo, por ser confundido com um estado infeccioso geral, levando assim o indivíduo a fase crônica da doença, sem o diagnóstico da infecção inicial. De acordo com a porta de entrada do parasito, pode ocorrer um inchaço nos olhos (sinal de Romanã) ou lesão cutânea (Chagoma) endurecida, típica hipersensibilidade tardia aos antígenos do protozoário (revisto em Teixeira e cols. 2006; Prata, 2001). Quando ocorre, a patologia da doença de Chagas na fase aguda caracteriza-se pela abundância dos ninhos com as formas amastigotas do *T. cruzi* nos tecidos, particularmente nas células musculares estriadas do coração e dos músculos esqueléticos e lisos do corpo humano. A principal causa de morte nesta fase é a insuficiência cardíaca, resultante da miocardite severa que se instala no paciente infectado (Laranja e cols, 1956; Cunha-Neto e cols, 2006).

Na forma indeterminada, não há lesão macroscópica significativa no coração ou no tubo digestivo. Esta fase pode durar décadas, os indivíduos apresentam evidências sorológicas e é caracterizada pela baixa parasitemia, pela presença de formas amastigotas quiescentes do parasito no tecido muscular e pela dificuldade na detecção do agente infeccioso. Os fatores responsáveis pela transição da forma indeterminada para formas sintomatológicas na fase crônica ainda não foram elucidados. (Teixeira e cols, 1987; Cunha-Neto e cols, 2006).

Durante a fase crônica, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o desenvolvimento da patologia, pois a presença escassa do parasita é desproporcional ao dano tecidual. Um aspecto marcante no curso da doença de Chagas crônica é a variabilidade de suas manifestações clínicas e eletrocardiográficas. Estima-se que 25% das pessoas infectadas desenvolvem a fase crônica (Bustamante e cols, 2003). Um dos primeiros estudos prospectivos em área endêmica mostrou que, na população com as infecções crônicas, 57% das mortes estavam diretamente relacionadas com a doença de Chagas. Entre estas, 58% ocorreram por insuficiência cardíaca e 37,5% ocorreram subitamente (Prata, 1999).

A cardiomiopatia chagásica está associada com a alta letalidade na fase crônica da doença de Chagas. Em 5,5% dos casos, observa-se a presença de distúrbios gastrintestinais (megaesôfago e megacólon) que afetam o chagásico e se associam com a sua morte, geralmente depois dos 45 anos de idade (Teixeira e cols, 2006).

A duração destas fases pode ser diferente entre os indivíduos, mas em geral o que se observa é um período de até 90 dias para a fase aguda, de até

20 anos para fase crônica indeterminada e um período muito variável para fase crônica sintomática, dependente da forma clínica e gravidade do quadro desenvolvido pelo paciente.

### **1.3.2 Aspectos imunes da doença de Chagas**

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se diretamente a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasita (Brodskyn e Barral-Netto, 2000). Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária, nos tecidos do hospedeiro. No entanto, o parasito persiste, assim como, a resposta imunológica. Lesões teciduais resultantes dessa atividade imunológica levam às alterações fisiológicas funcionais musculares e nervosas características da doença de Chagas (Brener e Barral-Netto, 2000).

O sistema imunológico é responsável tanto pelo controle da multiplicação do parasito nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária. A multiplicação exagerada do parasito no hospedeiro pode levar à morte. Esse efeito é prevenido por citocinas pró-inflamatórias tipo 1: IL-12, TNF- $\alpha$  e INF-  $\gamma$  (Reis e Lopes, 2000). A mortalidade é prevenida por uma combinação dos efeitos antiparasitários das citocinas tipo 1 com os efeitos antagônicos das citocinas regulatórias antiinflamatórias como a TGF- $\beta$  e a IL-10 (Brener e Gazzinelli, 1997). Esta combinação é benéfica, pois as citocinas tipo 1 atuam para controlar o parasitismo, mas também, exercem efeitos tóxicos letais para o hospedeiro, se produzidas em excesso (Gomes e cols, 2003).

A invasão dos macrófagos pelo *T. cruzi* mobiliza a resposta imunológica, secretando IL-12, que ativa células NK a produzirem INF- $\gamma$ . Esta citocina age reciprocamente nos macrófagos ativando-os para a atividade microbicida. O TNF- $\alpha$  atua sinergicamente com o IL-12 e INF- $\gamma$ . Em associação com o TNF- $\alpha$ , o INF- $\gamma$  produzido por células NK ativa a expressão, em macrófagos, da enzima óxido nítrico (NO) - sintase induzida e a produção de NO, com atividade tóxica para o *T. cruzi*. Esta atividade é auto regulada, reduzindo a ativação dos macrófagos e produção de NO. As citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a produção do NO e a atividade tripanocida dos macrófagos ativados pelo INF- $\gamma$  (Brener e Gazzinelli, 1997). Acha-se que a regulação positiva da via de sinalização do interferon-gama pode ser associada com hipertrofia do coração (Cunha-Neto e cols, 2005).

Estudando infiltrados inflamatórios do tecido cardíaco, Higuchi e cols, (1993b) observaram grande quantidade de células T CD4+ e células T CD8+ com predominância de subgrupos de CD8+. Alguns autores (Dos Santos e cols, 2001; Lannes-Vieira, 2003) acreditam que a predominância de células T CD8+ nos tecidos cardíacos é devida à expressão de moléculas de adesão (CAMs) nestas células.

### **1.3.3 Doença de Chagas e auto-imunidade**

Ao longo de décadas, tem-se sugerido que a persistência do parasito nos tecidos, levando à ruptura das células parasitadas seria o principal fator de produção de lesões. De acordo com essa teoria, a ruptura mecânica da célula hospedeira, causada pelos parasitos, e a degradação dos tecidos afetados podem levar a inflamação crônica. Portanto, um dos aspectos mais

intrigantes da doença de Chagas crônica são os intensos processos inflamatórios, associados à relativamente poucos parasitos (Andrade, 1983 e 1991; Andrade e cols, 1994). Entretanto, tal pensamento não explica, por exemplo, por que os pacientes não morrem todos quando o parasitismo é intenso na fase aguda da infecção e, também, por que dois terços dos chagásicos crônicos sequer têm lesões com manifestações clínicas.

Diante da constatação de uma rejeição acelerada de células cardíacas alogênicas pelos linfócitos imunes de coelhos cronicamente infectados com *T. cruzi*, foi iniciada a base da teoria auto-imune (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Teixeira e cols, 1975). Os dados experimentais mostraram que células embrionárias de coração de coelhos eram rapidamente destruídas pelos linfócitos imunes em uma hora, enquanto os linfócitos de coelhos controle, não infectados, não as destruíam (Teixeira, 2007).

Cunha Neto e cols (1986) foram alguns dos autores que contribuíram com dados que confirmam a auto-imunidade na Doença de Chagas. Eles relataram que a miosina cardíaca induzia a proliferação de clones de células T CD4<sup>+</sup>, derivados de infiltrados nas lesões cardíacas em pacientes chagásicos crônicos. Ribeiro dos Santos e cols (1992) mostraram que enxertos de coração de fetos de camundongos em animais geneticamente idênticos são destruídos pelas células do sistema imune do receptor, enquanto que camundongos saudáveis não mostram a rejeição do enxerto.

Seguindo outra vertente, pesquisadores têm relacionado os mecanismos de auto-imunidade como fator de desencadeamento das lesões da doença de Chagas, estimulando discussões constantes sobre o papel dos antígenos do *T. cruzi*, epítomos de reação cruzada e mimetismo molecular. Neste processo,

haveria uma resposta cruzada entre epítomos do hospedeiro e antígenos do parasito, o que levaria a resposta imune a atuar contra proteínas do próprio tecido. Elementos de informação e dados esclarecedores sobre a discussão do assunto são encontrados em extensos trabalhos de revisão da literatura de Leon e Engman (2003) e de Tarleton (2003).

Alguns pesquisadores pensam que as lesões chagásicas são produzidas apenas pelo parasito, e certamente, a persistência do parasito é fundamental para desencadear o fenômeno da auto-imunidade, mesmo porque jamais existiu doença de Chagas onde não havia o *T. cruzi*. Contudo, os papéis desempenhados pela persistência do parasito e pela auto-imunidade podem ser considerados essenciais na patogênese da doença de Chagas.

#### **1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial**

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela clínica e confirmado, quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial. O primeiro diagnóstico da Doença de Chagas foi feito no dia 23 de abril de 1909, quando Carlos Chagas descobriu por observação microscópica de esfregaço de sangue fresco, o parasito em uma menina de três anos de idade, em plena fase aguda da doença (Teixeira, 2007).

A presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e/ou chagoma de inoculação), acompanhados de febre irregular ou ausente, adenopatia-satélite ou generalizada, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema generalizado ou dos pés fazem suspeitar da fase aguda da doença. As alterações cardíacas acompanhadas de sinais de insuficiência cardíaca confirmada pelo eletrocardiograma e as alterações digestivas e do esôfago e

do cólon (reveladas por raios X) fazem sintomatologia da fase crônica (Lana e Tafuri, 2000; Brener e Barral-Netto, 2000; Rey, 2001).

Os métodos de diagnóstico laboratorial devem ser direcionados de acordo com a fase da doença. Na fase aguda, observa-se alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos (IgM e IgG) que podem atingir níveis elevados. Nessa fase recomendam-se métodos parasitológicos, como a pesquisa direta do parasita (a fresco, micro-hematócrito e gota espessa) e, se necessário, pesquisa indireta (xenodiagnóstico, hemocultura e PCR) (Lana e Tafuri, 2000; Luquetti e Rassi, 2000; Rey, 2001).

Na fase crônica observam-se baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG). Assim, recomendam-se métodos sorológicos (IFI, ELISA e HAI) ou a pesquisa do parasita por métodos indiretos (xenodiagnóstico, hemocultura e PCR), que são necessários em caso de sorologia duvidosa ou quando se deseja verificar a eficácia do tratamento (Lana e Tafuri, 2000; Luquetti e Rassi, 2000; Rey, 2001).

Resultados duvidosos ou falsos positivos devido à reação cruzada contra antígenos de *T. cruzi* podem ser encontrados no soro de alguns pacientes com leishmaniose, malária, toxoplasmose, paracoccidiodomicose ou, ainda, com infecção bacteriana do tipo tuberculose, lepra e sífilis e com condições auto-imunes tais como, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (Vexenat e cols, 1996; Gadelha e cols, 2003). A OMS recomenda dois testes para o diagnóstico da doença de Chagas, em vista das dificuldades descritas acima, para resultados discrepantes, utiliza-se um terceiro teste, e procura-se considerar resultado positivo ou negativo, quando

houver resultado concordante em dois exames sorológicos que identificam anticorpos anti-*T. cruzi*,(Luquetti e Rassi, 2000; Pirard e cols,2005).

### **1.5 Organização gênica do *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Como ocorre nos eucariotos, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, um compreende o núcleo e o outro a mitocôndria, na qual está localizado o cinetoplasto, um DNA de estrutura peculiar, também chamado de kDNA. O conteúdo total de DNA (DNA nuclear + kDNA) do *T. cruzi* varia intensamente entre as diferentes cepas e clones, existindo inclusive variações entre clones derivados de uma mesma cepa (Franco da Silveira, 2000).

O genoma nuclear do *T. cruzi*, tal como ocorre em outros eucariotos, é composto por seqüências de DNA que podem ser agrupadas em 3 classes majoritárias: a) seqüências que codificam proteínas, b) seqüências que codificam RNAs e c) seqüências repetitivas (DNA repetitivo), as quais, de maneira geral, não são transcritas. Deve-se também levar em conta a presença de seqüências espaçador as existentes entre genes codificadores de proteína ou RNA que podem conter elementos reguladores da transcrição (promotores, ativadores) (Franco da Silveira, 2000).

As seqüências repetitivas representam cerca de 40% do genoma nuclear e podem aparecer agrupadas ou dispersas no genoma. Embora a maioria das seqüências repetitivas não sejam codificadoras, alguns genes de proteínas ou RNAs contribuem para a formação da fração repetitiva do genoma como, por



exemplo, o RNA da seqüência líder que possui mais de 200 cópias dispersas no genoma (Franco da Silveira, 2000).

Muitas seqüências repetitivas estão organizadas em *tandem* (micro e minisatélites, os genes de rRNAs, RNA da seqüência líder, tubulina), isto é, as repetições aparecem dispostas uma após a outra de maneira regular e periódica. Esses agrupamentos podem estar distribuídos em diferentes cromossomos, e o número de cópias da repetição pode variar de um agrupamento para outro. Os microssatélites são pequenas seqüências de DNA (~6 nts), arranjadas em *tandem* e dispersas em um grande número de *loci* no genoma. Apresentam elevado grau de polimorfismo, principalmente no que diz respeito ao número de repetições em um dado *locus*. Por esse motivo, os microssatélites são extremamente úteis em estudos filogenéticos, taxonômicos e genéticos (Requena e cols, 1996).

No genoma de *T. cruzi*, os genes codificadores de proteína podem ser encontrados em cópia única ou duplicados. A maioria dos genes codificadores de proteínas ou RNA caracterizados em *T. cruzi* está presentes em duas ou mais cópias, as quais podem estar localizadas em uma única região do cromossomo ou em diferentes cromossomos. É importante notar que as cópias duplicadas de um determinado gene podem apresentar divergências entre si, conseqüência do processo evolutivo. Os dados disponíveis sugerem haver correlação entre o número de cópias de um dado gene do *T. cruzi* e a concentração de seu produto (RNA ou proteína) na célula (Franco da Silveira 2000).

A tendência do tripanosoma em duplicar os seus genes e agrupá-los em *tandem* poderia estar relacionada com a compensação de eventuais perdas

de genes essenciais durante as constantes mudanças do genoma (amplificação e translocação das sequências gênicas) e com a transcrição policistrônica, já que o arranjo em *tandem* facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Franco da Silveira, 2000).

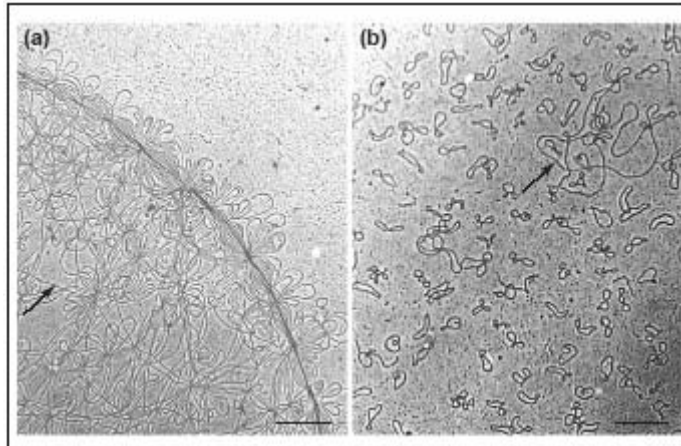
### **1.6 Organização gênica do DNA mitocondrial (kDNA)**

O *T. cruzi* e outros membros de sua família possuem uma única e grande mitocôndria, que alberga moléculas circulares de DNA. Estas moléculas circulares chegam a representar 10% a 15% do DNA total da célula (Lukes e cols, 2002). O cinetoplasto ou kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, denominadas minicírculo e maxicírculo, as quais estão interligadas formando rede única (Figura 2).

A organização do kDNA lembra uma rede de pescar; a corda de puxar a rede chama-se maxicírculo, e cada mecha fina da rede chama-se minicírculo (Teixeira, 2007). Cada uma das 40 a 50 cópias de maxicírculos tem cerca de 40 kb e possuem os genes que codificam as proteínas mitocondriais, tais com genes de rRNAs (rRNAs 9s e 12s) e de proteínas do complexo respiratório (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenases) (Klingbeil e Englund, 2004).

Os minicírculos têm 1.4 kb e estão presentes como milhares de cópias concatenadas ou entrelaçadas, formando a rede de kDNA. Cada minicírculo contém quatro regiões conservadas (120-160pb) igualmente espaçadas, nas quais se encontram origens de replicação do DNA; intercaladas por quatro regiões variáveis (280-320pb). As seqüências presentes no minicírculo não

são traduzidas em peptídeos, mas seqüências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados de gRNAs (RNA guia), que auxiliam na editoração dos mRNAs dos maxicírculos mitocondriais.



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

O processo de replicação do cinetoplasto depende de uma enzima topoisomerase, e inibidores desta, têm atividade tripanocida (Barret e cols, 2003). A replicação envolve a duplicação do número de minicírculos e maxicírculos que serão distribuído igualmente nas progênies (Liu e cols, 2005a). Pouco se sabe sobre a replicação dos maxicírculos, a não ser que ela ocorre de maneira unidirecional, a partir de uma origem única, e que não há o desprendimento dos maxicírculos da rede.

Atualmente, um modelo propõe que, antes da sua replicação, os minicírculos sofrem a ação de uma topoisomerase II que os cliva e lineariza a fita dupla de DNA do minicírculo, propiciando a liberação individualmente destes da rede na zona cinetoflagelar situada entre o kDNA e a membrana mitocondrial próxima do corpo basal do flagelo; onde serão replicados na

presença de uma série de proteínas, como DNA primases e polimerases (Abu-Elneel e cols, 2001; Das e cols, 2004). Os minicírculos replicados apresentam *gaps* que deverão ser removidos antes que eles retornem ao disco de kDNA. A reintegração dos minicírculos também envolve topoisomerasas que promovem a ligação das moléculas recém sintetizadas com a rede de kDNA (Liu e cols, 2005b; Lukes e cols, 2005).

### **1.7 Editoração do RNA**

A editoração é uma forma de processamento de mRNA que regula a expressão dos genes mitocondriais em tripanossomatídeos.

A descoberta dos RNAs guias (gRNA) estabeleceu as bases para o estudo da editoração de mRNAs. Os mRNAs codificados no maxicírculo necessitam sofrer modificações , através da adição ou deleção de resíduos de uridinas, para então poderem ser traduzidos (Blum e cols, 1991) . Os gRNAs, produzidos pelos minicírculos, atuam como doadores ou aceptores de resíduos de uridina no mRNA. Os gRNAs possuem cerca de 15 nucleotídeos e são complementares a cada região do mRNA a ser editada, formando assim um híbrido entre o mRNA e gRNA. Esta união de RNAs, associada às proteínas codificadas por genes nucleares e importadas para a mitocôndria, forma um complexo ribonucléico que é essencial para a iniciação e propagação da editoração do RNA (Mandison-Antenucci e cols, 2002).

## **2. Remodelamento do genoma**

### **2.1 Evoluções dos organismos e evolução gênica**

Há aproximadamente 2 bilhões de anos, em diferentes partes do planeta, um novo reino de células evoluiu das interações bacterianas por meio de trocas gênicas incontáveis. Essas novas células foram os primeiros eucariontes protistas, iniciando assim a era Proterozóica. Esses novos seres unicelulares posteriormente evoluíram para a formação dos protistas multicelulares, que por sua vez deram origem aos outros três reinos da vida: Fungi, Plantae e Animalia. Todos os seres eucariontes surgiram a partir dos protocistas. Evolução, portanto, significa descendentes com modificações (Margulis e Sagan, 2000).

Atualmente, as diferenças entre comportamento, genética, organização, metabolismo e especialmente estruturas, entre eucariontes e procariontes, são abissais. Essas diferenças marcam a grande divisão celular: procariontes e eucariontes formam os dois grandes grupos da vida na Terra (Margulis, 2000; Margulis e Sagan, 2000; Hawking, 2002).

Ainda que não saibamos como a vida começou, existem indícios sugestivos de que os seres vivos tenham surgido pela aproximação, pela associação, pela cooperação e pela simbiose de microorganismos primitivos organizados a partir de moléculas de RNA, DNA e proteínas circunscritos, por uma película externa de lipídio e carboidrato.

Hoje, muitos pesquisadores concordam que fungos, plantas e animais evoluíram de protistas ancestrais por meio de associações simbióticas com bactérias. O simbiotismo foi corroborado pela descoberta das mitocôndrias e dos cloroplastos nas células eucariontes. Combinando metabolismo e genes

das duas células, diferentes protistas aeróbicos evoluíram para os fungos e os animais, assim como a partir das algas surgiram as plantas (Margulis, 2000; Margulis e Sagan, 2000; Hawking, 2002).

Associações simbióticas é um fenômeno bastante comum, e isso tem sido demonstrado pelo seqüenciamento de genomas. Evidências genéticas indicam que as mitocôndrias e os cloroplastos teriam surgido a partir de eubactérias ancestrais que passaram a manter uma relação endossimbiótica com seus hospedeiros (Gray, 1999). Além disso, acredita-se que, durante a evolução dos vertebrados, uma centena de genes bacterianos tenha sido transferida para o genoma humano (Lander e cols, 2001).

Os genomas evoluíram através da aquisição de novas seqüências de DNA, e pelo rearranjo de seqüências já existentes. A introdução de novas seqüências é resultante da capacidade de transferência gênica entre os genomas, enquanto que a alteração de genes existentes retrata os efeitos de sucessivos mecanismos de recombinação gênica. Existem relatos de que, através do contato físico entre plantas e parasitos, pode ocorrer transferência de genes entre organismos eucariotos (Mower e cols, 2004; Davis e Wurdack, 2004).

Os rearranjos gênicos surgiram a partir de erros durante a replicação de DNA e nos mecanismos de reparo, ou através de processos de recombinação desigual e aquisição gênica horizontal. Durante a evolução dos animais, grandes rearranjos gênicos ocorreram, envolvendo segmentos cromossômicos e até mesmo genoma inteiro. Esses rearranjos rapidamente aumentaram o número de genes no genoma, gerando divergências que vieram por originar as diferentes espécies de seres vivos.

Segundo a teoria de Darwin, reinterpretada por Margulis e Sagan (2002), as mutações de DNA e cromossômicas, a simbiose, as transferências gênicas e as fusões sexuais contribuem para a seleção natural, processo contínuo de mudança evolutiva.

De fato, os processos evolutivos que criaram os eucariontes a partir das bactérias e os animais a partir dos protistas são contínuos e permanecem exercendo atividade sobre os seres vivos da atualidade. Alguns trabalhos revelam a aquisição de DNA de hospedeiros mamíferos por parasitos. Imase e cols (2004) identificaram seqüências de nucleotídeos provenientes de camundongos no genoma de *Schistosoma japonicum* adultos e de seus descendentes (cercárias). Igualmente, Williams e cols (2006) e Demarco e cols (2007) estudaram a albumina de *S. mansoni*, uma proteína bastante incomum entre invertebrados, que apresentava alta similaridade com a albumina de mamíferos, sugerindo a transferência do gene do hospedeiro para o verme.

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

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

## **2.2 Transferência vertical de genes**

Quando o ser estando vivo dá origem a outro ser similar, isso é conhecido como reprodução vertical (Teixeira, 2007). Nesse modelo mendeliano de reprodução existe a herança paterna e materna transmitida pela divisão meiótica das cromátides durante a divisão dos cromossomos. Nesse processo, as únicas diferenças são atribuídas a mutações, recombinações genéticas, variação do desenvolvimento.

Portanto, existem dois tipos de aquisição de caracteres hereditários importantes: transferência gênica horizontal e transferência gênica vertical. O primeiro refere-se à troca de material genético de uma espécie para outra, afetando unicamente o indivíduo que adquiriu o DNA. O segundo e o mais conhecido estão relacionados com a passagem das seqüências integradas para a progênie, produzindo efeito sobre a população. Nesse caso, é imprescindível que a assimilação do DNA exógeno também ocorra nas células germinativas. Esses dois tipos de herança têm propiciado diferenciação e crescimento prodigioso de espécies, além de aumento incessante da diversidade gênica.

Em 1998, Magnano e cols demonstraram que DNA exógeno pode ser espontaneamente capturado e internalizado no núcleo de espermátocitos de camundongos. No contexto, foi reconhecida uma região específica no segmento equatorial e região pós-cromossomal da cabeça do



espermatozóide, a qual tem capacidade de ligação com o DNA exógeno (Camaioni e cols, 1992). Em 1998, Spadafora afirma que os espermatozoides de uma grande variedade de espécies são capazes de interagir com DNA do meio e atuar como vetores.

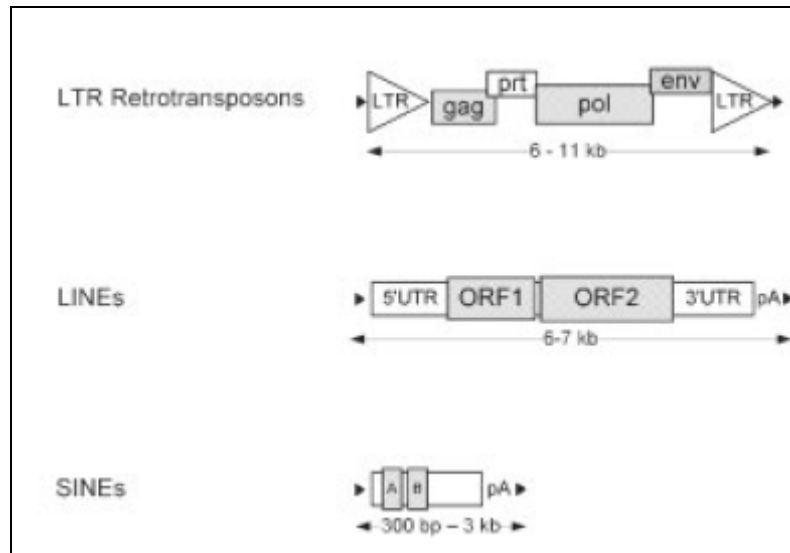
A literatura sugere que a herança de DNA transferido verticalmente entre procariontes pode ter impacto na evolução dos seres vivos. Porém, a transferência vertical de DNA entre eucariontes tem sido documentada ocasionalmente (Keeling e col, 2005). Entretanto, tem sido visto que algumas espécies acumulam mutações mais rapidamente que outras, e, como um relógio de parede antigo, o relógio molecular necessita de calibração com auxílio de dados e informação provenientes das seqüências de DNA obtidas das espécies existentes (Teixeira, 2007).

### **2.3 Elementos transponíveis**

Sabemos que o DNA da maioria dos eucariontes é composto em mais de 50% por seqüências repetitivas (Deininger e Batzer, 1999). Grande parte dessas regiões repetitivas é formada por elementos transponíveis ou seqüências de DNA móveis capazes de se transportar para outros locais dentro do genoma, sem qualquer obrigatoriedade reconhecida de homologia relacionada com o sítio-alvo de posicionamento novo. Esse evento limita a mobilização de si mesmo, mas, as vezes, podem carregar algumas seqüências adicionais. O impacto funcional das alterações do genoma poderia incluir alterações na expressão de genes endógenos assim como na geração de produtos quiméricos resultantes da fusão do genoma hospedeiro com DNA exógeno (Teixeira, 2007).

De acordo com suas estruturas e mecanismos de transposição, Os elementos transponíveis eucariontes costumam ser agrupados em duas classes, os chamados retrotransposons e DNA transposons. Enquanto os retrotransposons englobam os elementos que se movem via uma cópia de RNA e utilizam a transcriptase reversa, os DNA transposons utilizam uma transposase (proteína responsável pelo reconhecimento do sítio onde o elemento transponível se insere) para transpor um DNA intermediário (Casse e cols, 2006). Os elementos da classe I e II são chamados, respectivamente, de retrotransposons e transposons.

O genoma humano possui pelo menos 7 principais classes de DNA transposons, mas, aparentemente, eles se encontram completamente inativos nos vertebrados, particularmente nos mamíferos (Hecht, 2008). Em relação aos retrotransposons, sabe-se da existência de um número muito maior de cópias no genoma humano, muitos dos quais permanecem ativos ainda hoje. Os retrotransposons são divididos em duas subclasses: Os que contêm LTRs (longas repetições terminais) e os que não contêm LTRs. Estes incluem LINEs (seqüências repetitivas longas) e SINEs (seqüências repetitivas curtas) (Figura 3).



**Figura 3:** Estrutura de elementos retrotransponíveis. Elemento LTR. Observa-se a presença dos genes *gag* (group-specific antigen), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). LINE, exemplo de elemento não-LTR. SINE é constituído por dois monômeros similares – A e B – e cauda poli-A. Adaptado de Babushok & Kazazian, 2007.

## 2.4 Características dos retrotransposons

Os retrotransposons LTR se integram no genoma através da ação da transcriptase reversa, e são detectados em todos os genomas de mamíferos e em aproximadamente 8% do DNA dos seres humanos. São flanqueados por longas repetições terminais, as quais contêm todos os elementos necessários para a regulação da transcrição. Suas estruturas e modo de replicação são similares aos dos retrovírus infectivos: possuem os genes *gag* e *pol*, que codificam uma protease, a transcrição reversa ocorre no citoplasma, iniciando a síntese a partir de um tRNA (Lewin, 2001). Devido a essas características, os elementos LTR também são chamados de retrovírus endógenos (Teixeira, 2007).

Os retrotransposons não-LTRs é representado pela família de LINEs, onde apenas o LINE-1, ou L1, se encontra ainda ativo, ou seja, possuem as duas *ORFs* intactas. Os LINE-1, ou L1, são os retrotransposons mais bem sucedidos em mamíferos, chegando a ocupar 17% do genoma humano. Este elemento emergiu há cerca de 120 milhões de anos e continua se expandindo no genoma humano (Lee e cols, 2006). Em humanos esses elementos têm cerca de 6000 pb e é constituído por uma 5'-UTR onde está o promotor de RNA Pol-II, duas fases de leitura aberta (*ORFs*), uma 3'-UTR e uma cauda poli-A. A *ORF-1* codifica uma proteína cuja função não é muito bem conhecida, mas sabe-se que ela tem afinidade por RNA e que é essencial para retrotransposição de L1 (Martin, 2006). A *ORF-2* codifica proteínas com atividade de endonuclease e transcriptase reversa (Hedges e Batzer, 2005). Assim, acredita-se que a inserção do LINE no cromossomo ocorre quando a endonuclease da *ORF-2* cliva uma única fita do DNA, liberando um 3' –OH que serve como *primer* para a transcrição reversa, utilizando o RNA de L1 como molde (Kazazian e Goodier, 2002).

Todos os genomas de mamíferos contêm altas proporções de SINEs, contudo, a natureza específica e o número de cópias destes retroelementos variam enormemente (Deininger e cols 2003). SINEs são elementos pequenos que possuem entre 75 e 500 pb e contêm um promotor de RNA polimerase III (enzima responsável pela transcrição), muito semelhante ao do tRNA, e uma cauda poli-A. Estão distribuídos entre DNA não-repetitivos, e ao contrário dos elementos LINEs, que se localizam principalmente em regiões ricas em AT, os SINEs encontram-se principalmente em regiões ricas em GC, freqüentemente próximos à regiões codantes. Estes retrotransposons não

codificam proteínas e, por isso, dependem da transcriptase reversa sintetizada pelos LINEs para mover pelo genoma. Os LINEs compartilham com SINEs as características de ter a sua extremidade 3' e as repetições diretas com tamanhos variáveis (Weiner, 2002; Daniels e Deininger, 1985)

Os elementos *Alu* são encontrados exclusivamente em primatas, este elemento é o único SINE ativo em humanos e representa 5% do genoma total (Lander e cols, 2001). Os membros da família *Alu* se apresentam muito semelhantes, mas não idênticos, apresentando uma identidade média de 87% com a seqüência consenso (Lewin, 2001).

## **2.5 Doenças relacionadas com retrotransposons**

Evidências moleculares envolvendo a estrutura e evolução de seqüência repetitiva do genoma indica que esses elementos representam uma grande fonte de variação genética. Estima-se que 0,5% das desordens genéticas humanas sejam resultantes da integração ou recombinação homóloga de elementos transponíveis (Hedges e Batzer, 2005). Entretanto, este número deve ser consideravelmente maior, pois ainda não se entende muito bem a patogênese de muitas doenças.

Em 1988, Kazazian e cols fizeram o primeiro relato, sugerindo que a inserção de um elemento L1 no gene do fator VIII pertencente à cascata de coagulação, era capaz de causar hemofilia do tipo A. Muitos outros casos de danos causados por elementos retrotransponíveis foram descritos. Chen e colaboradores (2006) foram capazes de identificar 51 eventos de mutações resultantes da integração de L1 e que estavam associadas a doenças genéticas. Musova e colaboradores (2006) relataram que a integração de L1

no exon 44 do gene da distrofina promovia a distrofia muscular de Duchenne. Hurk e cols (2007) demonstram que L1 é capaz de se retrotranspor no gene CHM do cromossomo X, causando uma séria doença ocular que pode ser passada para os descendentes.

A maioria das inserções de L1, que causam doenças, está no cromossomo X (Kazazian, 2000). Esse cromossomo tem duas vezes o nível normal de elementos L1 (30% contra 17%) indicando a ocorrência de sítio preferencial (*hot spot*) de inserções ou a existência de uma seleção positiva para L1 nesta parte do genoma (Bailey e cols, 2000). É possível que doenças ligadas ao cromossomo X sejam mais visíveis devido a sua única cópia no indivíduo macho. Contudo, o fato de ocorrer poucas inserções *Alu* neste cromossomo indica certa preferência indicada pela desproporcionalidade de elementos L1 neste cromossomo (Batzer e Deininger, 2002).

Várias doenças causadas por elementos *Alu* também já foram descritas: associação com leucemia, câncer de ovário e de mama, deficiência do complemento, neurofibromatose, entre outras (Deininger e Batzer, 1999). Estas inserções resultam em mutações, recombinações entre elementos, conversão gênica e alterações na expressão dos genes (Deininger e cols, 2003; Smit e Riggs, 1999).

É muito difícil estimar a fração de doenças humanas associadas a mutações promovidas por inserções de elementos *Alu* e LINE-1. Portanto, é crescente o número de evidências demonstrando que DNA repetitivo contribui para aparecimento de doenças, através de mutações causadas durante o processo de retrotransposição, ou através de processos de recombinação envolvendo trocas (*crossing over*) desiguais de elementos repetitivos.

## **2.6 Elementos transponíveis em células germinativas**

Transferência gênica mediada por esperma (SMGT) é um mecanismo através do qual novas informações genéticas são introduzidas em animais explorando a atividade dos espermatozoides de adquirir moléculas de DNA exógeno e liberá-las nos oócitos durante a fertilização (Spadafora, 2008b).

Em 1971, Brackett e cols tiveram os primeiros relatos de que as células do espermatozoide poderiam agir como vetores do DNA exógeno, mas na época isso foi totalmente ignorado. Só mais tarde em 1989, dois relatos independentes mostraram que os espermatozoides poderiam se associar com moléculas de DNA exógeno e transferi-las durante a fertilização resultando em uma progênie com modificação transgênica (Brinster e cols, 1989 e Lavitrano e cols, 1989). Desde então o protocolo tem sido estudado e relatos recentes mostram que as células do esperma também podem ser usadas, visto que moléculas de RNA no esperma podem induzir transferência gênica (Smith e Spadafora, 2005).

Resumidamente, a SMGT ocorre em dois passos que são facilmente reproduzíveis. O primeiro, a interação espontânea entre espermatozoides e as moléculas de DNA e o segundo, a liberação do esperma ligado ao DNA aos oócitos durante a fecundação (Spadafora, 2008b).

Estudos comprovaram a atividade da transcriptase reversa no esperma (Sciamanna e cols, 2003). De maneira geral, a transcriptase reversa endógena do esperma está mediando a atividade de retroelementos que podem se associar a moléculas de RNA ou DNA exógeno através de transcrição reversa e transcrição seqüencial. Cópias de cDNAs geradas nas células de esperma podem ser levadas para o embrião durante a fertilização

então, propagando nos tecidos como poucas cópias de estruturas extra-cromossomais, replicadas pela reprodução sexual dos fundadores e transferidas para a progênie de uma maneira não-Mendeliana (Spadafora, 2008a; 2008b). Sendo transcricionalmente competente, eles podem induzir uma alteração fenotípica em determinados tecidos. Uma atividade de transcriptase reversa também está presente em embriões pré-implantados e essa inibição causa desenvolvimento nos estágios iniciais da pré-implantação paralelo a uma reprogramação extensiva da expressão gênica (Spadafora, 2008a). Em analogia com isso, drogas mediando a inibição da transcriptase reversa ou RNA de interferência que silencia o LINE humano, reduzem a proliferação celular e induz diferenciação em uma grande variedade de células cancerígenas.

A SMGT deve ser um fenômeno natural de adaptação de animais e por possíveis agentes causativos de um rearranjo no genoma (Smith e Spadafora, 2005). Existem estudos que demonstram a ocorrência da atividade da transcriptase-reversa e elementos LINE-1 em células germinativas de mamíferos (Pittoggi e cols, 2003; Beraldi e cols, 2006).

### **3. Integração de seqüências de kDNA de *T. cruzi* no genoma da célula hospedeira**

Para tentar entender a Integração de seqüências de kDNA de *T. cruzi* no genoma da célula hospedeira, o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC), vem se dedicando a investigar o fenômeno em que o parasito age como vetor do kDNA e que as mutações produzidas no genoma do vertebrado induzem alterações no genótipo e no fenótipo do



organismo hospedeiro. Certamente, a ocorrência de integração de kDNA na vida embrionária precoce perpetua-se, via células germinativas, nas células somáticas mutadas.

A pesquisa mostrou que seqüências de minicírculos do parasito são transferidas para sítios específicos do genoma do coelho, e, também, do primata e do homem; em todos os casos o sítio da integração do kDNA, foi freqüentemente o retrotransposon LINE-1 (Nitz e cols, 2004). Utilizando um modelo de infecção *in vitro*, foi possível mostrar que o kDNA integrado nos elementos LINE-1 (Argañaraz, 1996), pode ser mobilizado para outro sítio do genoma da célula hospedeira (Simões-Barbosa, 2000).

A constatação de integração do kDNA no genoma hospedeiro, subseqüentes às infecções naturais pelo *T. cruzi*, sugere que se trata de um evento freqüente, superando as expectativas citadas na literatura (Simonson e cols, 2005; Choi e Kim, 2007).

A herança vertical das mutações de kDNA para as progênes de coelhos (Nitz e cols, 2004) e galinhas (Gomes, 2006), fez-se necessária para intensificar a investigação sobre a transferência vertical do kDNA integrado. Antecedendo o estudo da herança vertical, Hecht (2008), estudou a Transferência horizontal de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma de chagásicos e sua progênie em células somáticas.

#### **4. Justificativa**

Diante da informação sobre a transferência horizontal do kDNA nas famílias dos chagásicos (Hecht, 2008), esse estudo visou à avaliação do papel da transferência gênica vertical de kDNA de *T.cruzi*, em indivíduos daquelas mesmas famílias, via células germinativas.

O estudo das mutações nas células germinativas poderia ajudar a elucidação de uma questão de grande importância: As mutações do kDNA podem ser transmitidas para os descendentes? A detecção de marcadores genéticos específicos em alguns descendentes (livres da infecção) de chagásicos e a presença do kDNA integrado no genoma das células germinativas indicarão a possibilidade de transferência vertical da transmissão das mutações.

## II. Objetivos

### 1. Objetivo geral

Considerando os aspectos anteriormente descritos, foi definido como objetivo central do nosso trabalho verificar a transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* integradas via células germinativas dos chagásicos para seus descendes.

### 2. Objetivos específicos:

- Investigar a presença de kDNA e nDNA de *T. cruzi* no esperma de indivíduos chagásicos.
- Verificar a possibilidade de transferência vertical de kDNA para a progênie de chagásicos.
- Identificar os sítios de integração das seqüências de minicírculos do kDNA em sítios de cromossomos de células germinativas.

### III. Materiais e Métodos

#### 1. Descrição do grupo estudado

O projeto sobre avaliação da herança de mutações de KDNA de *Trypanosoma cruzi* em cinco famílias, cujos fundadores eram portadores da doença de Chagas, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Todos os sujeitos aderiram à pesquisa voluntariamente e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. A idade dos pacientes que participaram deste trabalho variou entre 18-61 anos. Os dados epidemiológicos de cada paciente foram coletados através de questionário médico (ANEXO I), feito no momento da entrevista e o esclarecimento sobre o projeto foi dado, individualmente, com o intuito de explicar os objetivos e esclarecer que os participantes eram livres para recusarem a participar do estudo.

Exames imunológicos e moleculares confirmaram as infecções em células somáticas (Hecht, 2008) e indicaram os indivíduos e os descendentes que doariam amostras de esperma para extração de DNA e amplificação de seqüências de minicírculos de KDNA e nDNA de *Trypanosoma cruzi*. O diagnóstico da infecção foi confirmado pelos resultados de dois ou mais exames positivos entre os três testes realizados (ELISA, HI e IF). As reações moleculares foram repetidas três vezes com cada par de *primers*, necessárias para confirmação do diagnóstico de cada indivíduo.

## **1.1 Amostragem**

Foram analisadas amostras de esperma de 34 voluntários. Desses, 22 foram agrupados em cinco famílias: As famílias A, B e C foram constituídas por progenitores que nasceram em áreas endêmicas, mas que se mudaram para regiões livres de triatomíneos, e aí nasceram seus descendentes. As famílias D e E são formadas por indivíduos que nasceram e continuam a residir em área endêmica. Doze amostras de esperma foram de casos isolados encaminhados ao nosso laboratório para complementação do diagnóstico clínico, e foram analisadas separadamente.

Como controles negativos, foram obtidas amostras de DNA de células germinativas de cinco indivíduos cujos pais não tinham a infecção chagásica e eram provenientes de região não-endêmica. Esses controles tinham exames sorológicos (IFI, HA e ELISA com antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi*) e marcadores moleculares negativos para o protozoário agente da doença de Chagas.

## **2. Extração do DNA**

### **2.1 Extração do DNA de células germinativas**

O DNA de células germinativas foi extraído de acordo com o método de Carter e cols (2000). Os espermatozoides foram sedimentados por centrifugação a 13000 x g e ao sedimento foi adicionado 3 ml de tampão de Extração (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.04% proteinase K, 1% DTT). A mistura era incubada durante 2 h a 55°C ou *overnight* a 37°C.

O DNA das células germinativas foi extraído pelo protocolo padrão de clorofane e clorofil de acordo com Sambrook e Russel (2001). Resumidamente, o material foi submetido a duas extrações com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1) e uma extração com igual volume de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24: 1). A separação da fase orgânica da aquosa foi feita por centrifugação a 5000g x por 15 min.

A partir desta etapa, o DNA foi precipitado em 5 v de etanol 100% gelado e incubação de 12h a -80°C. Depois desse período, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, secado e ressuspenso em 500 µL de tampão TE ( 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e RNase (200µg/mL). Após incubação de 12h a 37°C, o DNA era quantificado em espectrofotômetro e sua integridade era observada em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C.

## **2.2 Extração de DNA genômico de *T. cruzi***

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min. O sedimento foi lavado duas vezes com TBS, ressuspenso em tampão de Lise na concentração de  $5 \times 10^7$  células/ml de solução e incubado por 1 h a 37°C. Após a incubação, adicionou-se proteinase K (100 µg/ml), prosseguindo-se a incubação por mais 12 h a 37°C. A partir daí, o material era submetido a duas extrações com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1), seguida de uma extração de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção

24: 1). O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol gelado (100%) e com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, pH 4.7. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol gelado (70%), secado e, depois, ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e as alíquotas do DNA extraídos foram estocadas a 4°C.

### **2.3 Extração de KDNA**

O KDNA de *Trypanosoma cruzi*, foi extraído segundo metodologia descrita por Perez-Morga e cols (1993). Uma quantidade de  $5 \times 10^7$  formas de cultivo foram colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS, ressuspenso em tampão NET-100 (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 100 mM de EDTA pH 8.0, 100 mM de NaCl) e as células foram lisadas com SDS 10%. Posteriormente, adicionou-se proteinase k (20 µg/ml) seguido de uma incubação por 12 h a 37°C. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com ajuda de uma pipeta e acrescentado Tampão NET-100 e sacarose 20%. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15min. Depois, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta. Adicionou-se novamente tampão NET-100 e sacarose 20%, repetindo-se a centrifugação.

Então, o sedimento foi ressuspenso em 1000 µl de água destilada, seguindo-se duas extrações de clorofane e uma extração de clorofil. O kDNA foi precipitado com 2,5 v de etanol gelado (100%) e com 1/10 v de acetato de sódio 3 M, pH 8.0. O pellet foi lavado duas vezes com etanol gelado (70%),

secado e, ressuspensão em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

### **3. Eletroforese de DNA em gel de agarose**

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TAE 1X. O gel, em diferentes concentrações (0,8% e 1,0%) foi preparado em TAE 10X. As amostras e um padrão de massa molecular (1 kb Plus DNA *ladder* - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA (Azul de Bromofenol 0,25%; Xileno Cianol FF 0,25%; Glicerol 30%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 110 V) com amperagem constante.

A banda de kDNA linearizada (1,4 Kb) foi recortado do gel de agarose após a separação eletroforética e purificado através do Kit – GE Healthcare (GFX PCR DNA and Gel *Band Purification* ) conforme as recomendações do fabricante.

### **4. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)**

Com o objetivo de amplificar o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* no DNA molde extraído das células germinativas dos pacientes, foram utilizados três pares de *primers* específicos: Os pares de *primers* S35/36 e S34/67 (Sturm e cols, 1989) foram usados nas reações visando amplificação das seqüências de minicírculos de kDNA, enquanto pares de *primers* TCZ1/2 (Moser e cols, 1989) amplificam seqüências nucleares do parasita, produzindo fragmentos de seqüências de



195 nucleotídeos, e seus catâmeros. A Tabela 1 contém as seqüências de cada par de *primers*.

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

<i>Primers</i>	DNA a ser Amplificado	Seqüências
	Nuclear	Seqüências nucleares
<b>TCZ 1</b>	nDNA	5' CGA GCT CTT GCC CACACG GGTGCT 3'
<b>TCZ 2</b>	nDNA	5' CCT CCA AGCAGCGGA TAG TTC AGG 3'
	Mitocondrial (kDNA)	Seqüências de minicírculos de KDNA
<b>S 34 longo</b>	kDNA	5' TAC ACC AACCCC AATCGA ACCCCA 3'
<b>S 67 longo</b>	KDNA	5' TGG TTT TGG GAG GGG CGT TCA A 3'
<b>S 35 longo</b>	KDNA	5' AAT AAT GTA CGG GGG AGA TGCATG A 3'
<b>S 36 longo</b>	KDNA	5' TGG GGTTCG ATT GGG GTTGGT GTA 3'

As amplificações foram realizadas em triplicatas e previamente padronizadas nas seguintes condições: 200ng de DNA de células germinativas foram utilizados como molde e os reagentes do kit de PCR da Invitrogen: tampão de reação (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 9.0 e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>), 50 ng de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Foram incluídos em todas as reações os devidos controles, negativo e positivo, que consistiram, respectivamente, de DNA de indivíduo não infectado e de 250 pg de DNA de *T. cruzi* Berenice. Todas as

reações de PCR foram realizadas no termociclador *Biocycler* modelo MJ96+/MJ96G e seguiram o seguinte programa:

95°C / 5 min  
30 ciclos { 95°C / 30 seg  
          { Tm°C do *primer* / 30 seg  
          { 72°C / 30 seg  
72°C / 2 min  
4°C...

##### **5. Amplificação das regiões flanqueadoras do kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma de células germinativas**

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

Nesse estudo, nós alteramos a *TAIL-PCR* com base em dados anteriores que indicaram a ligação do kDNA a retroelementos LINE-1 (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006), e, assim, substituímos os *primers* degenerados por *primers* específicos para as seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. A metodologia, então, passou a ser chamada *psTAIL-PCR* (*primer specific Thermal Asymmetric Interlaced – PCR*). Para isso, deduzimos

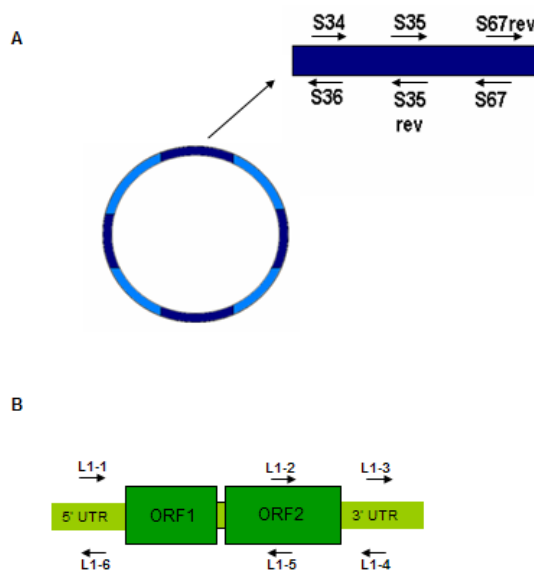
*primers* de regiões conservadas de L1 de diversos organismos (Figura 4), visando substituir os *primers* degenerados de Liu e Whittier, 1995. Assim, seguiu-se a primeira amplificação: utilizou-se 200 ng de DNA genômico em uma reação contendo 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 ng do *primer* de kDNA (S34 ou S67), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), juntamente com 10 ng de cada um dos *primers* de L1 usados neste estudo (Tabela 2).

**Tabela 2:** *Primers* utilizados nas reações de *psTAIL* PCR

<b>Primers</b>	<b>DNA a ser Amplificado</b>	<b>Seqüências</b>
	Regiões conservadas de L1 humano	Seqüências de L1
<b>L 1-1</b>		5' CTC CGG TCT ACA GTC CCC A 3'
<b>L 1-2</b>		5' CTC CCA AGA CTA AAC CAG GA 3'
<b>L 1-3</b>		5' ATC ACA CTC TGG GGA CTG TG 3'
<b>L 1-4</b>		5' CAC AGT CCC CAG AGT GTG AT 3'
<b>L 1-5</b>		5' TCC TGG TTT AGT CTT GGG AG 3'
<b>L 1-6</b>		5' TGG GAG CTG TAG ACC GGA G 3'
	Mitocondrial (KDNA)	Seqüências de minicírculos de KDNA
<b>S 34</b>	KDNA	5' ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'
<b>S 67</b>	KDNA	5'GGT TTTGGGAGGGG(G/C(G/C)(T/G)TC3'
<b>S 35</b>	KDNA	5'ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'
<b>S 36</b>	KDNA	5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'
<b>S35 ANTISENSE</b>	KDNA	5' GCA TCT CMC CCG TAC ATT AT 3'
<b>S67 ANTISENSE</b>	KDNA	5' GAM (G/C(G/C)CCCTCCCAA AAC C 3'

O programa utilizado na *psTAIL*- PCR1 foi:

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



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

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

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

Os produtos da *psTAIL*- PCR 2 foram diluídos 1:10, e 2  $\mu$ L da diluição foram utilizados como molde para a *psTAIL*- PCR 3. A reação continha 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 ng do *primer* de kDNA mais interno (S67 reverso ou S36), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen) junto com 10 ng dos mesmos *primers* de L1. O programa utilizado na *psTAIL*- PCR 3 foi o seguinte:

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

## **6. Clonagem e transformação em *E. coli* competente**

### **6.1. Ligação do inserto ao vetor**

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

### **6.2 Preparo de células competentes**

A transformação é o processo no qual DNA exógeno (plasmídeo, bacteriófago) é inserido no interior de uma célula receptora. Nos processos de transformação, uma célula pode ser tratada para receber o plasmídeo sendo assim denominada célula competente. O tratamento induz a um estado transitório de competência nas bactérias receptoras, e, durante este período, elas estão aptas a receber DNA de uma variedade de origens (Sambrook e Russel, 2001). As células competentes, usadas neste trabalho, seguiram o protocolo de cloreto de rubídio descrito no *Protocols and Application Guide* da Promega (1996). Diferentes linhagens de *E. coli* foram utilizadas durante os nossos experimentos: JM109 (Promega) e XL10-*Gold* (*Stratagene*).

### **6.3. Transformação genética de *E. coli***

Para seleção inicial dos plasmídeos recombinantes, a reação de ligação foi transformada em células de *E. coli* XL10-Gold competente. A um volume de 100 µL da célula competente foi adicionada 3 µL da reação de ligação e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Em seguida foi submetida à incubação em banho-maria a 42°C por um período de 2 minutos e 5 minutos no gelo (choque térmico). Cerca de 1 mL de meio LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 1 h a 37°C sob agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 60 segundos e o sedimento foi plaqueado em meio seletivo-ágar LB com (Ampicilina 100 µg/mL e X-gal 40 µg/mL) e incubada a 37°C por 24 horas.

### **6.4. Seleção dos clones recombinantes de *E. coli***

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

## 6.5. Extração de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial de células competentes preparadas em pequena escala de DNA plasmidial (*minipreps*), foram realizadas de acordo com a técnica de lise alcalina, descrita por Sambrook e Russel (2001).

Uma colônia bacteriana foi transferida para um tubo de 15 ml contendo 5 ml de meio LB líquido com 2,5 µl amplicilina (100 µg/mL). Após isso, a cultura foi incubada por 12 horas a 37°C sob agitação. Em seguida, de 2-3 ml da cultura crescida foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min a 4°C e o meio sobrenadante foi removido por aspiração ficando somente o pellet. O restante da cultura (150 µl de glicerol p/850 µl de cultura) foram alíquotados e armazenadas no -80°C.

Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em solução I (Buffer P1) e agitado vigorosamente no vortex. Logo após, foi adicionado solução II (Buffer P2) e homogeneizado por inversão de 4-6 vezes deixando em repouso por 5 min. Foi acrescentado a solução III (Buffer N3) homogeneizado novamente por inversão de 4-6 vezes deixando em repouso por 3 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4°C.

Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo uma coluna de purificação e o sedimento descartado. Então, foi adicionada a solução de lavagem (tampão PB) seguido de uma rápida centrifugação e desprezado o que passou pela coluna. Logo após, foi adicionado o tampão PE, seguido por breve centrifugação e desprezado novamente o que passou pela coluna. Em seguida, a coluna de purificação foi transferida para um tubo cônico de 1.5 ml e descartado o tubo contendo o material que foi passado pela coluna. Posteriormente, adicionamos o tampão



EB, esperamos por 1 min a temperatura ambiente e centrifugamos a 14.000 rpm por 1 min a 4°C.

## **7. Southern Blot dos produtos de PCR**

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

## **8. Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon**

Os clones de bactérias transformantes obtidos durante a clonagem foram repicados para uma membrana de nylon em contato com meio LB sólido contendo (100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/ml X-gal). Após incubação a 37°C por 12 h, as membranas passaram por um processo de tratamento realizada da seguinte forma: embebidas em papel de filtro contendo solução de lise (SDS 10%) por 10min, seguida de solução de desnaturação (0,4 M NaOH) por 10min, e, por último, SSC 2X por 10 min. As membranas foram secas em estufas a 37°C para a fixação do DNA.

## 9. Ensaio de hibridização

### 9.1. Marcação de sondas radioativas

DNA mitocondrial de *T. cruzi* ou fragmentos de DNA resultantes da amplificação do DNA desse parasito com diferentes *primers* foram marcados radioativamente, utilizando-se o kit *Random Primer Labelling System* (Invitrogen). Essa técnica consiste em inserir um dATP radiomarcado [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] na seqüência da fita de DNA molde, sintetizada pela enzima *Klenow* (atividade polimerásica) na presença de *primers* randômicos (hexaméricos) que se ligam aleatoriamente na seqüência desejada iniciando a reação de polimerização (Sambrook e Russel, 2001). A reação foi realizada conforme instruções do fabricante: 30 ng de DNA (em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ ) foram desnaturados a 100°C por 10 min e depois colocados no gelo. Foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de dCTP, 2  $\mu\text{L}$  de dGTP e 2  $\mu\text{L}$  de dTTP; 15  $\mu\text{L}$  de tampão, 3  $\mu\text{L}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dATP (3000  $\mu\text{Ci}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de *Klenow*. Após um período de incubação de 3 h a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 5  $\mu\text{L}$  do tampão de parada.

### 9.2. Purificação de sondas radioativas

As sondas radiomarcadas eram purificadas em coluna *Sephadex G-50* e lâ de vidro (Sambrook e cols, 1989). A incorporação radioativa foi confirmada através de cintilografia. As sondas foram usadas dentro dos limites de concentração de 1 a  $2 \times 10^6$  cpm/ml de solução de hibridização e as atividades específicas foram iguais ou maiores que  $10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  de DNA.

### **9.3. Pré-hibridação e hibridação**

As membranas foram bloqueadas com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão) por 4 horas e após esse tempo, as sondas radiomarcadas (aproximadamente 75 ng/µL) previamente desnaturadas (aquecimento a 100°C, por 5 minutos e resfriada imediatamente em gelo) foram adicionadas por mais 12 h a 65°C.

Após 12 horas, as membranas foram lavadas duas vezes em SSC-2X/0.1% SDS, a 65°C, por 15 min, seguidas de uma lavagem em SSC-0.1X/0.1% SDS, a 65°C, por 15 min. Em seguida as membranas foram revestidas em filme plástico de PVC em um cassete e expostas a filmes de raios-X (KODAK T-MAT) por no mínimo 4 horas a -80°C.

## **10. Seqüenciamento dos clones e análise em banco de dados**

O DNA extraído dos clones selecionados foi enviado para o seqüenciamento automático comercial (*Genomic*, SP), o qual utilizou os *primers* T7 e Sp6 para a amplificação das seqüências. Para a análise dos insertos em banco de dados, utilizou-se o algoritmo BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## IV. Resultados

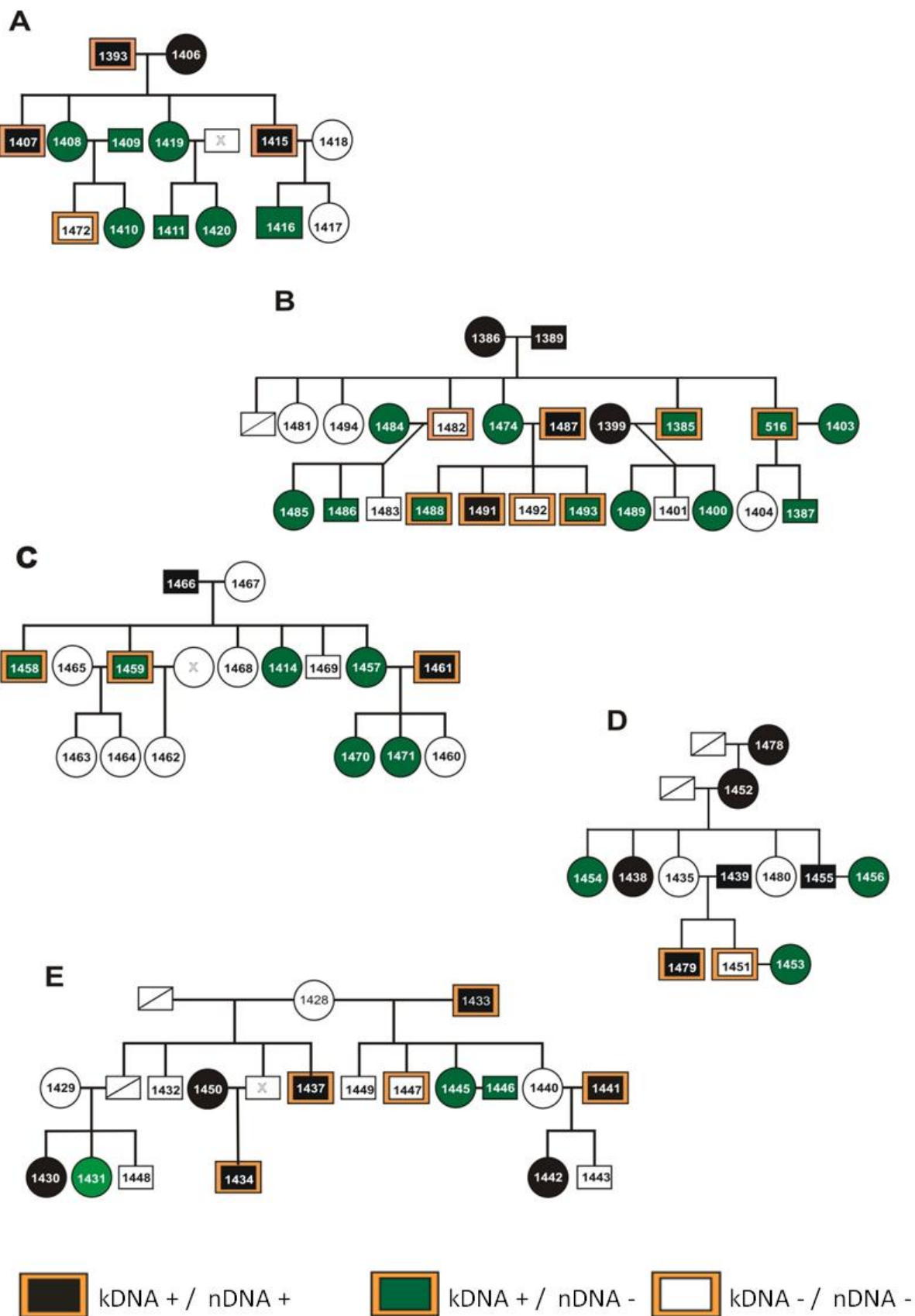
### 1. Estudo das Famílias

Para uma melhor compreensão da possibilidade da transferência vertical do DNA mitocondrial do protozoário, nós fizemos uma árvore filogenética para as cinco grandes famílias (Figura 5) do estudo. A figura 5 inclui resultados da transferência lateral do kDNA para as células somáticas (Hecht, 2008) do sangue dos membros dessas famílias. Em cada caso, os resultados obtidos neste estudo com as células germinativas de 22 indivíduos dessas cinco famílias são consistentes com aqueles das células somáticas.

A família A, mostra progenitores chagásicos que residiam em casas infestadas com barbeiros no interior de Minas Gerais. O indivíduo 1393 tem resultados moleculares e imunológicos que confirmam a Doença. Os resultados de PCRs também foram positivos nos quatro filhos deste casal. Entretanto, os dois filhos (1407 e 1415) tiveram resultados positivos no esperma, para o nDNA, sugerindo a presença de infecção ativa ainda que os exames sorológicos fossem negativos.

A família B é composta por 24 indivíduos, cujos progenitores têm a infecção chagásica ativa. Dos quatro filhos homens deste casal, um faleceu de problemas cardíacos aos 32 anos e das três amostras de esperma obtidas, dois (516 e 1385) apresentaram PCRs positivas, cujos DNA molde amplificaram o kDNA mitocondrial. De grande importância, os cônjuges da geração F<sub>1</sub> são oriundos de zonas rurais, o que pode explicar o fato de apresentarem PCRs positivas para kDNA e dois deles serem portadores de infecções pelo *T. cruzi*. Dos quatro filhos de um dos cônjuges da geração F<sub>1</sub>;

dois tiveram positividade para o kDNA, um teve o kDNA e o nDNA positivos, e apenas um foi negativo.



**Figura 5:** Árvore filogenética mostrando as cinco famílias com a distribuição das mutações de kDNA do *Trypanosoma cruzi* sugeridas por PCR e confirmadas pelo seqüenciamento dos clones de DNA quimera. Em círculos ou quadrados pretos estão indicados os indivíduos portadores da infecção ativa e que têm as mutações de kDNA no genoma. Em verde estão indicados os indivíduos que têm apenas as mutações de kDNA na ausência da infecção ativa. Esses últimos tiveram as mutações herdadas dos progenitores chagásicos. Os círculos e quadrados em branco não tiveram infecção ou mutação identificadas. Os dados que compuseram esta figura são oriundos de células somáticas (Hecht, 2008) e do nosso estudo com células germinativas.

A peculiaridade da família C é que apenas o progenitor é realmente chagásico, diagnosticado pelos testes imunológicos e marcadores genéticos da infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, dos três filhos homens do casal, dois (1458 e 1459) tiveram o esperma analisado e apresentaram reações de PCR positivas apenas para kDNA.

Na família D, todos os indivíduos nasceram em meio rural e disseram notar a existência de barbeiros em suas casas. Nessa família, verificamos a infecção chagásica ativa (sugerida pela positividade da PCR de nDNA) em todas as gerações. Entretanto, das duas amostras de esperma que obtivemos da progênie F<sub>3</sub>, somente o indivíduo 1479 aos 32 anos de idade, teve PCRs positivas com nDNA e kDNA, e os testes imunológicos também foram positivos.

A família E inclui 18 pessoas que nasceram e residem em área endêmica. Os resultados de PCRs foram positivos em um progenitor e nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Entretanto, das três amostras de esperma que obtivemos na F<sub>1</sub>, dois deles (1437 e 1441) apresentaram PCRs positivas para nDNA e kDNA. Curiosamente, apenas o paciente 1441 teve a infecção chagásica ativa confirmada pelos testes imunológicos. Na geração F<sub>2</sub>, novamente um doador de esperma (1434) teve a infecção chagásica confirmada somente pelos

testes com kDNA e nDNA. Nessa família, os chagásicos doadores de esperma tinham entre 61 anos (1433) e 23 anos de idade (1434). Isto sugere que a transmissão vetorial do *T. cruzi* está ativa, naquela região do Município de Bonfinópolis, Estado de Minas Gerais.

## **2. Amplificação de seqüências de kDNA e DNA nuclear de *Trypanosoma cruzi* em esperma de indivíduos chagásicos e descendentes**

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas visando identificar a presença de DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (kDNA) nas amostras estudadas. As amplificações foram realizadas em triplicata com cada par de *primers*. Esses exames confirmam os resultados de PCR com *primers* de nDNA e kDNA mostrados na Figura 5, à medida que mostram os *loci* de integração das mutações no genoma humano.

Utilizando os *primers* TCZ1/2, nós observamos a presença de bandas específicas em 11 indivíduos de um total de 22 amostras das cinco famílias. Desses, cinco indivíduos chagásicos apresentam anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi*. Os seis indivíduos restantes não apresentam sorologia positiva, porém, os resultados obtidos no diagnóstico por PCR corroboram os dados obtidos nas amostras de sangue desses mesmos indivíduos (Hecht, 2008).

Para detectar a presença do kDNA, nós utilizamos dois pares de *primers*, S34/67 e S35/36. Com os *primers* S34/67 foram observadas bandas específicas em 17 indivíduos, sendo que em 10 casos, também identificamos bandas específicas usando os *primers* S35/36. Apenas sete indivíduos foram positivos somente para os *primers* S34/S67.

As 12 amostras de espermas obtidas de indivíduos fora daquelas cinco famílias tiveram resultados de PCR com *primers* amplificadores de nDNA e kDNA em seis casos. Entretanto, quatro deles tinham anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi* e os outros dois tinham exames imunológicos negativos. Um indivíduo apresentou somente as PCRs de kDNA positivas com os dois pares de *primers*. Isso sugere que as mutações de kDNA não se restringem àquelas cinco famílias, pois, elas são prontamente identificáveis em pessoas que buscaram esclarecimento para o diagnóstico de doença de Chagas no nosso laboratório.

O resultado das ampliações feitas com *primers* de kDNA e nDNA de *T. cruzi* das amostras estão sumarizados na tabela abaixo.

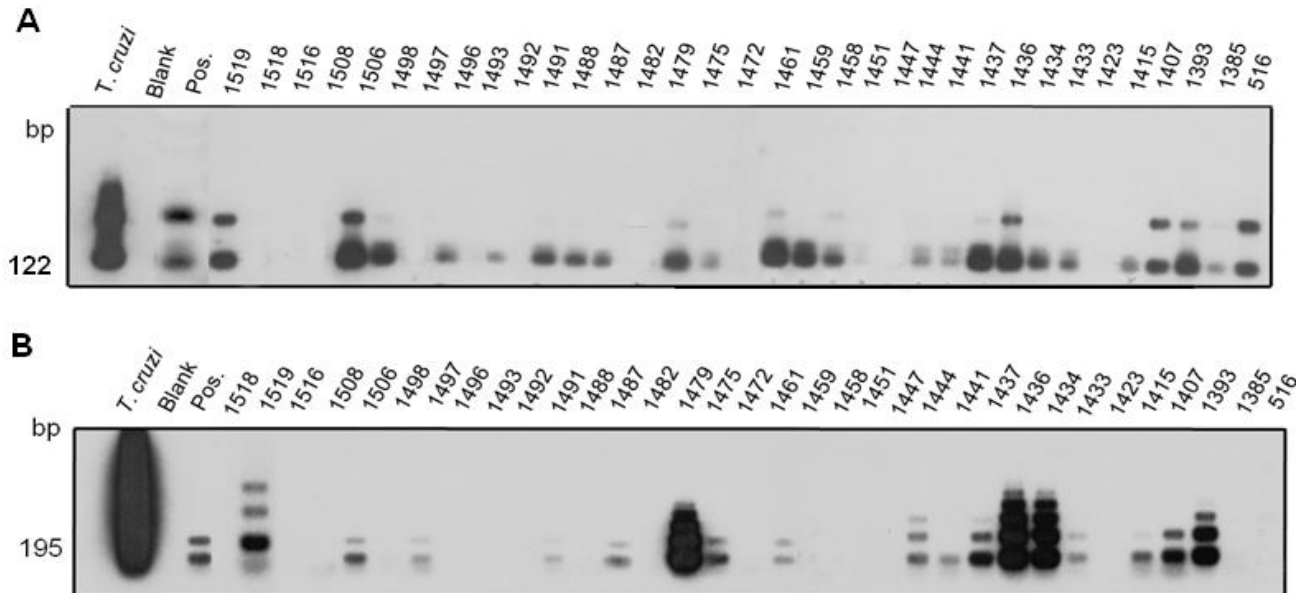
<b>TCZ1/2</b>	<b>S34/S67</b>	<b>S35/S36</b>
17/34	24/34	16/34

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

Foi observado em apenas seis amostras a presença dos marcadores moleculares para o kDNA de *T. cruzi*. É importante ressaltar que em todos esses casos os parentais são chagásicos. Esse dado sugere a possibilidade de transferência vertical do DNA mitocondrial do protozoário, pois a amplificação com nDNA não foi obtida.



A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada por hibridização com as sondas radiomarcadas (materiais e métodos). Os resultados obtidos após as hibridizações dos produtos de PCR estão representados na figura 6.



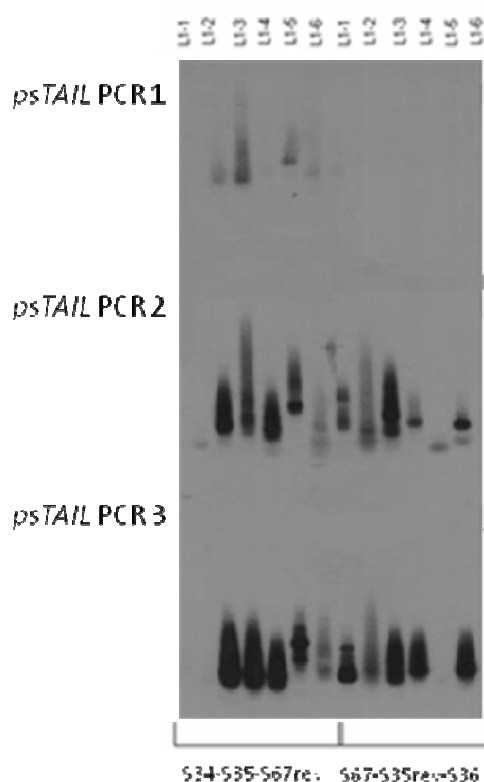
**Figura 6.** Southern Blot de produtos de nDNA e kDNA amplificados por PCR e hibridizados com sondas específicas. A) S34/S67 e B) TCZ1/2. Ordem: *T.cruzi*, Branco, Pos (controle positivo) e amostras dos indivíduos.

### 3. Obtenção de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas

A identificação das seqüências de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma das células germinativas foi feita mediante a utilização de *psTAIL*-PCR (materiais e métodos).

As amostras selecionadas para a *psTAIL*-PCR foram de indivíduos chagásicos e seus descendentes que formam cinco famílias independentes. A análise da integração do kDNA nas células somáticas de membros dessas famílias, foram publicadas na Tese de Doutorado de Mariana Hecht, Universidade de Brasília, 2008.

Dessa forma, 17 amostras de indivíduos das famílias A, B, C, D e E, que apresentavam PCR positiva com os *primers* de kDNA, foram submetidas a *psTAIL*-PCR. Os produtos de amplificação foram hibridizados e aqueles que eram reconhecidos pela sonda de kDNA foram ligados em vetor pGEM *T-Easy*. A figura 7 mostra a hibridização das três *psTAIL*-PCR utilizando a sonda específica de kDNA de *T. cruzi* marcada radioativamente.



**Figura 7:** Hibridização da *psTAIL*- PCR

Após a ligação dos produtos da *ps-TAIL*- PCR 3, os transformantes foram selecionados por hibridização de colônias com a sonda de kDNA. Em seguida, foi feita a análise dos clones e aqueles que continham insertos com pesos moleculares diferentes foram selecionados para o seqüenciamento.

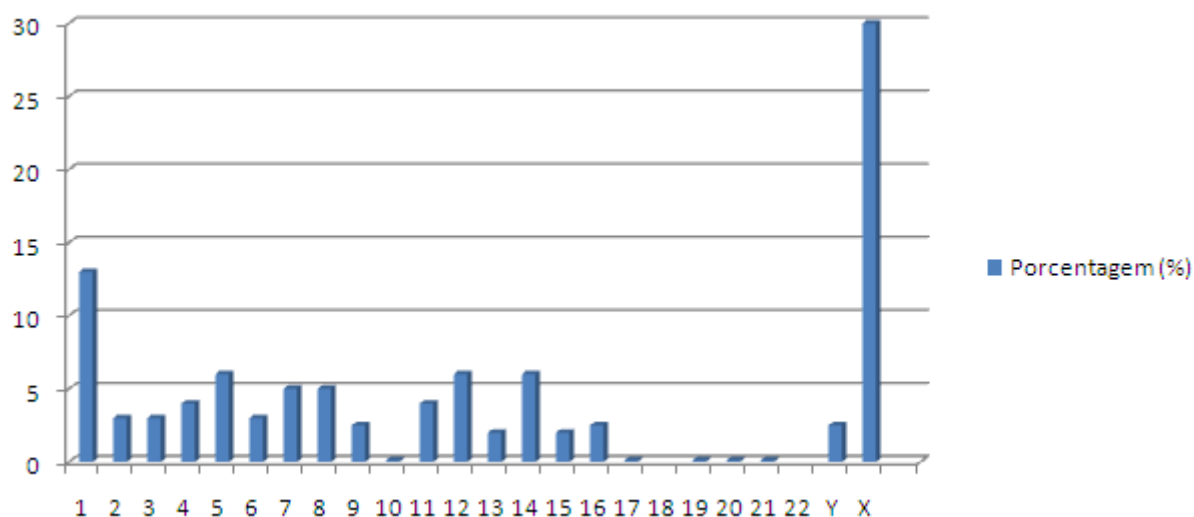
#### 4. Análise das seqüências obtidas mediante *psTAIL*- PCR

Foi enviado para seqüenciamento automático um total de 266 clones, dos quais 22,9% não apresentaram uma qualidade satisfatória na reação de seqüenciamento, 5,3% apresentaram apenas o vetor, 7,1% continham apenas DNA humano e 12,4% clones tinham apenas o kDNA de *T. cruzi*. Felizmente, nós obtivemos um total de 52,3% clones contendo seqüências de kDNA flanqueadas por DNA humano. Esses dados são similares aos resultados já obtidos no LMPDC (Hecht, 2008). O alinhamento das seqüências contendo região flanqueadora permitiu verificar que muitas já estavam contidas em outros clones. Com o resultado desse pareamento, os 139 clones foram reduzidos a 106, os quais tinham origem em 17 indivíduos.

Os clones analisados apresentavam insertos que variavam de 1464 a 173 pb, sendo que a média de tamanho das seqüências foi de  $704 \pm 320$ . As regiões contendo kDNA apresentavam em média  $329 \pm 178$  pb e as seqüências contendo a região flanqueadora humana apresentou média de  $398 \pm 276$ .

As análises dessas seqüências usando o algoritmo BLASTn revelaram identidades e *E-value* com valores altamente significativos, tanto para as regiões de kDNA, quanto para as seqüências provenientes do DNA humano. Dessa maneira, foi possível identificar os *loci* preferenciais de inserção do kDNA no genoma das células germinativas (AnexoII).

A análise revelou ainda, que a integração do kDNA ocorreu na maioria dos cromossomos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, Y e X. A figura 8 ilustra a freqüência das integrações do kDNA nos diversos cromossomos.



**Figura 8:** Freqüência de integração do kDNA de *Trypanosoma cruzi* nos cromossomos de células germinativas humanas.


A presença de regiões flanqueadoras longas permitiu um *E-value* bastante significativo, onde foi possível obter escores 0.0 (zero, ou homologia completa) em 26 dos 106 clones (24,5%). Como exemplo, podemos citar o clone 70E proveniente do indivíduo 1407, onde a seqüência do kDNA de *T.cruzi* está ligada ao cromossomo 12 humano. Destacamos a presença de uma região de justaposição entre a seqüência de kDNA e o DNA humano. Esta seqüência de justaposição foi freqüentemente observada em todos os casos analisados, apresentando um tamanho que variou de 4 a 34 bases.

A

```
1      GAACGCCCTT CCAAAAACCG AATTTTCGGG AAATTCCTATA CCCACTCCAA CCACACTCTA
61     ACCCACAACC TATCCTCAAA CACAAATAAA GTAACATAAC AACTCATATA ATTCGACGAT
121    ACACAGAACA TAATTCAACA TCCTCTATCT CACACAACCT ATACTCAATC ACATGCAATA
181    ACATACACCT CCAACTATAC AACATTCAAA CTAAAATGAT AATCTGAATA TATCGGTTAC
241    CAAAGCACTA CCACCAGTCT CTATATTACA CCAACCCCAA TCGAACCACA GCACAATTA
301    AAATATATTC AAGACTCAGA ACATCACTCA AAACCACACA ATTAAATGGA AATCAATCAA
361    CTTGCCCTTG AATGGCATTG GGGTAAATAA TAAAATTAAG GCAGAAATCA AGAAGTCTTT
421    TGAAACTAAT GAGAACAAAG ATACAACATA CTGGAATCTT TGGGACACAT CTAAAGCAGT
481    GTTAAGAGGG AAATTTATAG CACTAACAC TCACATCAAA AAGCTAGAAA GATCTCATTA
541    ACAACCTAAC ATCACAACCT AAAGAAGTAG AGAAGCAAGG GAAAACCAAC CCCAAAGCAA
601    GCAGAAAGACA ATAAATAACC AAAATCAGAT TTGAACTGAA AGAGATTGAG ACATAAAAAA
661    AAAATTTCAA AAGATTAATG AAAGTAGGAG CTGGCTTTTT GAAAAAAAT AATAAGATAG
721    ATAGGCCACT AGCTAGACTA ATAAAGAATA AAAGAGAGAA GATTCGAATA AACACAACCTA
781    GAAATGACAA AGGGAATATT ACCACTGACC CCACAGAAAT ACAAATAGCC TTCAGAAAGT
841    ACTATGAATA CCTATACCCA CAATAACTAG AAAATCTAGA AGAAATGGAT AAATTTCTGG
901    ACACCTATAC CCTCCAAGA CAAACCAGGA
```

B

[emb|AJ747989.1|](#) Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Mas c11, isolate awmp248 Length=343  
Score = 62.6 bits (68), Expect = 9e-07  
Identities = 42/47 (89%), Gaps = 0/47 (0%)

[gb|AC125629.1|](#)  Homo sapiens 12 BAC RP11-359K6 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence Length=139793  
Score = 1130 bits (1252), Expect = 0.0  
Identities = 654/669 (97%), Gaps = 4/669 (0%)

**Figura 9:** Integração do kDNA de *T. cruzi* no cromossomo 12. A) clone 70E do paciente 1407 ilustrando a inserção do kDNA (azul) no DNA humano (verde). Os *primers* utilizados na terceira *psTAIL*-PCR encontram-se sublinhados. Em amarelo está representada a região de justaposição. B) Resultados obtidos após análise utilizando o algoritmo BLASTn.

Interessantemente, O cromossomo X mostrou ser o sítio preferencial de integração (30%), sendo que em 89% dos casos, a inserção do kDNA ocorreu no *locus* AL732374.14. Esses dados são muito semelhantes aos resultados encontrados por Hecht nos estudos feitos com células somáticas desses indivíduos. A figura 10 está exemplificado um clone apresentando uma seqüência de kDNA de *T. cruzi* ligada ao DNA humano no *locus* AL732374.14 do cromossomo X. Este clone é proveniente do indivíduo chagásico 1461 pertencente à família C.

## A

```
1      GAAGGCCCCCT CCCAAAACCA CAGGTTCCGT ATTTTTCAGA CACAACTTTT GACAACATAA
61     CCACTATACA TACCTCTCCC ACCAACTCAC CACCATACTA TCCAACACCT ATACAATATA
121    AGTAACCGTA TAATATACAT AATGAACATA ATATAATCAT CACTCACTCA ATACTACTAA
181    ACTTCCTCCT CGTTATTAAA GTATATCACA TAATCTAATA CTCTATACTC TACATTCTAA
241    ATCACACGTA TATATATTAC ACCAACCCCA ATCGAACCAA CATCAAAGAA TACTATAAAC
301    ACCTCTACAT AAATAAACTA AAAAACTAG AAGAAATGGA TACATTCCTG GTTTAGTCTT
361    GGGAGGGTGT ATGTGTATCA GAGCCTGTTA TTGGTCTATT CAGAGACTCA ACTTCCTCCT
421    GGTTCGGTTT TGGGAGGG
```

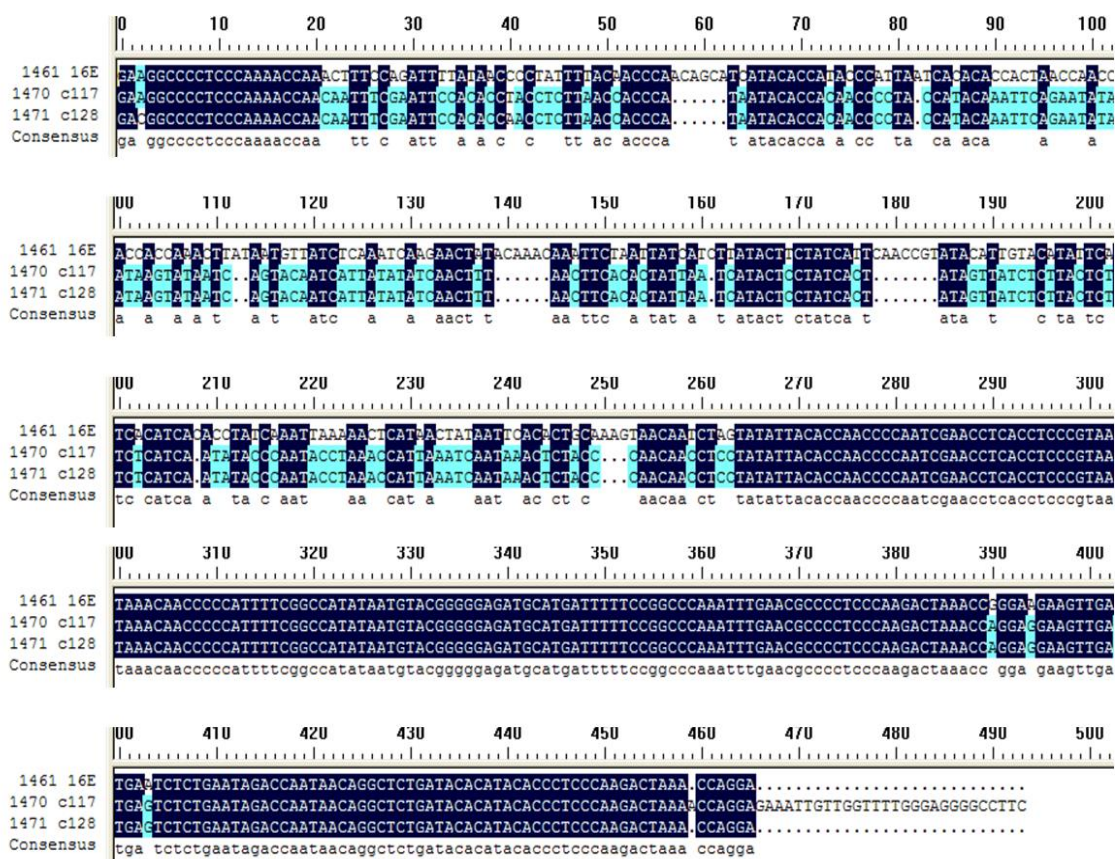
## B

[emb|AJ748067.1|](#) Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIe, strain X154/7, isolate JP707 Length=322  
Score = 497 bits (550), Expect = 2e-137  
Identities = 277/278 (99%), Gaps = 0/278 (0%)

[emb|AL732374.14|](#) **D** Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X Contains a mitochondrial ribosomal protein S18C (MRPS18C) pseudogene, the 3' end of the PHF8 gene for PHD finger protein 8 and a CpG island, complete sequence Length=224187  
Score = 143 bits (158), Expect = 5e-31  
Identities = 88/94 (93%), Gaps = 0/94 (0%)

**Figura 10:** Sítio preferencial de integração do kDNA no cromossomo X. A) clone 13E do paciente 1461 ilustrando a entrada do kDNA (azul) no *locus* AL732374.14 (verde). Os *primers* utilizados na terceira *psTAIL* PCR encontram-se sublinhados. Em amarelo está representada a região de justaposição. B) Resultados obtidos após análise utilizando o algoritmo BLASTn.

O alinhamento de seqüências do indivíduo 1461 (clone 16E) com seqüências obtidas por Mariana Hecht no estudo das células somáticas das filhas 1470 (clone 117) e 1471 (clone 128), demonstrou a presença do mesmo sítio de integração no *locus* AL732374.14 do cromossomo X nesses indivíduos. Este achado reforça a hipótese de transferência vertical das mutações.



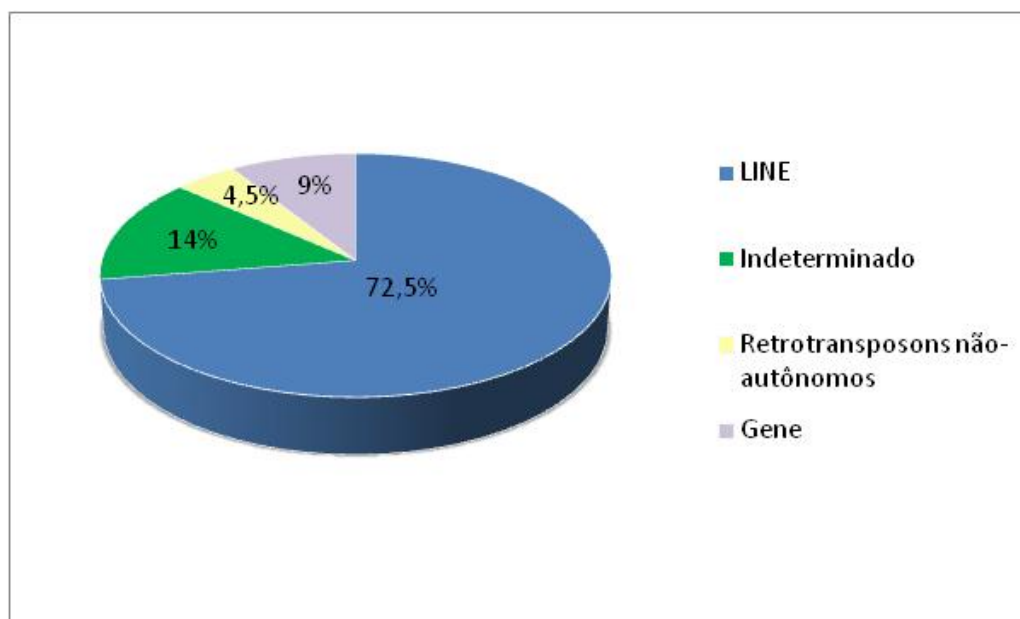
**Figura 11:** Alinhamento dos Clones 16E, 117 e 128. A seqüência de kDNA compreende as bases de 1-385 e a região flanqueadora inicia-se nas bases 373 a 470. Estas seqüências apresentam uma identidade de 81,85% (programa DNAMAN).

## 5. Características das regiões flanqueadoras do genoma humano

A análise da distribuição dos eventos de integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma humano mostrou que o kDNA se inseriu em diversos cromossomos, preferencialmente em elementos retrotransponíveis do tipo LINE, em 72,5% dos clones seqüenciados (Figura 12). Verificamos também que seqüências de minicírculos de kDNA ligaram-se a outros elementos transponíveis como *Alu* ERV e MER.

Nós observamos que 9% dos eventos de integração do kDNA ocorreu em regiões codificadoras. Em quatro clones (113E, 167E, 170E, 12E), oriundas das famílias B e C, o kDNA foi visto associado ao gene de receptor

olfatório OR1-17. Também pudemos observar a inserção do kDNA próxima ao gene da mucina (103E, 105E, 164E); do receptor da IL-1 (91E), da POLR1D- *gene for RNA polymerase I* (565E), TXLNB- *taxilin beta* (124E), ADPRT- *gene for ADP-ribosyltransferase* (24E), CYP24A1- *cytochrome* (211E) e no pseudogene MTCO3 (240E). Em 18 dos 106 clones (14%), o *locus* onde o kDNA integrou não pôde ser caracterizado, devido à ausência de informação sobre a região em bancos de dados. Não obstante, esses *loci* apresentavam *E-value* e identidades significativas com cromossomos humanos. Esses casos aparecem com *locus* indeterminado na tabela do ANEXO II.



**Figura 12:** Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de células germinativas.



Novamente, destacamos a ocorrência de integração de minicírculo de kDNA em *loci* idênticos (BK004196.1) quando comparamos as seqüências obtidas das células germinativas do indivíduo 1461 (clone 12E) com as obtidas das células somáticas de sua filha, caso 1471 (clone 126). Interessantemente, o ponto de entrada do kDNA é o mesmo em ambos os casos: base 9 do gene de receptor olfatório OR1-17.

A


**Clone 12E - 1461**

GAACGCCCT CCCAAAACCA AATTTCCGCA ATTTCTTAAC CTCCGAATCC ACCTCAAAC  
GTACCCACCA CTACCACAAT ATAATAATTC TATATAACAA TCAATATATA ACAAACAATA  
ACTCTCACAA TTTTTCTCAC GTCATTTCTT TCACATGTAC ATATCCCACA CATCACATAT  
CCAAATCCAT ACAATACATA CCAATCAAAC TATCAATACA CATTCTATAT TTCATCTTAT  
CAGTATCCAT TCTAACAAGC CATATATTAC ACCAACCCCA ATCGAACCAC CATTCAGGAG  
TTTTATCTTCT CCGCTTTCC TTATTCCTGG TTTAGTCTTG GGAG

**Clone 126 - 1471**

GAAGGCCCT CCCAAAACCA AACTTTCCGG AATTTTAGGG TACCAACTTT CAGCTAAACA  
CCATTATCAC CCAGATAACA CCAACCCAC ACCACCAATA TCAAGCTATA ACACCTTATA  
ATAGTAATTA CAGTCTAACA TAGCTTTAAC ATAATAAAT CACTTCTATC CTCTGTTTAC  
CACTATTATT CTACTGTATC ATATCACACA ATACCACAAA GACAATTCAA TAAAAATAAA  
AAACTAAACA ACCTCCCCCT TATTTAAACC AACCCCAATC GAACCACCAT TCAGGAGTTT  
ATCTTCTCCG CTTTCCCTTA TTCTGGTTT AGTCTTGGGA G

B

[tpg|BK004196.1](http://tpg|BK004196.1)  TPA\_inf: Homo sapiens olfactory receptor OR1-17 gene,  
Score = 104 bits (114), Expect = 4e-20,  
Identities = 62/64(96%), Gaps = 1/64(1%)

**Figura 13:** Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no gene de receptor olfatório OR1-17. A) Semelhança entre seqüências obtidas de células germinativas e células somáticas de pai e filha, respectivamente. B) Resultado obtidos após análise utilizando o algoritmo BLASTn. Os valores correspondem a ambas as seqüências.

Outro achado importante foi o fato de termos encontrado em 22 dos 106 clones (20,7%) a presença de dois sítios diferentes de integração. Em um caso, 1393 clone 79E, a análise do clone mostrou a presença de DNA humano proveniente de quatro cromossomos diferentes. Esses achados revelam a possibilidade de rearranjo das seqüências após a integração do kDNA. Seqüências semelhantes também foram vistas nas células somáticas.

Contudo, as células germinativas apresentaram um número maior de rearranjos quando comparadas às encontradas nas células somáticas dos mesmos indivíduos. A maioria desses rearranjos envolveu a presença de LINE-1 em ambos os sítios de integração. Um exemplo deste tipo de integração está ilustrado na figura 14.

## A

### Clone 119E: 1564 bp

```

1      GAAGGCCCTT CCAAAAACCA ATATTTTCAG AATTTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAC CAAATATATA AACGTGTAATA TAACTCTAAT
121    TATACAAACT TAAACCACCT ACCAACTGT  AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAGCAT ACTCAATAAG TTATATCACC AATATTCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAATCGA ACCAAATATA CATTFFFFFFC AGCACCACAC CACACCTATT
301    CCAAAATTGA CCACATACTT GGAAGTAAAG CTCTCCTCAG CAAATGTAAA AGAACAGAAA
361    TTATAACAAA CTATCTCTTA GACCACAGTG CAATCAAACC AGAACTCAGG ATTAAGAATC
421    TCACTCAAAA CCGCTCAACT ACATGGAAAC TGAACAACCT GTTCCTGGAT GACTACTGGG
481    TACATAACGA AATGAAGGCA GAAATAAACA TGTTCTTTGA AACCAATGAG AACAAAGACA
541    CAACATACCA GAATCTCTGG GATGCATTCA AAGCAGTGTG TAGAGGGAAA TTTATAGCAC
601    TAAATGCCCA CAGAGAAGCA GGAAAGATCC AAAGTGACAC CCTACATCAC ATTAAGGAGC
661    TAGATAGCAA GAGCAAACAC ATTCAGAGCT AGCAGAAGGC AGAAATAC TA ATTCGAGCAG
721    ACCTGAGGAA ATAGGAGACC ACAAAAAACC CTTTCAAAAA TTAATGAATC CAGGAGCTGG
781    TTTTTTGAAG GGATCAACAA AATTGATAGA CCGCTAGCAA CACTAATAAA GAAAAAAGA
841    GAGAAGAATC AAATAGATGC AATAAAAAAT GATAAAGGAG ATATCACCAC TGATCCCACA
901    GAAATACAAA CTACCATCAG AGAATACTAC AAACACCTCT ACGCAAATAA ACTAGAAAAT
961    CTAGAAGAAA TGGATAAAT TCTGGACACA TACACTCTTC CCAGGCTAAA CCAGAAGGAG
1021   TTGAGTCTCT GATTAGACCA ATAACAGGCT CTGATCACAT ACACCAACCC CAATCGAACC
1081   TTCCCTTCCG TTAACAATCC CCATTTTCGG CCATATAAT GTACGGGGGA GATGCATTTT
1141   TGGGCCCAA TTTTGAACCC CCCTCCAAG ATCGCAAAAA AAAGGAAGGG GGGTTTTTTTT
1201   TAAAAACCGA AAACGGGTTT TGATAACACA TACACCCTCC CAGGATTAAC CAGGAAGAAG
1261   TTGATTTTTT GAATAGACCA ATACCAGGTT TTGATCCCAT CCACCCTCCC AAGACTAAAC
1321   CAGGAAGAAG TTGAGTTTTT GAATAGACCA ATAACAGGCT TTGGTACACA TACACCAACC
1381   CCAATCGAAC CTCACCTCCC GTAAACAATC CCCATTTTCG GCCATATAAT GTACGGGGGA
1441   GATGCATGAT TTTTTGGGCC CAAATTTGAA CGCCCCTCCC AAGAAACCAG GAAGAAGTTG
1501   AGTCTCTGAA TAAGACCAAT AACAGGCTCT GATACACATA CACCTCCCA AGACTAAACC
1561   AGGA

```

## B

[gb|AC015528.14|](#) **D** Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-179A23, complete sequence Length=155518

Score = 1238 bits (1372), Expect = 0.0

Identities = 780/822 (94%), Gaps = 18/822 (2%)

[gb|M19188.1|TRBKPMCO](#) T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4

Length=165

Score = 185 bits (204), Expect = 2e-43

Identities = 108/112 (96%), Gaps = 0/112 (0%)

[emb|AL732374.14|](#) **D** Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X Contains a mitochondrial ribosomal protein S18C (MRPS18C) pseudogene, the 3' end of the PHF8 gene for PHD finger protein 8 and a CpG island, complete sequence

Length=224187

Score = 132 bits (146), Expect = 1e-28

Identities = 87/94 (92%), Gaps = 4/94 (4%)

**Figura 14:** Presença de rearranjo nos sítios de integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma humano. A) clone 119E do paciente 516 mostrando a inserção do kDNA em dois *Loci* diferentes, AC015528.14 e AL732374.14, nos cromossomos 8 e X, respectivamente . Destacamos a presença de repetições diretas (sublinhadas) nos locais de inserção do LINE-1. Em amarelo está representada a região de justaposição. B) Resultados obtidos após análise utilizando o algoritmo BLASTn.

## **V. Discussão**

### **1. Aspectos gerais**

Este é um trabalho original que mostra pela primeira vez a possibilidade de herança vertical de um DNA exógeno proveniente de uma espécie situada no reino animal muito distante do *Homo sapiens*. Em trabalho prévio, Mariana Hecht (Tese, Universidade de Brasília, 2008) documentou a transferência horizontal de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* em sítios específicos de quase todos cromossomos de células somáticas, em todos pacientes portadores da doença de Chagas que foram examinados. Aqui nós mostramos, que seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas podem ser herdadas pela progênie. De fato, os adultos masculinos que se dispuseram a colaborar com o estudo apresentaram as mutações de kDNA em sítios específicos do genoma haplóide. Este estudo possibilita uma melhor compreensão das forças evolutivas que atuam no sentido de aumentar a diversidade genética da população humana.

### **2. Detecção de material genético do *Trypanosoma cruzi* em células germinativas humanas**

A utilização da técnica de PCR, com a ajuda de marcadores genéticos específicos, permitiu a identificação de DNA do parasito em todas as amostras de esperma de indivíduos chagásicos.

Verificamos também, que há uma discrepância entre os resultados obtidos com as técnicas imunológicas (Hecht, 2008), comparadas com as

técnicas de biologia molecular, haja vista que os testes imunológicos identificadores de anticorpos específicos contra antígenos do protozoário foram positivos apenas nos indivíduos portadores de infecções ativas de *T. cruzi*. Ainda que alguns indivíduos tivessem os testes imunológicos negativos, a presença da infecção ativa, em células germinativas, nesses pacientes foi sugerida pela positividade do testes de PCR com *primers* iniciadores de nDNA, seguidos de hibridização com a sonda de TCZ. O real significado das discrepâncias observadas entre resultados de testes imunológicos e genéticos não foi o foco principal do nosso estudo, podendo ser mais esclarecido em outros trabalhos de interesse clínico-epidemiológico.

Os *primers* utilizados que amplificam seqüências de kDNA de *T. cruzi* foram os mais sensíveis. Sabe-se que existem cerca de 10.000 minicírculos de kDNA em cada parasito (aproximadamente 10% a 15% do seu DNA total), e que as seqüências repetitivas de DNA nuclear amplificadas pelos *primers* TcZ1/2 correspondem aproximadamente a 9% do genoma total do *T. cruzi*.

A possibilidade de transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma dos progenitores chagásicos (geração F<sub>0</sub>) e a herança pela a progênie F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> pôde ser demonstrada nas famílias A, B e C. As famílias D e E, provenientes de regiões endêmicas, apresentaram indivíduos infectados pelo *T. cruzi* em todas as gerações, não podendo diferenciar as mutações herdadas das adquiridas pela infecção ativa. Contudo, neste estudo, aspectos moleculares da transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA, indicam que houve herança dependente das células germinativas.

### **3. Identificação dos sítios de inserção do kDNA no genoma de células germinativas**

A técnica de *psTAIL*- PCR, foi capaz de amplificar seqüências desconhecidas que flanqueavam o kDNA de *T. cruzi* no genoma de chagásicos e seus descendentes. Em nosso estudo, a *psTAIL*- PCR mostrou uma eficiência de 52,3%, resultado similar ao encontrado por Mariana Hecht.

Nós observamos que a integração do kDNA ocorreu na maioria dos cromossomos, predominantemente (72,5 % dos casos) em elementos LINE, o que pode ser prontamente explicada pela ampla distribuição desses elementos retrotransponíveis em todo o genoma humano (Song & Boissinot, 2007). A observação de que a integração do kDNA ocorreu freqüentemente no cromossomo X é consistente com diversos relatos na literatura, que mostram uma maior abundância de elementos L1 neste cromossomo (Graham & Boissinot, 2006; Song & Boissinot, 2007).

As análises das seqüências mostraram que, em muitos indivíduos, foram identificados diferentes sítios de integração em um mesmo clone. A organização das seqüências do kDNA presentes nos sítios de integração também se apresenta diversa, o que pode ser um indicativo da ocorrência de múltiplos eventos de integração.

Esse achado foi exemplificado na Figura 14, onde verificamos a presença de seqüências flanqueadoras provenientes dos cromossomos 8 e X. Essa organização pode ter sido gerada pela integração de minicírculos em proximidade, ou, ainda, ter sido devido à interrupção do kDNA por retrotransposons do hospedeiro. Sabe-se que os LINE-1 são capazes de remodelar o genoma através da mobilização das seqüências não-LINE

adjacentes para outros locais (Kazazian e Goodier, 2002). Tal mobilização explicaria as características de rearranjo presentes nas seqüências contendo kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma humano.

A transferência vertical das mutações para a progênie pode ser demonstrada em alguns casos, onde foi possível encontrar o mesmo sítio de integração no pai e em duas filhas (Figuras 11 e 13). A presença de regiões de justaposição entre a seqüência de kDNA e as regiões flangeadoras, foi verificada na maior parte dos clones analisados. Essas regiões apresentam-se ricas em A C, como já descrito no trabalho de Nitz e cols, (2004). Essas justaposições poluem as seqüências de minicírculos de kDNA e de retroelementos LINEs e SINEs à exaustão, como visto em vários de nossos clones e no trabalho prévio do nosso laboratório (Simões-Barbosa e cols, 2006).

A identificação de seqüências de minicírculos de kDNA integradas ao genoma de células germinativas humanas, corrobora o conhecimento descrito na literatura de aquisição de DNA exógeno nessas células através de um processo conhecido por transferência gênica mediada por esperma (Smith e Spadafora, 2005). Embora haja poucas referências no estudo envolvendo os mecanismos responsáveis pela transferência gênica em esperma, sabe-se que são dependentes da atividade de transcriptase reversa e alguns pesquisadores relatam a participação retroviral de elementos LINE-1 (Pittoggi e cols, 2003; Beraldi e cols, 2006). A geração de progênie carregando as características provenientes do esperma “mutado” reforça a hipótese de herança não-mendeliana decorrente de inserção de DNA exógeno em células germinativas (Spadafora, 2008b).

Os elementos retrotransponíveis podem promover rearranjos no genoma direta ou indiretamente. O processo de transposição pode causar deleções ou inversões, ou ainda ocasionar a mudança de uma seqüência do genoma para uma nova localização. Os retrotransposons podem ainda servir de substrato para sistemas de recombinação celular, funcionando como regiões portadoras de homologia, através de mecanismos de recombinação homóloga desigual. Esses eventos podem levar a duplicação de “exons” e a formação de novas proteínas. Sabe-se também que esses elementos podem contribuir para a recombinação inter-cromossomal e que podem levar a alterações citogenéticas envolvidas no processo de especiação humana (Deininger e Batzer, 1999)

Esses achados convergem para um mesmo ponto: seqüências de *T. cruzi* podem ser transferidas horizontalmente para o genoma do seu hospedeiro e transmitidas via células germinativas para a progênie. A partir do sítio de integração, as seqüências de kDNA com motivos repetidos em *tandem*, altamente instáveis, podem ser mobilizadas para outros sítios do genoma. Ambos os mecanismos envolvem a atividade de retroelementos.

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



#### **4. Considerações finais**

A importância deste estudo para a compreensão das forças que atuam no sentido de aumentar a diversidade genética das populações humana e de demais mamíferos e, eventualmente, promovendo especiação deve ser enfatizada. Até então, os conhecimentos prévios sobre o papel de forças evolutivas na promoção da diversidade genética foram restringidos aos efeitos da seleção natural Darwiniana. Todavia, a seleção natural parece ser um fator que restringe a diversidade genética à medida que elimina os indivíduos considerados “não-adaptados” para a sobrevivência.

Em vista disto, vários autores consideram que as verdadeiras forças evolutivas, atuando de maneira aleatória ou probabilística, seriam as mutações, recombinações e deriva genética que, ao introduzir modificações no genoma ficam sujeitas à seleção natural. Ou seja, a seleção natural seria o árbitro final que regula e restringe as forças que promovem a diversidade genética das espécies vivas. Até agora, porém, esse problema de maior interesse no campo da genética de populações estava restrito a estudos teóricos ou, na melhor das hipóteses, a observações pontuais sobre variação de alelos que afetam o fenótipo de alguns indivíduos em populações restritas em algumas áreas geográficas.

Na literatura, nós verificamos que o crescimento do genoma das espécies de eucariotas ao longo de mais de 1,5 bilhões de anos teria sido largamente dependente da transferência horizontal de elementos de origem viral, entre outros. Em favor dessa teoria estariam os retrotransposons que se caracterizam pela presença de seqüências repetitivas de DNA que perfazem 48% do genoma humano. Acredita-se que no passado esse teria sido o

mecanismo de crescimento do genoma, o qual teria propiciado às espécies a criação de novos genes ou de pseudogenes. Diante das evidências teóricas que surgiram das análises filogenéticas de seqüências de DNA oriunda de espécies distantes nos diversos reinos, os elementos transponíveis teriam impulsionado os processos de geração de diversidade e, talvez, de especiação. Ainda que o DNA copiado e integrado estivesse submetido a processos de recombinação, mediante rearranjos, embaralhamentos e transposição, tal mecanismo de geração de diversidade ainda estaria sujeito à limitação pela repetição do que já existia no genoma.

Aqui nós mostramos que tal limitação das forças promotoras da diversidade pode ser rompida pela ocorrência de transferência horizontal de DNA entre diferentes espécies, que têm seguimento na sua herança vertical pela reprodução sexuada. Ao demonstrar que os elementos transponíveis autônomos da família LINE-1 ativos na retrotransposição são os sítios preferenciais de integração do DNA exógeno, verifica-se que as forças evolutivas que agiram desde tempos imemoriais continuam a operar no sentido de promover diversidade genética praticamente ininterrupta. Ou seja, nós achamos que as forças biológicas que atuam no sentido de expansão continuada da diversidade das espécies vivas simplesmente acompanham o movimento incessante que fizeram o universo infinito.

A originalidade do nosso estudo estende-se, pois, a descrição de um modelo experimental para análises de fatores importantes na genética de populações que dependem de transferência horizontal de DNA exógeno e sua incorporação no genoma do hospedeiro mamífero, de onde ele se perpetua sem limite pela reprodução sexuada, ao longo das gerações. Desse

ponto de vista, a imensa cadeia epidemiológica que envolve o *T. cruzi* e todas as espécies de mamíferos conhecidas favorece a deriva genética, a fixação do DNA exógeno e o crescimento do genoma do hospedeiro mamífero.

Até parece que os diversos elos da cadeia epidemiológica associada com a transmissão do *T. cruzi* para mais de 1200 espécies de mamíferos, passando pelos insetos transmissores e hospedeiros intermediários do protozoário, se colocam na interface dos fatores que favorecem a diversidade genética tanto do parasito quanto a de seus inúmeros hospedeiros. Em favor desse raciocínio está uma descrição da enorme plasticidade do *T. cruzi*, com capacidade de transpor sua própria linhagem. Entretanto, ao analisar o assunto a partir da perspectiva de trocas genéticas entre o protozoário e o hospedeiro mamífero, não foi possível demonstrar a transferência de DNA humano para o parasito com a metodologia empregada (Teixeira e cols, 2004). Isto significa que se houvesse alguma transferência de DNA isto teria ocorrido em níveis mínimos ou não detectáveis. Sendo assim, esta observação também sugere que as forças estocásticas evolutivas atuam no sentido do mais simples para o mais complexo, ou seja, no sentido de diferenciação continua das espécies de mamíferos existentes e de novas espécies, considerando uma função tempo em eons.

Diante da importância tomada pelos aspectos supracitados, somente aqui entra a doença como uma consequência fortuita de um longo processo evolutivo de relação parasita-hospedeiro. Isto porque mesmo naqueles indivíduos que sucumbem à doença de Chagas não há interrupção da saga reprodutiva. Geralmente o chagásico falece depois dos 30 anos de idade, e deixa sua prole geneticamente modificada. Diante disso, uma pergunta se faz

necessária: Qual o significado dessas modificações genéticas na saúde dos descendentes de chagásicos, que não seriam portadores da infecção ativa pelo *T. cruzi*?

Ainda não temos dados clínicos para responder essa pergunta. Embora seja do conhecimento dos clínicos e cardiologistas que é possível ter a síndrome dos megas (mega-esôfago e/ou mega-colon) ou cardiopatia inflamatória dilatada na ausência de provas diretas ou indiretas da presença do *T. cruzi*, nós não sabemos se tal sintomatologia estaria associada às mutações do KDNA inserido no genoma de descendentes de chagásicos. Existem muitas conjecturas sobre o papel das mutações na patogênese da doença de Chagas, porém, o desconhecimento sobre a origem da auto-imunidade ainda impossibilita uma conclusão definitiva. Talvez este tipo de resposta seja obtido em um modelo animal limpo, no qual a infecção seja eliminada pelos fatores de resistência imune inata, deixando apenas as mutações como indutores da auto-imunidade que produz cardiomegalia e insuficiência cardíaca. Este estudo está sendo conduzido no LMPDC/UnB e poderá esclarecer melhor essa indagação.

## VI. Referências Bibliográficas

1. (1997). Chagas disease. **Interruption of transmission.** *Wkly Epidemiol Rec* 72(1-2): 1-4.
2. (2000). Chagas disease, Brazil. **Interruption of transmission.** *Weekly Epidemiological Record* 75: 153 - 60.
3. ABAD-FRANCH, F & MONTEIRO, FA. **Molecular research and the control of Chagas Disease Vectors.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* V 77(3): 437-454, 2005.
4. ABU-ELNEEL, K; ROBINSON, DR; DREW, ME; ENGLUND, PT; SHLOMAI, J. **Intramitochondrial localization of universal minicircle sequence-binding protein, a trypanosomatid protein that binds kinetoplast minicircle replication origins.** *The Journal of Cell Biology*, 153, p. 725-734, 2001.
5. ANDRADE, ZA. **Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection.** *Ciba Found. Symp.* 99, 214-233, 1983.
6. ANDRADE, ZA. **Pathogenesis of Chagas' disease,** *Res. Immunol.* 142, 126-129, 1991.
7. ANDRADE, ZA; ANDRADE, SG; CORREA, R; SADIGURSKY, M; FERRANS, VJ. **Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy.** *Am. J. Pathol.* 144, 1403-1411, 1994.
8. ARGANARAZ, ER. **Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elemento L1 no genoma da célula hospedeira.** Tese, Universidade de Brasília, 1996.
9. BABUSHOK, DV & KAZAZIAN HH. **Progress in Understanding the Biology of the Human Mutagen LINE-1.** *Human Mutation.* V 0: 1-13, 2007.
10. BAILEY, JA; CARREL, L; CHAKRAVARTI, A; EICHLER, EE. **Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation the Lyon repeat hypothesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12288 – 12292, 2000.
11. BARRET, MP. et al. **The trypanosomiases.** *The Lancet.* v. 362, p. 1469-1480, 2003.
12. BERARDI, R; PITTOGGI, C; SCIAMANNA, I; MATTEI, E; SPADAFORA, C. **Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development.** *Mol Reprod Dev.* V 73:279–287. 2006

13. BRACKETT, BG; BARANSKA, W; SAWICKI, W. **Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:353-357, 1971.
14. BRINSTER, RL; SANDGREN, EP; BEHRINGER, RR; PALMITER, RD. **No simple solution for making transgenic mice.** *Cell* 59:239-241, 1989.
15. BATZER, MA. & DEININGER, PL. **Alu repeats and human genomic diversity.** *Nature* 3: 370 – 380, 2002.
16. BLUM, B; STURM, NR; SIMPSON, AM; SIMPSON, L. **Chimeric gRNA-mRNA molecules with oligo(U) tails covalently linked at sites of RNA editing suggest that U addition occurs by transesterification.** *Cell*, 65, p. 543-550, 1991.
17. BONAMETTI, AM; CASTELO-FILHO, A; RAMOS, LR; BALDY, JLS; MATSUO, T. **Trypanosoma cruzi infection in blood donors.** *Journal of Public Health.* V 32(6): 566-71, 1998.
18. BRENER, Z. **Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82 (1): 205-213, 1987.
19. BRENER, Z. & GAZZINELLI, RT. **Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease.** *Int Arch Allergy Immunol.* 114:103-110, 1997.
20. BRENER, Z, ANDRADE, Z & BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** *Guanabara Koogan, 2ª edição, 2000.*
21. BRODSKYN, CI & BARRAL-NETTO, M. **Resposta imune humana na doença de Chagas.** In: BRENER, Z; ANDRADE, Z, BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, p. 171-176, 2000.
22. BUSTAMANTE, JM; RIVAROLA, HW; FÉRNANDEZ, AR; ENDERS, JE; FRETES, R; PALMA, JA; PAGLINI-OLIVA, PA. **Indeterminate Chagas Disease: Trypanosoma cruzi strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy.** *Clinical science.* V 104: 415-420, 2003.
23. CAMAIONE, A; RUSSO, MA; ODORISIO, T; GANDOLFI, F; FAZIO, VM; SIRACUSA, G. **Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads.** *J Reprod Fertil.* V 96 (1): 203-212, 1992.
24. CARTER, KL; ROBERTSON, BC; KEMPENAERS, B. **A differential DNA extraction method for sperm on the perivitelline membrane of avian eggs.** *Reproductive Biology and Behaviour Group, MPG Research Center for Ornithology, Postfach 1564, D-82305, 2000.*

25. CASSE, N; BUI, QT; NICOLAS, V; RENAULT, S; BIGOT, Y; LAURIER, M. **Species sympatry and horizontal transfers of *Mariner* transposons in marine crustacean genomes.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. V 40: 609-619, 2006.
26. CHAGAS, C. **New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V 1: 159-218, 1909.
27. CHEN, JM; FÉREC, C; COOPER, DN. **LINE-1 Endonuclease-Dependent Retrotranspositional Events Causing Human Genetic Disease: Mutation Detection Bias and Multiple Mechanisms of Target Gene Disruption.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. V 2006: 1-9, 2006.
28. CHOI, IG & KIM, SH. **Global extent of horizontal gene transfer.** *PNAS*. V 104 (11): 4489-94, 2007.
29. CUNHA-NETO, E. **Estudo da Ativação e Inativação de Linfócitos T Com Clones Murinos Ativados Quimicamente.** In: XI CONGRESSO DA SOC. BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA. RESUMOS. CAXAMBU, 1986.
30. CUNHA-NETO, E; DZAU, VJ; ALLEN, PD; STAMATIIOU, D; BENVENUTTI, I, L; HIGUCHI, ML; KOYAMA, NS; SILVA, JS; KALIL, J; LIEW, CC. **Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas disease Cardiomyopathy.** *American Journal of Pathology*, 67, p. 305-313, 2005.
31. CUNHA-NETO, E; BILATE, AM; HYLAND, KV; FONSECA, SG; KALIL, J; ENGMAN, DM. **Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry.** *Autoimmunity*, 39(1): 41-54, 2006.
32. DANIELS, GR & DEININGER, PL. **Integration site preferences of the *Alu* family and similar repetitive DNA sequences.** *Nucleic Acid Res*. 13(24): 8639-8954, 1985.
33. DARWIN, C. **The origin of species by means of natural selection of the preservation of favoured races in the struggle for life.** London, 1859.
34. DAS, BB; SEN, N; GANGULY, A; MAJUMDER, HK. **Reconstitution and functional characterization of the unusual bi-subunit type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*.** *FEBS Letters*, 565, p. 81-88, 2004.
35. DAVIS, CC & WURDACK, KJ. **Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales.** *Science*. V 305 (5684): 676-678, 2004.
36. DEININGER, PL & BATZER, MA. ***Alu* Repeats and Human Disease.** *Molecular Genetics and Metabolism*. V 67: 183-193, 1999.

37. DEININGER, PL; MORAN, JV; BATZER, MA; KAZAZIAN HHJr. **Mobile elements and mammalian genome evolution.** *Curr. Opin. in Gen. & Dev.* 13: 651 – 658, 2003.
38. DEMARCO, R; MATHIESON, W; DILLON, GP; ALAN WILSON, R. **Schistosome albumin is of host, not parasite, origin.** *Int J Parasitol.* V 37 (11): 1201-8, 2007.
39. DIAS, JCP. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características biológicas, como agentes de enfermidades transmitidas por alimentos.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V 39 (4): 370-375, 2006.
40. DOS SANTOS, PVA; ROFFÊ, E; SANTIAGO, HC; TORRES, RA; MARINO, APMP; PAIVA, CN; SILVA, AA; GAZZINELLI, RT; LANNES-VIEIRA, J. **Prevalence of CD8+ a T-cells in *Trypanosoma cruzi* elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62LLowLFA-1HighVLA-4High activation phenotype and expression of IFN-g –inducible adhesion and chemoattractant molecules.** *Microbes Infect.* 3: 971-984, 2001.
41. FERREIRA, MS; LOPES, ER; CHAPADEIRO, E; DIAS, JCP; OSTERMAYER, AL. **Doença de Chagas.** In: VERONESI, R & FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. Ed. Atheneu. 2ª ed. p 1195-1233, 2002.
42. FRANCO da SILVEIRA, J. Em BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
43. FUTUYAMA, DJ. **Evolutionary Biology.** 3 ed. Sunderland, MA: Sinauer, 1998.
44. GADELHA, AAM; VERÇOSA, AFA; LORENA, VMB; NAKAZAWA, M; CARVALHO, AB; SOUZA, WV; FERREIRA, AGP; SILVA, ED; KRIEGER, MA; GOLDENBERG, S; GOMES, YM. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test.** *Vox Sanguinis.* V 85: 165-170, 2003.
45. GOMES, JA; BAHIA-OLIVEIRA, LM; ROCHA, MO; MARTINS-FILHO, OA; GAZZINELLI, G; CORRÊA-OLIVEIRA, R. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.** *Infect Immun.* 71: 1185-1193, 2003.
46. GOMES, CC. **Lesões típicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma Alterado por Interações de Seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.** Tese, Universidade de Brasília, 2006.
47. GRAHAM, T & BOISSINOT, S. **The Genomic Distribution of L1 Elements: The Role of Insertion Bias and Natural Selection.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* V 2006: 1-5, 2006.



48. GRAY, MW. **Evolution of organellar genomes.** *Current Opinion in Genetics & Development.* V 9: 678-687, 1999.
49. HAWKING, S. **O universo numa casca de noz.** 2. ed. Editora Mandarim, 2002.
50. HECHT, MM. **Transferência horizontal de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e herança vertical das mutações.** Tese, Universidade de Brasília, 2008.
51. HEDGES, DJ & BATZER, MA. **From the margins of the genome: mobile elements shape primate evolution.** *BioEssays.* V 27:785–794, 2005.
52. HIGUCHI, ML; De BRITO, T; REIS, MM; BARBOSA, A; BELLOTTI, G; PEREIRA-BARRETO, AC; PILEGGI, F. **Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.** *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology,* 423: 157-160, 1993b.
53. HURK, J; MEIJ, I; SELEME, M; HOEFSLOOT, L; SITERSMANS, E; WIJS, I; PLOMP, A; JONG, P; KAZAZIAN, H; CREMERS, F. **L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development.** Oxford University Press. 2007.
54. IMASE, A; OHMAE, H; IWAMURA, Y; KIRINOKI, M; MATSUDA, H. **A comparative study on mouse MHC class I sequences detected in *Schistosoma japonicum* recovered from BALB/c (H-2d) and C57BL/6 (H-2b) mice.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* V 35 (1): 8-10, 2004.
55. KAZAZIAN, HH; WONG, C; YOUSSEFIAN, H; SCOTT, AF; PHILLIPS, DG; ANTONARAKIS, SE. **Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man.** *Nature.* V 332: 164-166, 1988.
56. KAZAZIAN, HH. Jr. **L1 Retrotransposons shape the mammalian genome.** *Science,* 289: 1152 – 1153, 2000.
57. KAZAZIAN, HH & GOODIER, JL. **LINE Drive: Retrotransposition and Genome Instability.** *Cell.* V 110: 277–280, 2002.
58. KEELING, PJ; BURGER, G; DURNFORD, DG; FRANZ LANG, B; LEE, RW; PEARLMAN, RE; ROGER, AJ; GRAY, M.W. **The tree of eukaryotes.** *Trends in Ecol. And Evol.,* 20: 670-676, 2005.
59. KLINGBEIL, MM & ENGLUND, PT. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication.** *PNAS.* V 101(13): 4333-4334, 2004.
60. KOLLIEN, AH & SCHAUD, GA. **The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae.** *Parasitology Today,* Cambridge, V 16, n.9, p.381-387, 2000.

61. LANA, M & TAFURI, WL. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. In: NEVES, DP; MELO, AL; GENARO, O; LINARDI, PM. *Parasitologia Humana*. 10a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p.73-96, 2000.
62. LANDER, ES; LINTON, LM; BIRREN, B; NAUSBAUM, C; ZODY, MC; BALDWIN, J; DEVON, K; DEWAR, K; DOYLE, M; FITZHUGH, W. **Initial sequencing an analysis of the human genome**. *International Human Genome Sequencing Consortium. Nature*. V 409: 860-921, 2001.
63. LANNES-VIEIRA, J. ***Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation?** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 299-304, 2003.
64. LARANJA, FS; NOBREGO, G; MARINDA, A. **Chagas disease a clinical, epidemiologic and pathologic study**. *Circulation*, 14, 1035-1060, 1956.
65. LAVITRANO, M; CAMAIONI, A; FAZIO, VW; DOLCI, S; FARACE, MG, et al. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs-genetic transformation of mice**. *Cell*. 57:717-723, 1989.
66. LEE, J; CORDEUX, R; HAN, K; WANG, J; HEDGES, DJ; LIANG, P; BATZER, MA. **Different evolutionary fates of recently integrated human and chimpanzee LINE-1 retrotransposons**. *Gene*. V 10.1016: 1-10, 2006.
67. LEON, JS. & ENGMAN, DM. **The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease**. *Front. Biosci.*, 8: 315-322, 2003.
68. LEWIN, B. **Genes VII**. Atmed Editora, 7ª edição, 2001.
69. LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, SA; AGBO, EEC; ENGLUND, PT. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA**. *Trends in Parasitology*. V 21(8): 363-369, 2005a.
70. LIU, Y; MOTYKA, SA; ENGLUND, PT. **Effects of RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Structure specific Endonuclease-I on Kinetoplast DNA Replication**. *The Journal of Biological Chemistry*. V 280(42): 35513-35520, 2005b.
71. LIU, YG & WHITTIER, R. **Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking**. *Genomics*. V 25 (3): 674-81, 1995.
72. LUKES, J; GUILBRIDE, DL; VOTYPKA, J; ZIKOVA, A; BENNE, R; ENGLUND, PT. **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure**. *Eukaryotic Cell*, 1, p. 495-502, 2002.

73. LUKES, J; HASHIMI, H; ZYKOVA, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates.** *Curr Genet.* V 48: 277-299, 2005.
74. LUQUETTI, O. & RASSI, A. Em BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRALNETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
75. MAGNANO, AR; GIORDANO, R; MOSCUFO, N; BACCETTI, B; SPADAFORA, C. **Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome.** *J Reprod Immunol.* V 41 (1-2): 187-196, 1998.
76. MANDISON-ANTENUCCI, S; GRAMS, J; HAJDUK, SL. **Editing Machines: The Complexities of Trypanosome RNA Editing.** *Cell.* V 108: 43-438, 2002.
77. MARGULIS, L & SAGAN, D. **What is life?** *University of California Press,* 2000.
78. MARGULIS, L. **Symbiotic planet: a new look at evolution.** *Science Marster Series,* 2000.
79. MARGULIS, L & SAGAN, D. **Acquiring genomes: a theory of the origins of species.** *New York: Basic Books,* 240 p. 2002.
80. MARIN, R.G. **Definição de parâmetros epidemiológicos e parasitológicos da doença de Chagas em Santander – Colômbia, e características de seu agente etiológico.** 154 f. Dissertação (Mestrado) - *Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, 2003.
81. MARTIN, SL. **The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* V 2006: 1-6, 2006.
82. MONCAYO, A. Chagas disease: **Current Epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(5): 577-591, 2003.
83. MOSER, DR; KIRCHHOFF, LV; DONELSON, J. **Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol.* V 27: 1477-1482, 1989.
84. MOWER, JP; STEFANOVI, S; YOUNG, GJ; PALMER, JD. **Gene transfer from parasitic to host plants.** *Nature.* V 432: 165-166, 2004.
85. MUSOVA, Z; HEDVICAKOVA, P; MOHRMANN, M; TESAROVA, M; KREPELOVA, A; ZEMAN, J; SEDLACEK, Z. **A novel insertion of a rearranged L1 element in exon 44 of the dystrophin gene: Further evidence for possible bias in retroposon integration.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* V 347: 145-149, 2006.

86. NITZ, N; GOMES, C; ROSA, AC; SOUZA-AULT, MR; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, AR. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell*. V 118 (2): 174-186, 2004.
87. OKUBO, M; HORINISHI, A; SAITO, M; EBARA, T; ENDO, Y; KAKU, K; MURASE, T; ETO, M. **A novel complex deletion–insertion mutation mediated by Alu repetitive elements leads to lipoprotein lipase deficiency.** *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007.
88. PÉREZ-MORGA, D & ENGLUND, PT. **The Attachment of minicircles to Kinetoplast DNA networks during replication.** *Cell*, 74: 703-711, 1993.
89. PITTOGGI, C; SCIAMANNA, I; MATTEI, E; BERARDI, R; LOBASCIO, AM; MAI, A; QUAGLIA, MG; LORENZINI, R; SPADAFORA, C. **A role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development.** *Mol Reprod Dev*. V66:225–236, 2003.
90. PIRARD, M; LIHOSH I, N; BOELAERT, M; BASANTA, P; LOPEZ, F; VAN DER STUYFT, P. **The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region.** *Transfusion*, 45, p. 554-561, 2005.
91. PRATA, A. **Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, Suppl., 1, p. 81-88, 1999.
92. PRATA, A. **Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease.** *The Lancet Infectious Diseases*. V 1: 92-100, 2001.
93. REIS, GA & LOPES, MF. **A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais.** In: BRENER, Z; ANDRADE, Z; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 153-169, 2000.
94. REQUENA, JM; JIMENEZ-RUIZ, A; SOTO, M; LOPEZ, MC; ALONSO, C. **Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification.** *Mol Biochem Parasitol*. V 51: 271-280, 1992.
95. REQUENA, JM; LOPEZ, MC; ALONSO, C. **Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol. Today*, v. 12, p. 279-282, 1996.
96. REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
97. REY, L. **Parasitologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 161-178, 2002.

98. RIBEIRO dos SANTOS, R; ROSSI, MA; LAUS, JL; SANTANA SILVA, J; SAVINO, W; MENGEL, J. **Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.** *J. exp. Med.* V 175: 29-39, 1992.
99. SAMBROOK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Second Edition. Cold Spring Harbor NY, 1989.
100. SAMBROOK, J & RUSSEL, DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Third Edition, Chapter 6. *Cold Spring Harbor NY*, pp 7-12, 2001.
101. SANTOS-BUCH, CA & TEIXEIRA, ARL. **The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** *J. exp. Med.* V 140: 38-53, 1974.
102. SCIAMANNA, I; BARBERI, L; MARTIRE, A; PITTOGGI, C; BERALDI, R; GIORDANO, R; MAGNANO, A; HOGDSON, C; SPADAFORA, C. **Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information.** *Elsevier.* V 312:1039–1046, 2003.
103. SCHOFIELD, CJ; JANNIN, J; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control.** *Trends Parasitol* n° 12, 22:583-8, 2006.
104. SIMÕES-BARBOSA, A. **Transferência horizontal de seqüência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para transposon LINE-1 e alteração da expressão do gene p9 na célula hospedeira.** *Tese, Universidade de Brasília*, 2000.
105. SIMÕES-BARBOSA, A; ARGANARAZ, ER; BARROS, AM; ROSA, AC; ALVES, NP; LOUVANDINI, P; D'SOUZA-AULT, MR; NITZ, N; STURM, NR; NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, AR. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (8): 833-43, 2006.
106. SIMONSON, AB; SERVIN, JA; SKOPHAMMER, RG; HERBOLD, CW; RIVERA, MC; LAKE, JA. **Decoding the genomic tree of life.** *PNAS.* V 102 (1): 6608-13, 2005.
107. SMIT, AF & RIGGS, AD. **Interspersed repeats and other moments of transposable elements in mammalian genomes.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* (9): 657 - 653, 1999.
108. SMITH, K & SPADAFORA, C. **Sperm-mediated gene transfer: applications and implications.** *Bioessays.* V 27:551-562. 2005.
109. SONG, M & BOISSINOT, S. **Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination.** *Gene.* V 290: 206-213, 2007.

110. SPADAFORA, C. **Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation.** *Bioessays*. V 20 (11): 955-964, 1998.
111. SPADAFORA, C. **A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes.** *Syst Biol Reprod Med*. 54 (1):11-21, 2008a.
112. SPADAFORA, C. **Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information.** *Human Reproduction* pp. 735–740, 2008b.
113. STURM, NR; DEGRAVE, W; MOREL, C; SIMPSON, L. **Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastid minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease.** *Mol Biochem Parasitol*. V 33: 205-214, 1989.
114. TARLETON, RL. **Chagas disease: a role for autoimmunity.** *Trends Parasitol*. 19(10): 447-451, 2003.
115. TEIXEIRA, ARL; TEIXEIRA, ML, SANTOS-BUCH, CA. **The immunology of experimental Chagas' disease - IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man.** *Am J Pathol*. V 80: 163-180, 1975.
116. TEIXEIRA, ARL. **Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos.** Editora Universidade de Brasília, 161p, 1987.
117. TEIXEIRA, ARL; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V 101 (5): 463-491, 2006.
118. TEIXEIRA, ARL. **Doença de Chagas e evolução.** Universidade de Brasília: Finatec, 1ª edição, 2007.
119. TYLER, KM & ENGMAN, DM. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** *International Journal for Parasitology*, New York. V 31, p.472-481, 2001.
120. VEXENAT, AC; SANTANA, JM; TEIXEIRA, AR. **Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, p. 177-185, 1996.
121. WANDERLEY, DMV; GONZALES, TT; PEREIRA, MSCA; NASCIMENTO, RD; MORAES-SOUZA, H. **Controle da hemoterapia e da doença de Chagas transfusional: 1988 e 1990.** *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.27, n.6, p.430-435, 1993.

122. WEINER, A.M. **SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feed you.** *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14(3): 343-350, 2002.
123. WILLIAMS, DL; SAYED, AA; RAY, D; MCARTHUR, AG. ***Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host.** *Molecular and Biochemical Parasitology*. V 150 (2): 359-363, 2006.
124. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee.** *WHO Technical Report Series*, V 905, 2002.

# ANEXO I

## Ficha de Consulta

Ficha nº \_\_\_\_\_

### IDENTIFICAÇÃO:

Nome: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Área: ( ) Rural ( ) Urbana  
Residiu neste local durante quantos anos: \_\_\_\_\_  
Data do Exame: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### ANTECEDENTES:

#### 1. Pessoais:

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

#### 2. Familiares:

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

### Dados Clínicos:

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



## ANEXO II

<b>Caso</b>	<b>Clone</b>	<b>kDNA</b>	<b>DNA humano</b>	<b>Justaposição</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Locus</b>	<b>E-value</b>
<b>4 (1393)</b>	48E	134-196/ 234-254/ 377-397/ 520-637	1-146/ 196-241/ 250-384/ 394-527	TACACCAACCCAA/ AACC/ TACACCAA	7 X	AF104455.1 (LINE-1) AL732374.14 (LINE-1)	8e <sup>-50</sup> 7e <sup>-45</sup>
	78E	1-382/ 506-623	368-511/ 608-871	CCCTCCCAAGACTAA/ TACTCC/ ACCCTCCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e <sup>-49</sup>
	79E	86-176/ 275-420/ 796-937/ 1271-1297	1-101/ 177-282/ 421-800/ 926-1270	TTGACCCCCCTCCCA/ TGACGGCCCCCTCCAAAA/ TGAA/ CCCTCCCAAAAC	13 16 2 X	AL137140.12 (CpG island) AC125796.2 (Indeterminado) AC093690.5 (Indeterminado) AL732374.14 (LINE-1)	4e <sup>-32</sup> 5e <sup>-43</sup> 4e <sup>-171</sup> 5e <sup>-56</sup>
	83E	1-62/ 264-283/ 414-782	57-263/ 280-420/ 777-848	TGGTGT/ GTGT/ TTGGGAG	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e <sup>-60</sup>
	181E	35-333	1-42/ 327-798	TACACCAA/ CTACACCA/ GAGATGC	8 12	BK000383.1 (LINE-1) AC084364.20 (L2 e Alu)	8e <sup>-12</sup> 0.0
	184E	1-249/ 344-445	232-349	CCCTCCCAAGACTAAACC/ ACACCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e <sup>-44</sup>
	185E	104-819	1-114/ 808-1138	TACACCAA/ GGGTGAGATGC	X 12	AL732374.14 (LINE-1) AC084364.20 (L2 e Alu)	1e <sup>-35</sup> 5e <sup>-156</sup>
	186E	1-968	958-1287	GGGTGAGATGC	12	AC084364.20 (L2 e Alu)	6e <sup>-156</sup>
	190E	1-699	683-1353	TTTTGGGAGGGGGTTC	8	AC016868.8 (MER31A)	0.0
	194E	108-581/ 634-739	1-113/ 566-638	ACACCA/ CCCTCCCAAGACTAAA/ ACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e <sup>-25</sup>

	197E	130-440	1-142	T TAGTCTTGGG AG	X	AL732374.14 (LINE-1)	8e <sup>-48</sup>
<b>6 (1407)</b>	70E	1-287	265-930	ATTACA CCAACCCCAA TCGAACC	12	AC125629.1 (LINE-1)	0.0
	71E	1-208	193-481	ATGGTTTTGGGAGGGG	6	AL160399.13 (Indeterminado)	2e <sup>-132</sup>
	199E	1-356/ 591	473- 341-472	CCCTCCCAAG ACTAAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	9e <sup>-49</sup>
	200E	1-198	191-1176	ACTAAACC	X X	AL135784.4 (LINE-1) AL732374.14 (LINE-1)	0.0 4e <sup>-20</sup>
	202E	192-360	1-198/354- 1285	ACACCAA/ CCCTCCC	5 8	AC129713.1 (Indeterminado) AC009902.13 (LINE-1)	1e <sup>-87</sup> 0.0
<b>10 (1415)</b>	37E	1-280	264-336	CCAACCCCAATCGAACC	1	AC096540.2 (Indeterminado)	2e <sup>-18</sup>
	42E	93-173	1-109	ACACAGCTCTACACCAA	X	AL359973.11 (LINE-1)	2e <sup>-37</sup>
<b>25 (1487)</b>	101E	205-314	1-210	TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e <sup>-59</sup>
	103E	203-469/508- 574/614-793	1-212/ 470- 507/ 575-613 775-905	TGGTTTTG GG ATGGTTTTGGGAGGGG CGG	11 16	NM_002457.2 (Mucin gene) AC092145.2 (Indeterminado)	2e <sup>-78</sup> 4e <sup>-49</sup>
	105E	1-252	253-485	Not found	11	M22404.1 (Mucin gene)	3e <sup>-59</sup>
	142E	1-332	322-592	GGGGGAGATGC	11	AC107948.7 (Indeterminado)	2e <sup>-126</sup>
	144E	1-309	297-650	CAATCGAACCACC	1	AL391883.17 (Indeterminado)	2e <sup>-164</sup>
	147E	1-94/ 122-142	83-129/139- 246	CCCTCCCAAGAC/ TACACCAA/ AACC	4	AC093747.2 (LINE-1)	3e <sup>-44</sup>
	151E	66-554/1217- 1464	1-71/539-1223	TACACC/ CCCTCCCAAGACTAAA/ TACA CCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e <sup>-56</sup>
<b>27 (1385)</b>	72E	107-209/250- 270/917-936	1-113/210-249 250-916/938- 1041	TACACCA TACACCAACCCCAATCGAACC	X 2	AL732374.14 (LINE-1) AC116654.4 (LINE-1)	1e <sup>-36</sup> 0.0

	73E	107-215/ 350-468/ 494-514	1-111/ 210-358/454-501/ 513-1096	CCCTCC/ TACACCAA CCCTCCCAAGACTAA	X X	AL732374.14 (LINE-1) AL670463.3 (LINE-1)	8e <sup>-36</sup> 0.0
	75E	1-115/264-284 1117-1221	108-269/277-1118 1215-1336	TTGGTGTA/ GGTTTCG/ TTGGTGTA	1 X	AL513363.8 (LINE-1) AL732374.14 (LINE-1)	0.0 1e <sup>-47</sup>
	123E	1-263	251-409	CCCCAATCGAACC	1	AC119426.2 (Indeterminado)	4e <sup>-70</sup>
	124E	1-287	271-472	CCAACCCCAATCGAACC	6	AM393849.1 (TXLNB gene)	1e <sup>-76</sup>
	125E	1-263	252-394	CCCAATCGAACC	7	AC006381 (ERV1)	6e <sup>-55</sup>
	127E	327-716	1-334	TACACCAA/ AACC	5	AC113414 (LINE-1)	4e <sup>-62</sup>
	129E	1-300	290-408	CCCAATCGAACC	7	AC012596.4 (LINE-1)	5e <sup>-50</sup>
	131E	1-65/ 172-321	57-172/312-857	TGGTGATT/ TTGGTGATT	5	AC129713.1 (LINE-1)	6e <sup>-167</sup>
<b>28 (516)</b>	60E	57-173/ 226-252/ 583-747/ 796-912	1-56/158-225/ 233-582/735-806/901-964	CCA AACTTGAACCCCTCCCAA/ ACCAACCCCAATCGAACC/ CCCTCCCAAGACT/ TACACATACAC/ ACCCCTCCCAA	4	AP002027.1 (LINE-1)	1e <sup>-145</sup>
	64E	1-68/415-553	56-418	CCCCAATCGAACC/ CCCA	X	AL049734 (LINE-1)	5e <sup>-178</sup>
	65E	649-961	1-648	Not found	1	AL138801.20 (Indeterminado)	0.0
	66E	738-960	1-737/952-1065	ATCGAACCC	5 7	AC108104.2 (LINE-1) AC012596.4 (LINE-1)	0.0 7e <sup>-31</sup>
	68E	1-339/446-702	327-445	CCCAATCGAACCC	7	AC012596.4 (LINE-1)	8e <sup>-50</sup>
	112E	1-294	287-408	ACCAACCCCAATCGAACC	3	AC112214.2 (Indeterminado)	8e <sup>-47</sup>
	113E	1-256/502-631	241-501/620-872	CCCCAATCGAACCC/ CCCAATCGAAC C	X 1	AL732374.14 (LINE-1) BK004196.1	2e <sup>-59</sup> 7e <sup>-19</sup>

						(OR1-17 gene)	
	117E	1-180	170-439	CCAATCGAACC	Y	AC006370.2 (LINE-1)	5e <sup>-132</sup>
	119E	1-263/1055-1482	247-1054/1474-1564	CCAACCCCAATCGAACC/ CCCTCCCAA	8 X	AC015528.14 (LINE-1) AL732374.14 (LINE-1)	0.0 1e <sup>-28</sup>
	122E	1-278	262-898	TTTGGGAGGGGGTTCA	6	AL135908.13 (LINE-1)	0.0
<b>33 (1488)</b>	107E	68-179/282-393/ 566-586	1-73/171-288/ 285-572/ 579-686	TACACC/ CCCTCCCAA/ TACACCA/ ATCGAACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	8e <sup>-50</sup>
	162E	1-722/950-1168	714-949	AATCGAACC	14	AL049875.2 (LINE-1)	4e <sup>-113</sup>
	164E	167-411	1-174/412-784	TGACGGCC	14 11	AL583742.2 (LINE-1) M22405.1 (Mucin gene)	6e <sup>-78</sup> 5e <sup>-85</sup>
<b>34 (1491)</b>	166E	397-690	1-415	GGTTCGATTGGGGTTGGTG	X 1	AL732374.14 (LINE-1) AL359752.11 (Indeterminado)	7e <sup>-32</sup> 3e <sup>-163</sup>
	167E	1-294	283-421	CCCAATCGAACC	X 1	AL732374.14 (LINE-1) BK004196.1 (OR1-17 gene)	8e <sup>-35</sup> 6e <sup>-20</sup>
	168E	1-294	272-549	ATTACACCAACCCCAATCGAACC	5 X	AC106787.2 (Indeterminado) AL732374.14 (LINE-1)	3e <sup>-48</sup> 4e <sup>-52</sup>
	169E	1-294	277-859	ACCAACCCCAATCGAACC	14	AL591768.2 (LINE-1)	0.0
	170E	1-730	717-999	CCCAATCGAACC	1 X	BK004196.1 (OR1-17 gene) AL732374.14 (LINE-1)	1e <sup>-18</sup> 4e <sup>-54</sup>
	177E	1-722	708-848	AACCCCAATCGAACC	9	AL354711.24 (LINE-1)	3e <sup>-57</sup>
	178E	640-926	1-639/902-942	AACCCCAATTGAACC	1 9	AL138801.20 (LINE-1) AL354711.24 (LINE-1)	0.0 9e <sup>-58</sup>

	179E	434-819/1028-1174	1-451/801-1036	GGTTCGATTGGGGTTGG T/ TGGGAGCTGTAGACCGGAG/ GGTTCGATT	12 14	AC084364.20 (LINE-2 and Alu) AL049875.2 (LINE-1)	0.0 $2e^{-111}$
<b>36 (1493)</b>	564E	1-150/298-362	151-310	GGTTCGATTGGGG	1	AC119426.2 (LINE-1)	$1e^{-69}$
	565E	1-191	182-662	CAATCGAACC	13	AL136439.19 (POLR1D Gene)	0.0
<b>44 (1458)</b>	91	153-275	1-158/276-382	TGACCC	2 11	BN000002.1 (IL-1 receptor gene) AC139749.4 ( rpt_family="(TGG)n	$8e^{-67}$ $8e^{-16}$
	229E	759-913	1-766	ACACCAA	3	AC092185.3 (LINE-1)	0.0
	233E	512-655	1-518	GACCCCCCTCCCAA	3	AC090886.1 (LINE-1)	$1e^{-142}$
	234E	1-212	202-732	AGGGGGGGTCA	16	AC010543.9 (LINE-1)	0.0
	236E	207-386	1-220	TGAACCCCCCTCCC	10	EF444970.1 (LINE-1)	$1e^{-100}$
<b>46 (1459)</b>	99E	78-440	1-99	TGACCCCCCTCCCAAACCAT	4	AC095055.3 (LINE-1)	$4e^{-26}$
	237E	1-303/450-511	240-463	ACTCACAACCAACACCACCCTCCACACCCCC CACTCCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACC/ TAGTCTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	$1e^{-34}$
	239E	1-382	370-430	CCCCAATCGAACC	1	AC119426.2 (Indeterminado)	$8e^{-16}$
	240E	1-60/184-219	57-190/215-671	AACC/ ACACCAA/ AAACA	6	AL731683.12 (MTCO3 pseudogene)	0.0
	243E	241-315	1-258	TGAACCCCCCTCCAAAA	14	AC007955.4 (Indeterminado)	$3e^{-120}$
	245E	48-264/388-505/815-932	1-52/252-391/493-821/920-1061	TACACC/ CTCCCAAG ACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	$2e^{-53}$
<b>51 (1461)</b>	11E	1-294	291-452	AACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	$1e^{-32}$
	12E	1-278	275-344	CCCCA ATCGAACC	1	BK004196.1 (Gene OR1-17)	$3e^{-19}$
	13E	1-278	275-438	AACC	x	AL732374.14 (LINE-1)	$5e^{-31}$

	14E	1-283	280-321	AACC	12	AC120104 (LINE-1)	1e <sup>-04</sup>
	16E	1-387	373-465	CCCTCCCA AGACTAA	x	AL732374.14 (LINE-1)	3e <sup>-34</sup>
	22E	142-424	1-147	TGAACG	1	AL445426.20 (LINE-1)	1e <sup>-62</sup>
	23E	381-667	1-387	AAGTTGA	19	AC136499.2 (LINE-1)	2e <sup>-107</sup>
	24E	40-323	1-55	TGAC CCCCCCTCCCAA	1	AL359742.15 (ADPRT gene)	8e <sup>-14</sup>
<b>67 (1479)</b>	32E	220-479	1-230	GAAGCCCCCTC	15	AC068722.6 (LINE-1)	1e <sup>-108</sup>
	33E	297-574	1-315	GAAGCCCCCTCCCA AAACC	9	AL354704.17 (LINE-1)	7e <sup>-146</sup>
	34E	83-370	1-104	TGATGAAC GCCCCTCCCA AAAC	3	AC092059.2 (Indeterminado)	3e <sup>-32</sup>
	36E	389-665	1-394	GAACGC		AC027369.8 (LINE-1)	2e <sup>-85</sup>
<b>71 (1433)</b>	2E	1-277	250-386	TATATATTACACCAACCCCAA TCGAACC	5	AC106787.2 (Indeterminado)	6e <sup>-49</sup>
	4E	1-274	262-488	CCCCAATCG AACC	8	AC018608.9 (LINE-1)	5e <sup>-94</sup>
	6E	34-323	1-56	ACGGC CCCTCCCAA	17	AC027793.9 (LINE-1)	4e <sup>-04</sup>
	8E	266-552	1-283	ACGCTGACC CCCCCTCCC	4	AC110079.3 (LINE-1)	2e <sup>-137</sup>
<b>75 (1437)</b>	38E	55-119/242- 356/456-570	1-54/116- 246/345-461	AACC/ TACACC /CCCTCCCAAGAC	21	CR381572.5 (LINE-1)	3e <sup>-55</sup>
	39E	111-121/325- 355/629- 742/842-948	1-118/128- 332/335- 635/732-849	TACACCAA/ AACC CCAATCGAACC/ CCTCCCAAGAC	8	AC023533.6 (LINE-1)	6e <sup>-104</sup>
	218E	1-21/74- 191/244-361	16-88/186- 258/356-423	GGTGTA/ TTAGTCTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e <sup>-23</sup>
	219E	1-137	122-611	AACCCCAATCGAACC	14	AL137164.3 (LINE-1)	0.0
	223E	193-484	1-295	GACCGCCCCTCCC	1	AL513209.16 (LINE-1)	5e <sup>-82</sup>
	225E	642-926	1-653	TGAAGGCCCTC	4	AC079301.6 (LINE-1)	0.0
<b>81 (1441)</b>	47E	254-371/681- 798/1135- 1252	1-260/357- 687/784-1140	TACACCA/ CCCTCCC AAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e <sup>-57</sup>

	48E	22-139/405-522/575-691	1-27/125-410/508-580/687-1441	TACACC/ CCCTCC CAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e <sup>-58</sup>
	133E	1-414	403-783	CCCTCCCA AGAC	X	AL732374.14 (LINE-1)	6e <sup>-52</sup>
	134E	1-603	600-755	AACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e <sup>-32</sup>
	135E	1-263/371-402	252-370/384-531	CCCAATCGAACC/ CACCAACCCCAATCGAACC	7 12	AC012596.4 (LINE-1) AC084364.20 (LINE-2)	1e <sup>-45</sup> 3e <sup>-41</sup>
	136E	1-324/1261-1333	309-1275	CAACCCCAATCGAACC/ TTCGATTGGGGTTGG	5 12	AC108104.2 (LINE-1) AC084364.20 (Alu)	0.0 7e <sup>-44</sup>
	140E	414-733	1-422	GAACCCCCC	5	AC091858.2 (Indeterminado)	0.0
<b>85 (1434)</b>	33E	1-380	366-671	CCCTCCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e <sup>-59</sup>
	34E	1-378/475-484/517-627/703-803	364-481/483-523/620-708	CCCTCCCAAGACTAA/ TGAGTACACCA/ CCCAATCGAACC/ CTCTCCCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	9e <sup>-44</sup>
	205E	1-286/727-911	287-726	Non identified	4	AC129664.7 (LINE-1)	0.0
	209E	1-73	71-247	GGGAGGGGGG GTC		AC019278.6 (LINE-1)	1e <sup>-74</sup>
	210E	177-258	1-189	GACGCCCCCTCCC	2	AC007179.3 (LINE-1)	8e <sup>-70</sup>
	211E	1-82	70-642	GGGAGGGGCCGTC	20	AL138805.8 (CYP24A1 gene)	0.0
	212E	1-387/447-557/589-609/803-823	379-451/551-597/606-809/820-924	CCCTCCCAA/TACACC TACACCAAC/ AACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	7e <sup>-78</sup>
	214E	540-637	1-542	GA	Y	AC010682.3 (LINE-1)	0.0
	216E	159-502	1-175	GA CCCCCCTCC CAAAA	14	AL049776.3 (LINE-1)	1e <sup>-71</sup>