



Universidade de Brasília-UnB
Faculdade de Medicina
Pós- graduação em Patologia Molecular
Laboratório Interdisciplinar de Biociências



Aline Silva Moraes

**DINÂMICA DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE KDNA DE
TRYPANOSOMA CRUZI NO GENOMA HOSPEDEIRO**

Orientadora: Mariana Machado Hecht

Brasília DF,
2016

Aline Silva Moraes

**DINÂMICA DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE KDNA DE
TRYPANOSOMA CRUZI NO GENOMA HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau Mestre em Patologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília. Orientadora: Mariana Machado Hecht.

Brasília – DF

2016

Aprovada em 24 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariana Machado Hecht (presidente)

Universidade de Brasília – UnB.

Dr. José Raimundo Correa

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Alessandro Oliveira de Sousa

Faculdade Estásio de Sá

Dra. Flávia Nader Motta Arenas (suplente)

Universidade de Brasília - UnB

Este trabalho foi realizado no Laboratório interdisciplinar de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq / CAPES.

Chagas

*Mera coincidência
a prova da realidade
com a ciência*

*A hipótese é a autoimunidade
que hipertrofia o coração do chagásico
Por mecanismos de bystander?
Ou será por fatores correlacionados?*

*Que por entre saltadores de TTAA
No LINE1 se integra o kDNA
Pode ser que gere mutação
mudanças a nível de metilação?*

*Mecanismos de proteção não tangem
É como o câncer?
Chagas, porém, continua incógnita
E eu, exausta, delirando de cólica.*

A.S.M

AGRADECIMENTOS

“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito.”

Aristóteles

Primeiramente, quero agradecer a Deus, o autor e consumidor da minha fé, pelo favor inmerecido, pela vida, e por todas as oportunidades que me proporciona todos os dias.

Aos meus queridos pais, Jaime Santos e Claudia Maria, pelo apoio, ombro amigo, pelas parceiras e conselhos, pelos financiamentos, em fim, por tudo o que vivenciamos até aqui.

As minhas queridas irmãs, Jaqueline S. Moraes e Daniele S. M. Miranda pela amizade, cumplicidade, por ouvir as queixas e amparar minhas lágrimas.

Aos meus lindos sobrinhos, Átila Henrique MM e Bianca MM, e ao meu cunhado Carlos Miranda por existirem e tornarem a minha vida mais alegre.

Ao trio Mari, Nad e Lou, essa parceria incrível que vocês têm que se completam e que abre as portas para muitos que acreditam e querem investir na educação continuada.

À minha querida orientadora Mariana Hecht por ser essa orientadora inigualável, pelo apoio desde a gênese deste projeto à conclusão. Por acreditar e investir, pela oportunidade cedida, pela amizade e compreensão e por toda dedicação e paciência. Em fim, palavras jamais descreverão a imensa gratidão que sinto.

À minha co-orientadora de consideração Luciana Hangström por ser sempre presente, pela dedicação e disposição que contribuíram e muito, principalmente nos momentos mais decisivos e críticos desse trabalho.

À professora Nadjar Nitz pela indicação, pelas experiências compartilhadas que auxiliaram no desenvolvimento deste estudo. E acima de tudo, pela sua postura profissional e carisma que a faz ser referencial para muitos de nós estudantes.

Ao professor Milton Mattos pelo auxílio na análise estatística e pela disposição.

À Thaís Minuzzi pela amizade e toda a ajuda investida que contribuíram para meu ingresso no laboratório. Agradeço também por compartilhar o conhecimento e pelas contribuições que acrescentaram para a finalização deste trabalho.

À querida amiga professora Daniella Alves pela amizade e incentivo.

À querida Ana de Cássia, pelas dicas indispensáveis e ensinamentos. À Isabella pelo apoio, amizade e ensinamentos e à Eliete por sempre contribuir e ajudar.

Aos meus queridos amigos do LAPMOL Tamires Vital, Marcelle Ribeiro, Camilla Santana, Ana Marques, Búzios, Ester, Bruna Carvalho, Bruna Ferreira, André, Marol, Herick, Adriano, Vitória, Enildo, em fim, a tantos outros pelo carinho, amizade, parceria e cooperação. À Luíza, meu braço direito nos momentos críticos e decisivos. Todos foram muito importantes em todas as etapas deste trabalho.

À professora Yanna Karla por se dispor em apoiar este trabalho, pelos conselhos, pela companhia e a todos do LABDC pela parceria e amizade.

Aos meus familiares: tios e tias, primos e primas por fazerem parte da minha vida e pelo apoio imprescindível.

À família AD El Shadai pelo apoio, tolerância e principalmente pelas orações, que foram fundamentais em toda caminhada. E aos amigos que acompanharam de perto minha saga, em especial à Cristiane, Lorena, Ana Priscila, Manuela, Daniela Almeida, Thaís, Sabrina, Bruno, Bryan e ELOAR, muito obrigada por tolerarem as ausências, pelos conselhos, amizade e incentivo e pelas orações. E ao amigo Gabriel Barreto pelo apoio gráfico.

À equipe DPR, em especial a minha chefe, Luciana Couto, por compreender, apoiar e incentivar à conclusão deste projeto. E aos meus colegas, Isabella Ferraz por todos os conselhos e consolos; Jossane, Newton e Júlia pela amizade e alegrias compartilhadas. Ao professor César Tibúrcio por apoiar e incentivar os servidores à educação continuada.

Resumo

A doença de Chagas é considerada uma das principais endemias da América Latina, existindo cerca de oito milhões de pessoas infectadas com o *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina. A associação entre a transferência gênica lateral de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma hospedeiro e o surgimento de manifestações clínicas da doença de Chagas está descrita na literatura. Entretanto os mecanismos que levariam ao desenvolvimento das reações autoimunes ainda precisam ser elucidados. No presente estudo, desenvolveu-se um protocolo de PCR quantitativa (qPCR) que permitiu a quantificação das integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro, confirmando, dessa forma, a transferência dos minicírculos ao genoma de célula hospedeira. Verificou-se que há um acúmulo das integrações ao longo do tempo em células J774.A1. À medida que ocorre a inserção dos minicírculos de kDNA no genoma hospedeiro, observa-se alteração da temperatura de dissociação das amostras, indicando mudança na composição ou no tamanho dos fragmentos integrados. De fato, a clonagem e o sequenciamento dos *amplicons* demonstrou o truncamento da região variável do kDNA. O Benznidazol é capaz de eliminar a infecção, porém não previne a integração e o acúmulo das sequências de kDNA. Já o AZT, droga inibidora de retrotransposição, mostra-se efetivo no controle dos eventos de integração. Os experimentos *in vivo* corroboraram os achados *in vitro*, demonstrando uma maior quantidade de integrações em animais que se encontravam na fase crônica da doença de Chagas. Outros estudos são necessários para determinar o papel do acúmulo de integrações de kDNA e a severidade das manifestações clínicas. Entretanto, o real significado de tais mutações não fica restrito à doença de Chagas, mas, sim, estende-se ao longo do processo da evolução, em que a aquisição de DNA exógeno ajudaria a impulsionar um fluxo genético introdutor de complexidade crescente às espécies.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; kDNA; integração; PCR quantitativa.

Abstract

Chagas' disease is considered a major endemic disease in Latin America, and there are approximately eight million people infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide, especially in Latin America. The association between lateral gene transfer of *T. cruzi* kDNA minicircle into host genome and the onset of clinical manifestations of Chagas disease is described in the literature. However, the mechanisms that lead to autoimmune reactions are to need to be elucidated. In the present study, we have developed a protocol quantitative PCR (qPCR), which permitted quantitation of kDNA minicircle integrations *T. cruzi* into the host genome, confirming thus the transfer of the minicircle into the genome of the host J774.A1 cells. It was found that there is an accumulation of integrations over time J774.A1 cells. As kDNA insertions occur, there is change in melting curve, indicating change in composition or size of the integrated fragments. In fact, cloning and sequencing of amplicons showed loss of nucleotides in kDNA variable region. Benznidazole is able to eliminate the infection, but does not prevent the integration and accumulation of kDNA sequences. AZT, an inhibitory drug for retro transposition, shows to be effective in controlling integration events. *In vivo* experiments confirmed *in vitro* findings, showing a greater amount of integrations in animals that were in the chronic phase of Chagas disease. Further studies are needed to determine the role of kDNA accumulation in severity of clinical manifestations. However, the real significance of such date is not restricted to Chagas disease, but rather extends throughout the evolutionary process, where the acquisition of exogenous DNA would help boost a genetic flow introducing higher complexity to species.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; kDNA; integration; quantitative PCR.

LISTA DE FIGURA

Figura 1.	Distribuição global da doença de Chagas.	2
Figura 2.	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
Figura 3.	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	7
Figura 4.	Características do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	9
Figura 5.	Integração de kDNA no genoma de células de camundongos e macrófagos humanos U937 infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> .	13
Figura 6.	Estrutura de retroelementos.	15
Figura 7.	Mecanismos de Integração de LINE.	16
Figura 8.	Grupos experimentais utilizados no estudo.	27
Figura 9.	Curva padrão a partir de diferentes concentrações de nDNA e kDNA.	33
Figura 10.	Distribuição da razão kDNA/nDNA em <i>pools</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	34
Figura 11.	Aumento da razão kDNA/nDNA ao longo do tempo.	35
Figura 12.	Viabilidade das células J774.A1 frente a diferentes concentrações de Benznidazol pelo teste de Vermelho Neutro.	36
Figura 13.	Viabilidade das células J774.A1 frente a diferentes concentrações de Zidovudina pelo teste de Vermelho Neutro.	37
Figura 14.	Tratamento com Benznidazol não impede as integrações de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma da célula hospedeira.	38
Figura 15.	AZT inibe as integrações de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma da célula hospedeira.	40
Figura 16.	Análise do padrão da curva de amplificação.	41
Figura 17.	Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de nDNA.	41
Figura 18.	Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de kDNA.	42
Figura 19.	Padrão de bandas referentes aos produtos de PCR resultantes da amplificação com iniciadores de kDNA e nDNA.	43
Figura 20.	Sequências obtidas de células J774.A1.A1.A infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com Benznidazol.	44
Figura 21.	Razão kDNA/nDNA de sangue de camundongos nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas.	45

Figura 22.	Razão kDNA/nDNA de tecido em camundongos nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas.	46
Figura 23.	Padrão da curva de dissociação da qPCR com iniciadores de kDNA de amostras de sangue e tecido de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i>.	47
Figura 24.	Modelo de integração de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma do hospedeiro.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AGDs	Agrupamento de genes direcionais
AZT	Zidovuldina
CN	Controle negativo
CP	Controle Positivo
CQ	<i>Quantification Cycle</i>
DMEM	Meio modificado por Dulbecco Modificado
dpi	Dias pós-infecção
ELISA	Ensaio de Imunossolvente Ligado a Enzima
Endo-siRNA	<i>endogenous small interfering RNA</i> - pequenos fragmentos endógenos de RNA de interferência.
fg	Fentogramas
G	Guanina
gRNA	RNA guia
kb	Quilobase
kDNA	DNA do cinetoplasto
L1	LINE 1
LINE	<i>Long interspersed element</i> - elemento entrepassado longo
LTR	<i>Long terminal repeats</i> - longas repetições terminais
MS	Ministério da Saúde
Mbp	Megabases
mtDNA	DNA mitocondrial
mRNA	RNA mensageiro
nDNA	DNA nuclear
ORF	<i>Open reading frame</i> - fase de leitura aberta
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação de polimerização em cadeia
qPCR	PCR quantitativa
SSRs	<i>Strand switch regions</i>
SINE	<i>Short interspersed element</i> - elemento entrepassado curto
T	Timina
tpTAIL	<i>Target-primer Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i>

UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
WHO	<i>World Health Organization</i>
SFB	Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doença de Chagas	1
1.2	Formas de Transmissão	2
1.3	Sinais e Sintomas.....	3
1.4	Diagnóstico.....	4
1.5	Tratamento	5
1.6	<i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.6.1	Ciclo de vida.....	6
1.6.2	Composição Genética.....	8
1.6.2.1	DNA nuclear (nDNA)	8
1.6.2.2	DNA mitocondrial (kDNA).....	8
1.7	Teorias da patogênese da doença de Chagas	10
1.8	Teoria da Integração dos minicírculos de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.9	Retroelementos	14
1.9.1	Categorias e funcionamento	14
1.9.2	Doenças causadas por retroelementos	17
1.9.3	Retroelementos e Transferência Gênica	18
II.	JUSTIFICATIVA.....	20
III.	OBJETIVO.....	21
3.1	Objetivo Geral	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
IV.	METODOLOGIA	22
4.1	Cultura de Células e Parasitos	22
4.1.1	Manutenção de fibroblasto L6.....	22
4.1.2	Manutenção de células J774.A1	22
4.1.3	Cultura de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
4.1.4	Obtenção e manutenção das forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
4.2	Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
4.2.1	Infecção de células J774.A1	23
4.2.2	Infecção de camundongos BALB/c.....	24
4.3	Tratamento <i>in vitro</i>	24
4.3.1	Avaliação de citotoxicidade	24
4.3.2	Tratamento com Benznidazol.....	25
4.3.3	Tratamento com Zidovudina	25
4.4	Coleta das amostras e extração de DNA	26
4.4.1	Extração de DNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26

4.4.2	Amostras de células e amostras de camundongos	26
4.4.3	Quantificação e análise do DNA extraído	27
4.5	PCR quantitativa (qPCR)	28
4.5.1	Padronização da qPCR	28
4.6	Purificação de DNA em gel de agarose	30
4.7	Sequenciamento direto dos produtos de PCR	31
4.8	Análise estatística	31
V.	RESULTADOS	33
5.1	Determinação da razão kDNA/ nDNA em pools de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
5.2	Acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma da célula hospedeira ao longo do tempo.....	34
5.3	Influência de drogas tripanocida e anti-retroviral no acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
5.3.1	Teste de Citotoxicidade	35
5.3.2	Benznidazol.....	36
5.3.3	Zidovudina (AZT)	38
5.4	Análise do perfil da curva de dissociação após integração do kDNA no genoma da célula hospedeira.	39
5.5	Caracterização dos produtos de PCR formados durante a qPCR com iniciadores para kDNA	42
5.6	Avaliação das integrações de kDNA <i>in vivo</i>	44
VI.	DISCUSSÃO.....	48
6.1	Variabilidade genética entre cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e sua importância para a determinação da razão kDNA/nDNA.....	48
6.2	Acúmulo de sequências de minicírculos de kDNA no genoma hospedeiro	48
6.3	A integração de minicírculos de kDNA é mediada por retroelementos	50
6.4	Alteração do perfil de integrações de minicírculos de kDNA ao longo do tempo	51
6.5	Possíveis impactos do acúmulo de sequências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma hospedeiro.....	53
VII.	CONCLUSÕES.....	55
VIII.	PERSPECTIVAS	56
IX.	REFERÊNCIAS	57

I. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, conhecida por tripanossomíase americana, foi descrita pela primeira vez pelo doutor Carlos Chagas em 1909 que também descreveu seu agente etiológico, o parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). A primeira infecção natural de um mamífero com *T. cruzi* foi registrada por Carlos Chagas em um gato. Logo depois foi descoberto o parasito no sangue de uma criança, bem como em outras pessoas que viviam em casas infestadas com triatomíneos em Lassance, Minas Gerais (DIAS *et al.*, 2012).

Estima-se que cerca de oito milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10 mil mortes por ano. Inicialmente restrita a países latino-americanos, a doença de Chagas tem sido cada vez mais encontrada nos Estados Unidos da América, Canadá, na Europa e em países do Pacífico Ocidental, devido à movimentação populacional da América Latina para resto do mundo, e vice-versa, nas últimas décadas, (WHO, 2015) (Figura 1). Calcula-se que mais de 300 mil pessoas infectadas com *T. cruzi* vivam atualmente nos Estados Unidos (CDC, 2013). Na Europa, em 2011, foram estimados 59 mil a 108 mil casos da doença, sendo a Espanha e a Itália entre outros países com os maiores índices de infecção (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

No Brasil, a região Norte apresenta a maior incidência da doença, detectando-se surtos relacionados à ingestão de frutos contaminados por *T. cruzi* (BRASIL, 2015). Entre os casos confirmados em estados do Norte durante o período de 2000 a 2013, a transmissão oral foi a mais frequente. Apesar de a transmissão vetorial ter ocorrido em menor proporção, foi observada a persistência desta rota mesmo depois de 2006, ano da certificação de interrupção de transmissão por *Triatoma infestans* no país (BRASIL, 2015). Ao todo, foram contabilizados 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo, em sua totalidade, 35 municípios da região Amazônica. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos como o açaí, a bacaba, o jaci (coquinho), o suco de caldo de cana e o palmito de babaçu contaminados com *T. cruzi*. A maioria dos surtos ocorreu no Pará, Amapá e, em menores proporções, nos estados do Amazonas, Tocantins e Bahia (BRASIL, 2015).

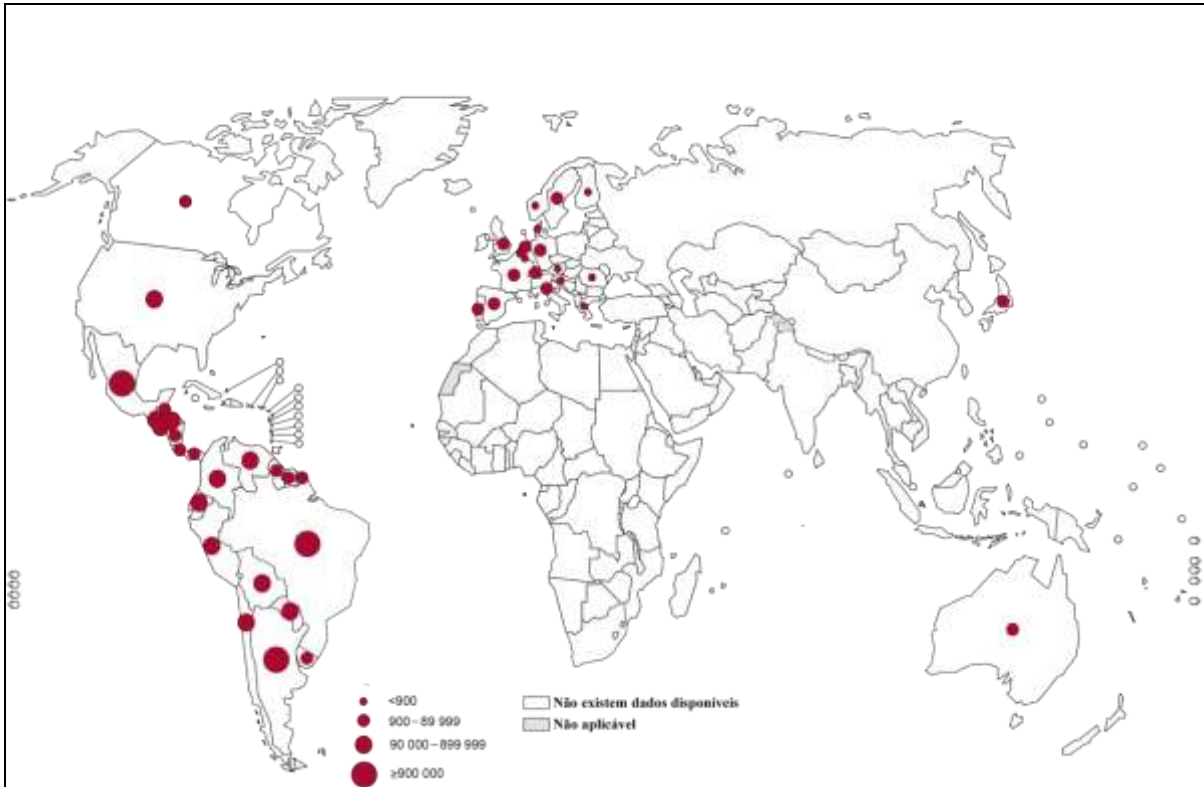


Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas 2006 – 2010 (Adaptado de WHO, 2013).

1.2 Formas de Transmissão

A principal forma de transmissão da doença de Chagas é a vetorial. Ela ocorre, principalmente, em áreas endêmicas, por meio de hematófagos do filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, através da aquisição do parasito em fezes ou urina infectadas do vetor durante o repasto sanguíneo. Embora tenham sido identificadas cerca de 150 espécies de triatomíneos, poucos são vetores do *T. cruzi* (ABAD-FRANCH E MONTEIRO, 2005; BERN, 2015). Os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos países do Pacto Andino e partes da América Central, e *Triatoma dimidiata* e *Triatoma barberi* no México. Em áreas não endêmicas, as vias de infecção como transfusão sanguínea, transplante de órgãos e medula óssea, transmissão congênita e oral, constituem as principais formas de aquisição do parasito (GARCIA *et al.*, 2007; RASSI Jr; RASSI; de REZENDE, 2012; COURA, 2014). Outras formas de infecção, em menor frequência, podem ocorrer através de acidentes de laboratório, manejo de animais infectados e aleitamento materno (ROTTA; SIQUEIRA; PEDROSO, 2013). Recentemente, em estudos realizados em murinos por da Silva (2013) e Ribeiro *et al.*

(2016), foi observada a transmissão sexual, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença.

1.3 Sinais e Sintomas

Os sintomas e a severidade da doença de Chagas variam e o curso da infecção é diferente em cada indivíduo, depende da quantidade de parasitos, da cepa, da idade da pessoa infectada, entre outros (CDC, 2013). Didaticamente, dividem-se as manifestações clínicas em duas fases: aguda e crônica (formas indeterminada e sintomática). A infecção aguda dá-se, geralmente, de maneira despercebida e os sintomas são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico. As manifestações podem incluir febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Raramente se pode observar nódulo cutâneo (chagoma) ou edema palpebral indolor (sinal de Romana). Os sintomas costumam desaparecer dentro de algumas semanas ou meses; porém, ainda que tratada, a infecção pode persistir. O período de incubação após a transmissão por vetores é de uma a duas semanas, sendo a principal característica da fase aguda a alta parasitemia, apesar de a maioria das infecções agudas não ser diagnosticada (TEIXEIRA *et al.*, 2011a; BERN, 2015).

Em pessoas que sobrevivem à fase aguda, as células do sistema imune controlam a replicação do parasito, resultando na redução da parasitemia, de quatro a oito semanas após a infecção, e no desaparecimento espontâneo dos sintomas. Nos seres humanos, aproximadamente 30% dos infectados desenvolve a fase crônica sintomática. Desta forma, a maioria das pessoas apresenta a forma assintomática e apesar da ausência dos sintomas, esses indivíduos permanecem infectados durante toda a vida. A fase indeterminada é caracterizada pela sorologia anti-*T. cruzi* positiva, sem anormalidades nos exames físicos, radiológicos e eletrocardiograma (BERN *et al.*, 2011, NUNES *et. al*, 2013)

A fase crônica sintomática, por sua vez, é caracterizada pelo desenvolvimento de manifestações características da doença de Chagas, a “síndrome dos megas” (megacárdio, megacólon e megaesôfago). Estima-se que 94,5% dos infectados sintomáticos progridam para a cardiomiopatia chagásica. Esta é a manifestação mais grave, pois 38% dos doentes morrem subitamente e 56% desenvolvem insuficiência cardíaca (TEIXEIRA *et. al*, 2011b). A cardiomiopatia chagásica é caracterizada pela miocardite crônica, que envolve todas as câmaras cardíacas, e danos ao sistema de condução. A miocardite causa instabilidade elétrica (fibrilação arritmica) e contratilidade reduzida (trombose intracavitária e insuficiência cardíaca). Distúrbios microvasculares (aneurisma de ponta) podem resultar em morte súbita.

Alterações no sistema nervoso intracardíaco podem causar dor torácica atípica e também morte súbita (NUNES *et al.*, 2013; PEREIRA & NAVARRO, 2013).

A doença na forma gastrointestinal, por sua vez, ocorre em menor frequência, de 5 a 7% dos doentes crônicos sintomáticos, e afeta normalmente esôfago, colón ou ambos, com danos aos neurônios intramurais. As manifestações da doença esofágica abrangem desde distúrbios da motilidade assintomática e acalasia leve (espasmo esofágico difuso) até megaesôfago grave, com sintomas que incluem disfagia (dificuldade de deglutição), odinofagia (deglutição dolorosa), refluxo esofágico, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação. O megacólon é caracterizado pela constipação prolongada e pode dar origem a fecaloma (endurecimento das fezes em pedras de tamanho variado no interior do cólon), vólvulos (má rotação em que a alça do intestino é torcida sobre um ponto focal ao longo do mesentério ligado ao trato intestinal, o que pode resultar na obstrução do intestino) e isquemia do intestino. (CDC, 2013; BERN, 2015).

1.4 Diagnóstico

Na fase aguda, o diagnóstico preferencial é dado pela detecção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no exame microscópico com amostra de sangue fresca ou creme leucocitário (CDC, 2013). Os parasitos podem ser visualizados em esfregaço de sangue corado com Giemsa e na hemocultura. Na fase crônica da doença, o diagnóstico consiste prioritariamente na detecção de anticorpos IgG, mais comumente pelo *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) e pelo Ensaio de Imunofluorescência (BERN, 2015).

Técnicas de biologia moleculares são ferramentas importantes para investigação da doença. A PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma técnica muito sensível, sendo o melhor teste para determinação precoce da infecção. A sensibilidade da PCR na fase crônica da doença de Chagas é variável e depende do volume e processamento da amostra, características populacionais, iniciadores (*primers*) específicos e metodologias utilizadas. Resultados negativos não comprovam a ausência da infecção (BERN, 2015; SCHIJMAN *et al.*, 2015).

A PCR em tempo real (qPCR) tem se mostrado sensível e específica para diagnósticos da doença de Chagas (MOREIRA *et al.*, 2013). A técnica vem sendo desenvolvida para determinação da carga parasitaria em pacientes chagásicos agudos e crônicos. Um estudo internacional visando estabelecer procedimentos operacionais padrão

para a quantificação de carga parasitária para diferentes DTUs (*discrete typing units*) de *T. cruzi* verificou maior carga parasitária em amostras de pacientes agudos comparados aos crônicos (RAMÍREZ *et al.*, 2015). Igualmente, as técnicas de qPCR mostraram-se muito úteis para identificação de *T. cruzi* nos casos em que os parasitos não foram detectados pelos métodos sorológicos (DUFFY *et al.*, 2013; BERN, 2015).

1.5 Tratamento

Atualmente, apenas duas drogas estão disponíveis contra a infecção por *T. cruzi*: o Benznidazol e o Nifurtimox (WHO, 2015). Ambos apresentam boa eficácia quando utilizados durante a fase aguda da doença, porém seus efeitos diminuem quando administrado na fase crônica, não evitando a progressão das manifestações clínicas da doença de Chagas (BONNEY, 2014; MORILLO *et al.*, 2015). As duas drogas agem por formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. No Brasil, entretanto, apenas o Benznidazol está disponível. O Ministério da Saúde (MS) recomenda o uso de 5 mg//Kg/dia (adultos) e 5 a 10 mg/Kg/dia (crianças), divididos em 2 a 3 doses diárias, durante 60 dias, sendo contra indicado para gestantes. A terapia prolongada (aproximadamente 60 dias) causa inúmeros efeitos colaterais, que vão desde reações de hipersensibilidade à depressão da medula óssea e à polineuropatia periférica, o que leva à interrupção do tratamento em muitos casos (RIBEIRO, 2013).

Outros compostos vêm sendo testados para o tratamento da doença de Chagas. O Posaconazol, por exemplo, é um deles. Estudo com este fármaco tem mostrado resultados promissores no tratamento de doentes em fase aguda e fase crônica. Esta droga foi desenvolvida para a eliminação de formas amastigotas das células cardíacas (PEREIRA & NAVARRO, 2013).

1.6 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Possui um ciclo complexo, com três formas evolutivas. Nos mamíferos são encontradas as formas tripomastigota (infectiva) e amastigota intracelular (multiplicativa). No triatomíneo é encontrada a forma epimastigota (multiplicativa) e a forma tripomastigora metacíclica (forma infectante para o

hospedeiro vertebrado) (TEIXEIRA *et al.*, 2006). É caracterizado pela presença de flagelo e mitocôndria tubular única, onde se encontra o cinetoplasto, uma estrutura discoide que possui uma rede de DNA, conhecido como kDNA (Figura 2).

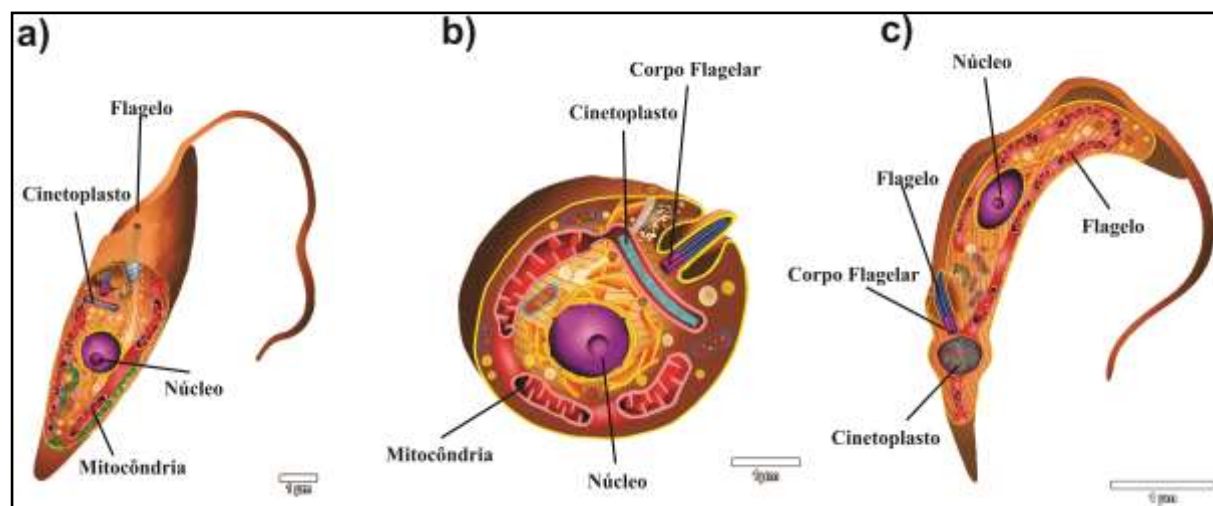


Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (a) Epimastigota. Forma multiplicativa no inseto. (b) Amastigota. Forma de divisão celular no hospedeiro vertebrado. (c) Tripomastigota (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2012).

1.6.1 Ciclo de vida

Em suma, o ciclo biológico do parasito se inicia quando formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo inseto no momento do repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Uma vez ingeridos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas. Esses epimastigotas migram para o intestino, onde se dividem intensamente e se aderem à membrana perimicrovilar, secretadas pelas células do intestino médio posterior. Esta etapa de adesão é essencial para desencadear o processo de transformação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos na parte final do intestino, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010). A infecção nos mamíferos ocorre quando formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes do vetor, logo após a hematofagia. A entrada dessas formas ocorre através das mucosas ou pelas lesões pré-existentes ou provocadas no momento da picada. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitos invadem as células retículo endoteliais locais e do tecido conjuntivo, se diferenciam em amastigotas e começam a se multiplicar por divisão binária. Então, quando as células estão abarrotadas de amastigotas, os protozoários se diferenciam em tripomastigotas. Os

tripomastigotas lisam as células, invadem tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e pela corrente sanguínea, migrando outros locais. O ciclo se reinicia quando formas sanguíneas são ingeridas pelo vetor (RASSI JR; RASSI; de REZENDE, 2012) (Figura 3).

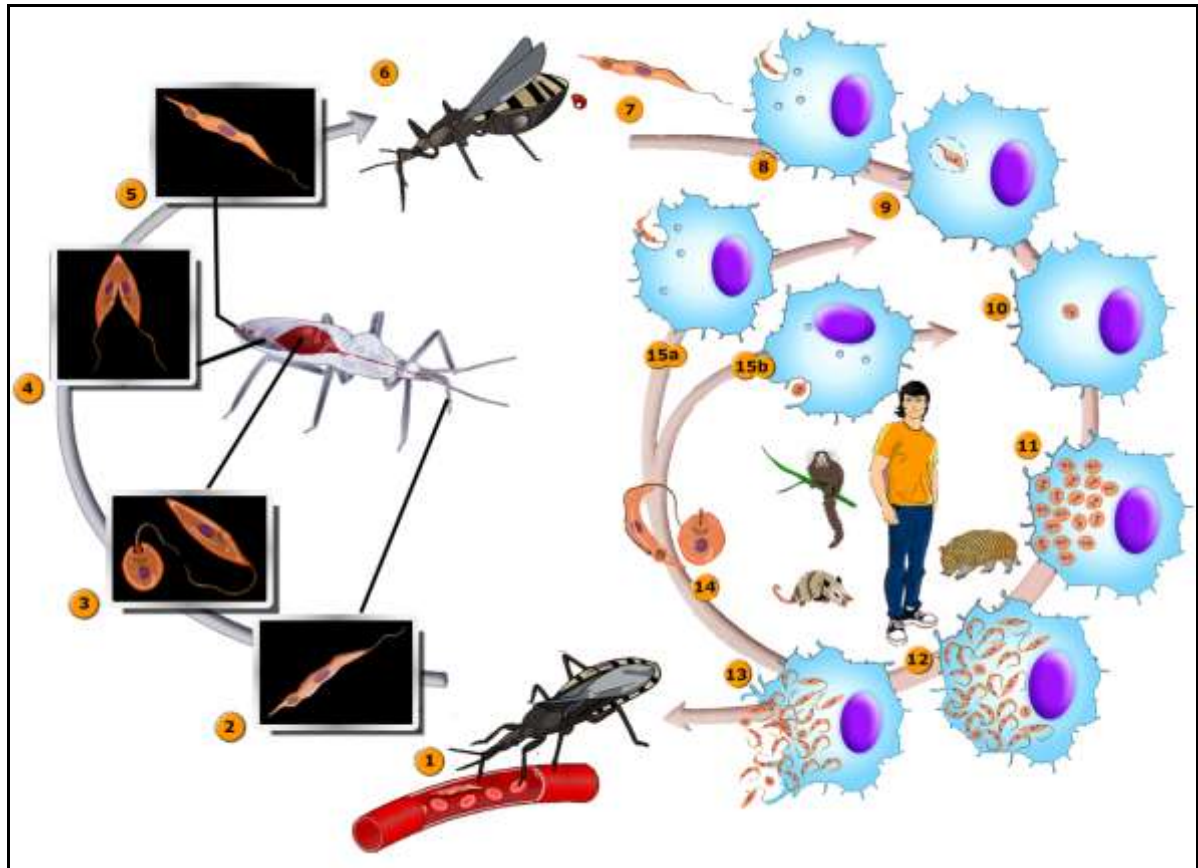


Figura 3. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (1) O triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas, (2) que são conduzidas à porção anterior do estômago. (3) Os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e esferomastigotas. (4) As formas epimastigotas multiplicam-se por divisão binária no intestino. (5) Os epimastigotas se movem para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. (6) O vetor infectado libera, sobre a pele do hospedeiro vertebrado, fezes e urina contaminada (7) com as formas tripomastigotas metacíclicas. (8) Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea e invadem diversos tipos celulares, por exemplo, macrófagos. (9) Quando a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, forma-se o vacúolo parasitóforo. (10) A forma tripomastigota se diferencia em forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo. (11) No citoplasma, esta forma se multiplica por divisões binárias. (12) Os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota. (13) As células se rompem e liberando o parasito na corrente sanguínea. (14) O rompimento pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas. Tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) podem infectar novas células (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2012).

1.6.2 Composição Genética

1.6.2.1 DNA nuclear (nDNA)

O genoma haplóide do *T. cruzi* possui um tamanho de 60,3 Mbp e a concentração de DNA total varia de 125 a 280 fg/células (EL-SAYED *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Essas diferenças gerais são explicadas pelo número relativo de cromossomos e alterações de tamanho devido a inserções e deleções, duplicações, ou pelos conteúdos de células haplóides, diplóides ou aneuplóides durante o processo de crescimento (FRÁNZEN *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2011a). Genes codificadores de proteínas são organizados em agrupamentos de genes direcionais (AGDs) semelhantes à organização de *operons* bacterianos. Os AGDs adjacentes são geralmente encontrados em cadeias opostas do DNA, um na direção divergente e outro na convergente. A ordem dos genes em um cromossomo em particular é conservada em blocos grandes e as regiões entre os AGDs, nomeadas de *strand switch regions* (SSRs), que podem representar ilhas de iniciação da transcrição e terminação. Os SSR ricos em CG dos cromossomos 1 e 3 compreendem retroelementos degenerados denominados de LITc e VIPER/SIRE, e as regiões ricas em GC, clivadas por etoposídeo/topoisomerase II, suportam um centrômero com a função associada à origem de replicação do DNA. Os SSRs são promotores da transcrição de genes. Ao todo, o genoma de *T. cruzi* codifica aproximadamente 22.570 proteínas distintas, incluindo 12.570 pares alélicos (ARNER *et al.*, 2007). A observação de que 18% dos genes codificantes de proteínas podem estar presentes em 14 cópias sugere que o número de proteínas variantes poderá ser superior a 20.000. Através da análise de gel bidimensional e espectrometria de massa, foram identificadas 2.784 proteínas, aproximadamente 10% do proteoma (ATWOOD *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2011b).

1.6.2.2 DNA mitocondrial (kDNA)

O *T. cruzi* possui uma mitocôndria única que percorre todo o parasito. Essa mitocôndria contém em sua região anterior o cinetoplasto. O cinetoplasto lamelar do *T. cruzi* é uma estrutura discoide, localizado dentro da matriz mitocondrial, perto do corpo basal, ao qual está ligado fisicamente por um conjunto de filamentos, formando uma estrutura semelhante a uma rede. Esta conexão é crucial durante a segregação do genoma mitocondrial do parasito (SIMPSON, 1973; TEIXEIRA *et al.*, 2011b) (Figura 4). É composto por uma

grande quantidade de DNA extranuclear também conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA).

O kDNA, corresponde de 15% a 30% do DNA total do parasito, e difere do componente nuclear por densidade de flutuação, relação de base, e o grau de renaturação. É semelhante a uma rede composta por anéis concatenados com algumas dezenas de maxicírculos (20 a 40 kb) e 15000 minicírculos (1,4 kb). (SIMPSON, 1973; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). O minicírculo é composto por quatro regiões conservadas e quatro regiões variáveis intercaladas. As regiões conservadas são ricas em CA (CSBs, do inglês *conserved sequence blocks*). Essas regiões são consideradas locais específicos para a replicação, transcrição e recombinação, bem como pontos de transferência lateral de seqüências kDNA para o núcleo da célula hospedeira (RAY, 1989; HECHT *et al.*, 2010).

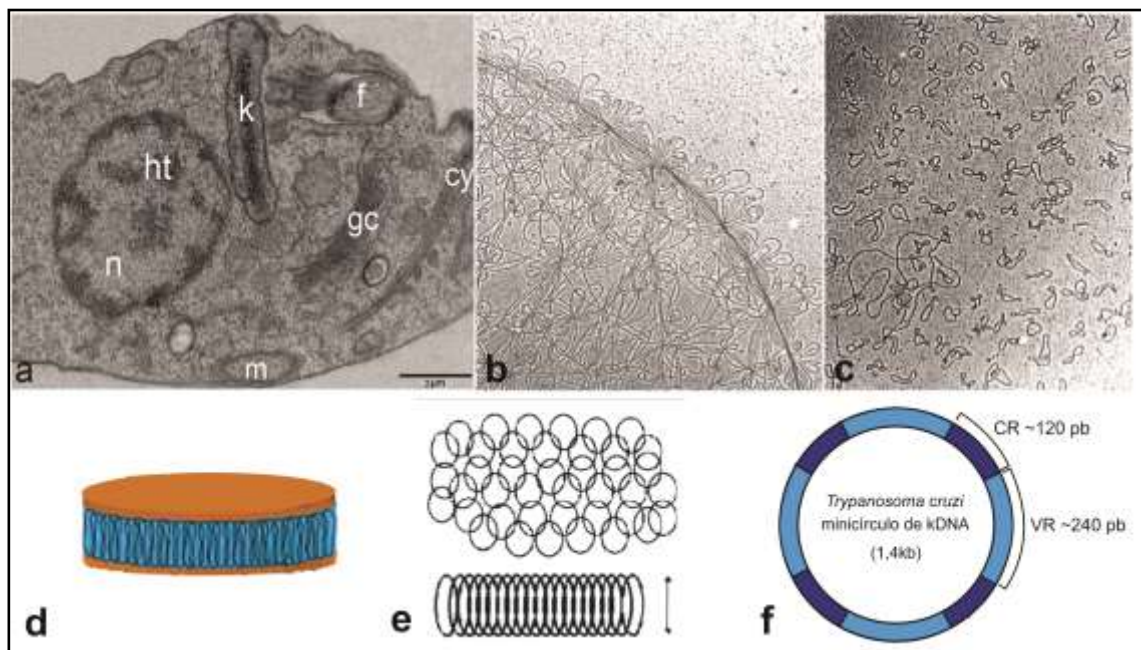


Figura 4. Características do kDNA de *Trypanosoma cruzi*. (a) Microscopia de transmissão eletrônica de epimastigota *T. cruzi*, mostrando núcleo (n), heterocromatina (ht), mitocôndria (m) cinetoplasto (k), complexo de Golgi (gc), flagelo (f) e citóstomo (cy). (b) Microscopia eletrônica de kDNA de *Crithidia fasciculata*. Rede intacta do kDNA. Minicírculos e maxicírculos (c) Rede de kDNA decatenada pela Topoisomerase II, evidenciando minicírculos e maxicírculos individuais. (d) Representação do disco de kDNA de *Crithidia fasciculata*. (e) Esquema com segmento da rede de kDNA de *C. fasciculata* mostrando minicírculos topologicamente ligados em três unidades. Abaixo, representação de segmento do disco do cinetoplasto mostrando que cada minicírculo, *in vivo*, situa-se perpendicularmente ao plano. (f) Estrutura do minicírculo de kDNA do *T. cruzi*. CR: Regiões conservadas; VR: regiões variáveis. (adaptado de LIU *et al.*, 2005; GUIMARO *et al.*, 2014; ZUMA *et al.*, 2015;)

O minicírculo codifica o RNA guia (gRNA), pequenas moléculas que modificam a transcrição do maxicírculo pela inserção ou deleção da uridina, em processo conhecido como edição do RNA mensageiro (mRNA). A organização dos genes do cinetoplasto de *T. cruzi* usa de mecanismos simples para gerar o mRNA. A maioria dos genes que codifica proteínas é transcrito como unidades policistrônicas. A expressão desses genes não é controlada no início da transcrição. A amplificação específica da sequência pela RNA polimerase II do cinetoplasto foi demonstrada para o gene de RNA *Splicer Leader*. A iniciação da transcrição dirigida foi mostrada para alguns genes codificantes de proteínas do cinetoplasto. Evidências bioquímicas e moleculares confirmaram a presença de proteínas básicas no cinetoplasto, como histonas H1, que participam na condensação de kDNA. A microscopia de fluorescência revelou bromodeoxiuridina (BrdU) marcado com minicírculos livres, que se replicam em sincronia aproximado com a fase S nuclear. Este mecanismo de replicação requer moléculas como Topoisomerase II, DNA polimerases, sequência de proteínas de minicírculos de ligação, primases e ribonucleases, e a proteína p166 localizada entre o disco e o corpo flagelar (KAPELLER *et al.*, 2011; JENSEN & ENGLUND, 2012; POVELONES, 2014; DIAO *et al.*, 2015).

1.7 Teorias da patogênese da doença de Chagas

As teorias da patogênese da doença de Chagas giram em torno da persistência do parasito no tecido cardíaco e da baixa parasitemia contínua, associada à lesão miocárdica imunomediada (BONNEY & ENGMANN, 2008; NUNES *et al.*, 2013). Os conflitos entre essas teorias podem ser justificadas possivelmente pela dificuldade em se determinar a patogenicidade desde o momento inicial da infecção até o desenvolvimento de lesões graves, principalmente no coração, no sistema nervoso periférico, e no tubo digestivo (TEIXEIRA *et al.*, 2011a).

A fase aguda da doença de Chagas representa o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro. É possível que os eventos imunológicos que ocorrem durante essa fase influenciem significativamente a progressão da doença, por meio de uma resposta protetora ou patogênica na fase crônica (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). O parasito prolifera ativamente nas células causando espessamento microvascular, miocitólise e alteração de nervos cardíacos e entéricos. Com base nisso, lançou-se a primeira hipótese, de que a persistência do parasito era o principal motivo para a perpetuação da doença, uma vez que o

T. cruzi possui tropismo por células do músculo cardíaco e liso de animais experimentais e de humanos (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012). Entretanto, ainda na fase aguda, é montada uma potente resposta imunitária que leva ao controle da parasitemia. Os mecanismos exatos que medeiam o controle de parasitos ainda não foram totalmente elucidados nos seres humanos. Acredita-se que a função das células da resposta inata, tais como células assassinas naturais, neutrófilos e macrófagos, exerça um papel fundamental nesse controle (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Já na fase crônica, observa-se baixa positividade ou ausência dos parasitos em exames parasitológicos, porém com evolução significativa da doença de Chagas em longo prazo (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Assim, muitas hipóteses tentam explicar a patogênese da cardiomiopatia, uma vez que esta se desenvolve mesmo na ausência do parasito. Entre as explicações estão (i) a ativação policlonal de células B, que ocorre durante a infecção e pode perturbar mecanismos regulatórios imunes, acarretando tanto na supressão da imunidade quanto na autoimunidade; (ii) a persistência de antígenos parasitários que atuam como alvos para células T e medeiam processos de hipersensibilidade tardia levando a danos no tecido do hospedeiro e (iii) mecanismos de autoimunidade (TEIXEIRA *et al.*, 2011b)

Dentro dos mecanismos de autoimunidade incluem mimetismo molecular, mecanismos de ativação *bystander* e integração do kDNA. O mimetismo molecular baseia-se na semelhança estrutural entre um patógeno ou metabólito e a estrutura molecular do próprio indivíduo. A semelhança pode ser expressa como o compartilhamento de sequências de aminoácidos ou uma estrutura conformacional semelhante entre um patógeno e um autoantígeno (ALBERT & INMAN, 1999). Sugere-se que respostas antígeno-específica de células B e T próprias podem ser iniciadas na presença do patógeno devido a uma reação cruzada entre epítomos do *T. cruzi* e da célula-alvo (ENGMAN & LEON, 2001; BONNEY & ENGMAN, 2008; CASTILLO *et al.*, 2008;). Entretanto, verificou-se em modelos experimentais que a imunização com antígenos parasitários de *T. cruzi* não precede a danos cardíacos e a inflamação (TEIXEIRA *et al.*, 1983; BONNEY *et al.*, 2013).

O mecanismo de ativação *bystander* propõe que antígenos expostos no tecido danificado estimulariam linfócitos auto reativos, contrastando com a ausência de sintomas na maioria dos pacientes na fase aguda da doença de Chagas, quando altos níveis de proteínas próprias são liberados devido à ruptura das células pelas formas parasitárias (TEIXEIRA *et al.*, 2011b).

Provavelmente, o desenvolvimento da doença de Chagas envolve, sinergicamente, mais de um desses fatores e esta associação pode potencializar a gravidade das manifestações clínicas (BONNEY & ENGMAN, 2008).

1.8 Teoria da Integração dos minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi*

Acredita-se que integrações de minicírculos de kDNA influenciem na evolução da patogênese da doença de Chagas, já que outras teorias de autoimunidade e persistência parasitária não conseguem elucidar completamente seus mecanismos. Estudos em coelhos infectados com *T. cruzi* que sobreviveram à fase aguda, mas que morreram por consequência da sintomatologia chagásica crônica, demonstraram lesões no coração dos coelhos semelhantes às aquelas desenvolvidas em humanos, ainda que o tratamento com Benznidazol tenha diminuído a parasitemia (TEIXEIRA *et al.*, 1983; TEIXEIRA, 1986). Deste modo, levantou-se a hipótese de que a persistência da sintomatologia ocorreria por algum tipo de transferência genética do parasito para o hospedeiro e que essa mutação resultaria no desenvolvimento das lesões autoimunes (TEIXEIRA *et al.*, 1990). A partir dessas evidências, começou a busca intensa à inserção do DNA exógeno no genoma do hospedeiro.

Estudos imunocitogenéticos de células obtidas a partir de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* cepa Berenice revelaram sequências do DNA do parasito entre os cromossomos das células do hospedeiro. A cariotipagem dos cromossomos de 52 metáfases mostrou inserções de kDNA de *T. cruzi* nos cromossomos 3, 6 e 11 (TEIXEIRA *et al.*, 1991). A associação covalente de kDNA ao DNA hospedeiro foi confirmada em experimentos de *Southern blot* genômico, em que se verificou a alteração do padrão de bandas do DNA total extraído de células hospedeiras infectadas e digerido com enzimas de restrição (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Tais resultados se repetiram em testes com macrófagos de linhagem humana infectados com *T. cruzi*, os quais mostraram um padrão de bandas distintas do padrão de bandas de amostras de macrófagos não infectados, em que as bandas de maior tamanho correspondiam à integração de kDNA no genoma (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006) (Figura 5).

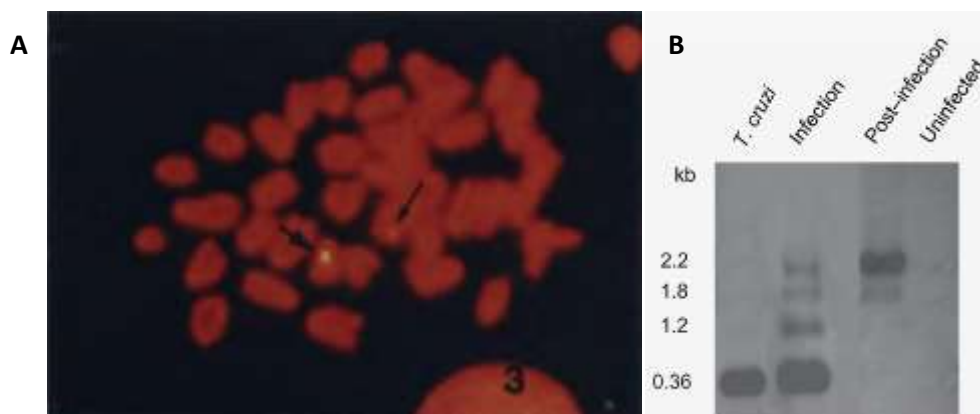


Figura 5. Integração de kDNA no genoma de células de camundongos e macrófagos humanos U937 infectadas com *Trypanosoma cruzi*. (A) Cariotipagem dos cromossomos de 52 metáfases, pela técnica de Finger, mostrou inserções de kDNA de *T. cruzi* nos cromossomos 3, 6 e 11 de células de camundongos BALB/c infectados. (B) Macrófagos de linhagem humana infectados com *T. cruzi*, mostraram um padrão de bandas distintas do padrão de bandas de amostras de macrófagos não infectados. As bandas de maior tamanho correspondem à integração de kDNA no genoma da célula (TEIXEIRA *et al.*, 1991; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006).

Posteriormente, pesquisa realizada em coelhos sugeriu que as integrações se concentraram no cromossomo 1, situadas em elemento LINE-1. Foi observada formação de fases abertas de leitura (ORFs) putativas, cujos códons de iniciação e terminação se encontravam nas sequências de origem diferentes. Virtualmente, as ORFs traduziam proteínas quimeras, das quais uma delas tinha homologia com um antígeno conhecido (NITZ *et al.*, 2004). Igualmente, experimentos realizados em camundongos mostraram que as integrações de kDNA também ocorreram preferencialmente em retrotransposons LINE-1 do genoma de animais chagásicos (SOUSA, 2012).

Também foi observada integração do kDNA no genoma de coelhos nascidos de mães chagásicas e em galinhas que nasceram de ovos inoculados com *T. cruzi*, mesmo as aves sendo refratárias ao parasito. Surpreendentemente, o kDNA integrado no genoma de células germinativas das aves foi passado para as progêneses F1 e F2, na ausência da infecção. A transferência gerou células germinativas com mutações e os descendentes modificados desenvolveram patologia semelhante à doença de Chagas humana (NITZ *et al.*, 2004, TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Assim, acredita-se que essas modificações no genoma dão origem a perturbações de tolerância imunológica que levam à rejeição do músculo cardíaco. De interesse, a ablação de células da medula óssea de aves kDNA positivas seguida de

transplante de células de medula óssea de ave sadia resulta na não rejeição do músculo cardíaco pela ave (GUIMARO *et al.*, 2014).

Técnicas de PCR com iniciadores específicos, *Southern blot* genômico e hibridização com sonda de kDNA mostraram a aquisição do kDNA do parasito também em humanos (HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Novamente, os estudos mostraram que o kDNA possui um sítio preferencial de integração no genoma de humanos, o elemento retrotransponível LINE-1. A técnica de *tpTAIL-PCR* e o sequenciamento dos produtos de PCR gerados; permitiu a identificação de sequências quimeras kDNA-DNA hospedeiro, dispersas em vários cromossomos (HECHT *et al.*, 2010; ROSE, 2013).

1.9 Retroelementos

1.9.1 Categorias e funcionamento

Elementos de transposição tem um impacto profundo sobre a estrutura e função dos genomas (RICHARDSON *et al.*, 2015). Eles são distinguidos em duas classes de acordo com a estrutura e o mecanismo de transposição. Na Classe I estão os retrotransposons, que se movem via uma cópia de RNA intermediário e utiliza a transcriptase reversa para convertê-lo em cDNA. A via de transposição da Classe II ocorre através de DNA intermediário e os elementos desta classe são chamados de transposons (FESCHOTTE & PRITHAM, 2007).

Existem mais cópias de retrotransposons do que de transposons no genoma humano, e em sua maioria, ativos. O grupo de retrotransposons LTR (do inglês, *long terminal repeat*) possuem as longas regiões repetitivas nas extremidades de suas sequências e está entre os componentes mais abundantes de genomas eucarióticos (HAVECKER; GAO; VOYTAS, 2004; HAN, 2010). Eles apresentam repetições de sequências diretas que ladeiam a região de codificação interna, que inclui genes de proteínas estruturais e enzimas. Suas estruturas e modo de replicação são similares aos dos retrovírus infectivos e, por isso, acredita-se que tenham se originado de infecções virais que ocorreram repetidamente durante a evolução dos primatas (Figura 6).

Os retrotransposons não-LTR, não possuem as longas regiões repetitivas nas extremidades de suas sequências, como os LTR. Eles são flanqueados por duplicações diretas de 5 a 20 nucleotídeos em sua extensão (RICHARDSON *et al.*, 2015). Os dois maiores grupos de retrotransposons não-LTR em mamíferos são os SINEs (sequências repetitivas curtas) e LINEs (sequências repetitivas longas). Os SINEs funcionam como retroelemento

não autônomo enquanto que os LINE funcionam como autônomo. (FINNEGAN, 2012) (Figura 6).

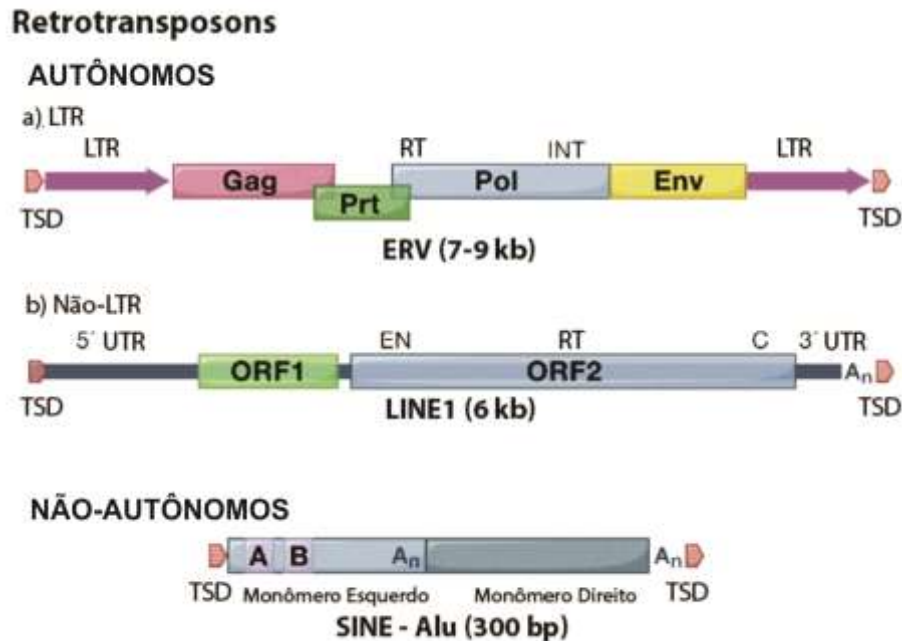


Figura 6. Estrutura de retroelementos. Elementos LTR (*Long terminal repetitive* – Longas repetições terminais) apresentam gene *gag* (Grupo antígeno específico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). LINEs (sequências repetitivas longas) possuem duas fases de leitura aberta: ORF1 e ORF2. SINEs (sequências repetitivas curtas) são constituídos por dois monômeros similares, A e B, e cauda poli-A. (adaptado de Goodier e Kazazian, 2008).

Dentro da família de LINEs, destaca-se o elemento LINE-1 (L1). Em virtude do seu mecanismo replicativo, chega a ocupar 17% do genoma humano (BECK *et al.*, 2012; KEMP & LONGWORTH, 2015). Sabe-se que o L1 possui cerca de 6000 pb, extremidades repetitivas, é constituído por uma 5'-UTR onde está o promotor da RNA Pol II, duas fases de leitura aberta (ORFs), uma 3'-UTR e uma cauda poli-A. A ORF1 codifica uma proteína que tem afinidade por RNA e que é essencial para retrotransposição de L1. A ORF2 codifica proteínas com atividades de endonucleases e transcriptase reversa (RICHARDSON *et al.*, 2015). O RNA intermediário de um elemento LINE é transcrito a partir de um promotor atípico da RNA polimerase II, que se encontra no interior da sequência transcrita, assegurando que o LINE possa ser transcrito onde quer que tenha integrado, sem depender da atividade de

um promotor adjacente. Este RNA intermediário também atua como o mRNA que codifica as proteínas necessárias para a transposição. Os produtos de ORF1 e ORF2 se ligam preferencialmente ao RNA do qual foram traduzidos. O RNA LINE e proteínas associadas passam para o núcleo e encontram um local para a integração. Acredita-se que a inserção do LINE no cromossomo ocorre quando a endonuclease da ORF2 cliva uma única fita do DNA liberando um 3'-OH que serve como anelador para a transcrição reversa, utilizando o RNA de L1 como molde (FINNEGAN, 2012) (Figura 7).

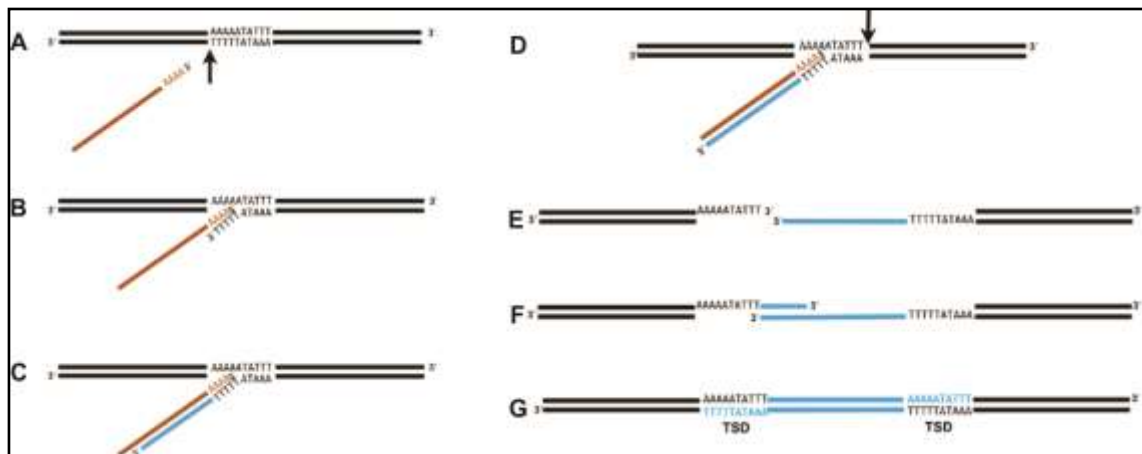


Figura 7. Mecanismos de Integração de LINE. (A) A transposição do RNA intermediário (castanho), associado com transcriptase reversa e a endonuclease (não mostrados), para o DNA cromossômico (preto) em uma sequência rica em A/T. A nuclease promove a quebra da fita adjacente em uma sequência de timinas. (B) A sequência poli (A) na extremidade 3' do RNA pareia-se com as bases do DNA. (C) A transcriptase reversa, em seguida, sintetiza o cDNA (azul). (D) A nuclease realiza uma quebra na cadeia oposta do DNA cromossômico, na distância de alguns nucleotídeos. (E) O RNA molde é removido por RNase H, (F) permitindo a síntese da segunda fita. (G) Enzimas de reparo do hospedeiro completam a integração (Adaptado de Finnegan, 2012).

Os elementos SINEs são pequenos, possuem entre 75 e 500 pb, contêm um promotor de RNA polimerase III, análogo ao tRNA, e uma cauda poli-A. Estes retrotransposons dependem da transcriptase reversa sintetizada pelos LINEs para se moverem pelo genoma. O membro mais conhecido da família SINE é o elemento *Alu*, presente em mais de um milhão de cópias no genoma humano, compreendendo aproximadamente 11% do DNA genômico. O *Alu* possui cerca de 300 pb e exibe estrutura dimérica, com monômeros separados por uma sequência ligante rica em adenosina (6). Sabe-se que elementos *Alu* podem

integrar a genes humanos e levar a geração de isoformas específicas de primata (RICHARDSON *et al.*, 2015; EISENBERG, 2016).

1.9.2 Doenças causadas por retroelementos

Pesquisas com os retroelementos SINEs, LINEs e LTRs contribuíram significativamente para avanços no conhecimento de diversas doenças (BURNS & BOEKE, 2012). Aproximadamente 45% do genoma humano é derivado de elementos móveis, como LINE-1 ativos, *Alu* e SINE-R / VNTR / *Alu* (SVA). Eventos de retrotransposição podem gerar, por exemplo, mutações de inserção, que potencializam o desenvolvimento de doenças humanas (ARJAN-OEDRA *et al.*, 2012; DOUCET *et al.*, 2015). O papel evolucionário ainda não é muito claro, mas, nos últimos tempos, os retroelementos foram registados como agentes importantes na mudança do genoma. De interesse, os elementos L1 podem afetar o genoma de muitas maneiras incomuns, tanto destrutiva quanto construtiva. Os processos destrutivos incluem a inserção, deleção e rearranjos (RICHARDON *et al.*, 2014).

Estima-se que menos de 0,2% de mutações causadoras de doenças conhecidas sejam devido à inativação de genes por eventos inserção de elementos transponíveis, que 0,3% de mutações patogênicas em humanos resultem de deleções ou rearranjos, devido à influencia de retroelementos como indutores de recombinação ectópica e que 0,5% das desordens hereditárias humanas sejam resultantes da integração ou recombinação homóloga de elementos transponíveis (OLIVER & GREENE, 2009).

O primeiro relato de doença causada pela atividade de um retroelemento foi a hemofilia do tipo A, quando se detectou a inserção de um elemento L1 no gene do fator VIII (KAZAZIAN *et al.*, 1988). Desde então, muitos outros casos de danos causados por elementos retrotransponíveis foram descritos. Por exemplo, verificou-se que a integração de L1 no exon 14 do gene da distrofina promovia a distrofia muscular de Duchenne (MUSOVA *et al.*, 2006). Sabe-se também que a hipometilação em espécies dos genes dos elementos LINE-1 e *Alu* tem papel importante no desenvolvimento de câncer de pulmão (DASKALOS *et al.*, 2009). Ainda, a integração de elementos L1 próxima a oncogenes ou genes supressores de tumor pode levar ao desenvolvimento de câncer (KEMP & LONGWORTH, 2015).

Em células normais, a atividade do L1 na maioria das vezes é reprimida. Em contra partida, as células cancerígenas são caracterizadas pela expressão aberrante de retroelemento LINE-1. Usando análise de sequenciamento profundo de RNA pequeno foi identificado um subconjunto de endo-siRNAs que regulam diretamente a expressão de LINE-

1. Estas endo-siRNAs foram significativamente empobrecidas em células de câncer da mama em comparação com as células normais da mesma região (CHEN *et al.*, 2012).

De interesse, a inserção de um cDNA de *Cenpw* (do inglês, *centromere protein W*), flanqueada por duplicações na região alvo, mediado por retroelementos L1, perturba o gene *Poc1a*, causando crescimento insuficiente e infertilidade em camundongos. O gene *Poc1a* codifica o centríolo 1a, essencial para função normal das células de Sertoli e das células germinativas. Esse e vários outros genes associados com a função do centrossoma podem afetar o esqueleto e levar a displasias esqueléticas e nanismos primordiais em camundongos (GEISTER *et al.*, 2015).

Ademais, foi verificado que quando o gene da telomerase é perdido do genoma de *Drosophila*, curiosamente, mecanismo de retrotransposons *in tandem* substitui as sequências teloméricas nas extremidades do cromossomo. Isso mostra que os retroelementos podem fornecer a atividade da telomerase quando a mesma é disfuncional, contrariando o encurtamento do cromossomo associado com a replicação do genoma. Essa inserção de retroelementos nas extremidades dos cromossomos é entendida como uma resposta adaptativa para os telômeros disfuncionais (SERVANT & DEININGER, 2016).

1.9.3 Retroelementos e Transferência Gênica

A assimilação de DNA exógeno é um fenômeno natural muito antigo, que pode levar ao desenvolvimento de doenças (POVH *et al.*, 2005). Existem várias evidências de interações gênicas entre organismos de mesmas espécies e organismos de espécies diferentes. Análise de genes individuais revelou inúmeros casos de transferência lateral de genes. As primeiras tentativas de estabelecer a transferência de genes ficaram limitadas a poucos microrganismos para os quais não havia informação de sequência para obter uma amostra imparcial dos genes. Inicialmente, então, foi estimado entre 10% e 16% de similaridade de DNA de *Escherichia coli* com *Salmonella enterica*. Essas trocas genéticas também foram constatadas entre outras bactérias, retrovírus e células de hospedeiro vertebrado (TEMIN, 1986; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). A transferência gênica nos organismos eucariotos é mais complexa devido à membrana que envolve o núcleo. Transferências lateral de DNA foram comprovadas entre plantas e parasitos através do contato físico (MOWER *et al.*, 2004). Aliás, já foram verificadas 97,6% de identidade entre o elemento transponível MLE de traça e de

vespa sugerindo que a transferência tenha ocorrido durante o processo de parasitismos (YOSHIYAMA *et al.*, 2001).

A movimentação gênica, contudo, não ocorre apenas de orientação unilateral. Há, também, evidências de transferência de DNA do hospedeiro para o parasito. De interesse, Imase *et al.* (2004) identificara sequências de camundongo no genoma *Shistosoma japonico* e de seus dependentes. Do mesmo modo, foi observada que essa interação parasito-hospedeiro também pode promover a ocorrência de transferência gênica lateral entre animais vertebrados e invertebrados. Um estudo recente mostrou que o inseto *Rhodnius prolixus* carrega em seu genoma quatro famílias distintas de transposons que também invadiram os genomas de grupos tetrápodes. Foi demonstrado no *Rhodnius prolixus* 98% de identidade de elementos transponíveis do gambá e do sagui (GILBERT *et al.*, 2010).

II. JUSTIFICATIVA

Mediante a esse breve relato da doença de Chagas, é evidente a ocorrência da integração dos minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma de hospedeiros de várias espécies e que essas mutações podem exercer papéis fundamentais no desenvolvimento dos sintomas. Do mesmo modo, é imprescindível salientar que a partir do momento que a infecção pelo parasito se estabelece no organismo do hospedeiro, são ativados uma série de mecanismos que envolvem tanto o controle do parasito quanto a autoimunidade, e esses mecanismos podem ou não acelerar o desenvolvimento dos sintomas. Além disso, já foi comprovado que a transferência gênica, tem um papel fundamental no processo de evolução das espécies e podem influenciar no surgimento e desenvolvimento de determinadas doenças, incluindo a doença de Chagas.

Igualmente, sabe-se que a presença do kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro está associada às manifestações mais graves nos indivíduos sintomáticos chagásicos. Neste contexto, é fundamental ampliar o conhecimento relacionado às trocas genéticas entre o *T. cruzi* e o genoma da célula hospedeira, e o seu possível envolvimento na patogênese da doença de Chagas. Dessa forma, a proposta deste trabalho é ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no processo de integração do kDNA de *T. cruzi* nas células hospedeiras mediante a quantificação dos eventos de integração dos minicírculos de kDNA do parasito no genoma de macrófagos J774.A1 e no genoma de camundongos BALC/c infectados pelo *T. cruzi*.

Além disso, o conhecimento dessas trocas genéticas parasito-hospedeiro pode ser relevante para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

III. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Quantificar as integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de células e de animais experimentais infectados por esse parasito.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver protocolo de PCR quantitativa (qPCR) que possibilite a quantificação das integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro.

- Quantificar as integrações de kDNA no genoma de células J774.A1 em diferentes intervalos pós infecção

- Verificar se drogas tripanocidas ou inibidoras de vias de retrotransposição inibem a integração do kDNA

- Avaliar, em camundongos, a influência do tempo pós-infecção no acúmulo das mutações de kDNA no genoma.

IV. METODOLOGIA

4.1 Cultura de Células e Parasitos

4.1.1 Manutenção de fibroblasto L6

Os fibroblastos L6, células derivadas de mioblasto de culturas primárias de músculo de rato (YAFFE, 1968), foram cultivados para manutenção das formas tripomastigota de *T. cruzi*. O cultivo celular foi realizado em frascos de cultura com área de crescimento de 75 cm³. As células foram mantidas em Dulbecco Meio Mínimo Essencial (DMEM), com suplemento de 10% de soro fetal bovino (SBF), pH 7.2, a 37 °C, com atmosfera úmida, 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e o acompanhamento da cultura foi realizado em microscópio óptico invertido.

Quando se observava que as células haviam alcançado alta densidade e formavam uma monocamada com mais de 80% de confluência, realizava-se o repique associado ao processo de tripsinização. Para tanto, retirou-se todo o meio de cultura do frasco e adicionou-se 6 mL de solução de Tripsina 0,05%, EDTA 0,02%, com incubação a 37 °C, com atmosfera úmida, 5% de CO₂, por três minutos. Após esse período, as células foram homogeneizadas até se desfazerem os grumos. Cerca de 1 mL do homogeneizado foi colocado em frasco de cultura novo, acrescido de 10mL de meio DMEM 5 %.

4.1.2 Manutenção de células J774.A1

A cultura de macrófagos J774.A1 foi gentilmente cedida pela professora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega. Os macrófagos J774.A1 são células neoplásicas originalmente obtidas de ascite de camundongos *Mus musculus*. As células foram mantidas em meio DMEM 5%, pH 7.2, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e o repique das células, uma vez por semana. Ao se observar alta densidade das células e a formação da monocamada com mais de 80% de confluência, o repique foi realizado com auxílio de haste de plástico (*cell scraper*) com lâmina de 18 mm para raspar a monocamada confluenta. As células suspensas foram homogeneizadas e 1 mL da suspensão foi colocado em novo frasco de cultura de 75cm³, acrescido de 10 mL de meio DMEM 5%.

4.1.3 Cultura de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, das linhagens Berenice, Tulahuen e Ernestina foram mantidas em meio LIT 10% de SBF inativado pelo calor, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Os repiques foram realizados a cada 15 dias. As culturas foram homogeneizadas, 1 mL retirado e colocado em tubos de 15 mL, acrescido de 4 mL de meio novo.

4.1.4 Obtenção e manutenção das forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*

Para obtenção das formas tripomastogotas, foi inoculado 1 mL de meio LIT contendo a forma epimastigota *T. cruzi* Berenice em cultura de células L6, previamente crescidas. Depois de 24 horas de infecção, ou seja, depois da internalização dos parasitos nas células, todo o sobrenadante foi retirado e a monocamada de L6 foi lavada com PBS 1X, pH 7,4, duas vezes, para a retirada das formas epimastigotas presentes no sobrenadante. Após aproximadamente sete dias de infecção, foi obtida a forma tripomastigota. As culturas positivas foram inoculadas em camundongos BALB/c para aumentar a virulência do parasito. Após 13 dias de infecção, foi realizada a parasitemia dos animais. Os camundongos positivos tiveram cerca de 200µL de sangue coletado. Desses, 100µl foram inoculados em frascos de cultura de L6 e 100 µL em novos camundongos para repique. A partir do segundo repique *in vivo*, as formas tripomastigotas recuperadas foram mantidas em cultura de células L6 para os futuros ensaios.

4.2 Infecção com *Trypanosoma cruzi*

4.2.1 Infecção de células J774.A1

Para a realização do ensaio com as células J774.A1, foram contadas $2,0 \times 10^6$ células/mL e inoculadas em garrafas de cultura, contendo DMEM 10% por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, para adesão das células e formação da monocamada. Após esse período de adesão, realizou-se a infecção das células com 10×10^6 formas tripomastigotas, numa razão de 5:1 (*T. cruzi*: J774.A1). As células infectadas foram avaliadas

durante 30 dias pós-infecção (dpi), sendo as coletas para extração de DNA realizadas em 3 dias, 7 dias, 10 dias, 15 dias e 30 dias.

4.2.2 Infecção de camundongos BALB/c

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA - FM) da Universidade de Brasília, sob o registro nº 1617645/2013. Foram utilizados 18 camundongos BALB/c, uniformes quanto ao peso e idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da UnB. A infecção dos animais foi realizada por via intraperitoneal com 1×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os animais foram eutanasiados a diferentes intervalos de tempo, contados em dias pós-infecção (dpi), conforme grupos pré-estabelecidos: I) 7 dpi (n=5); II) 15 dpi (n=4); III) 30 dpi (n=6); IV) 90 dpi (n=3).

4.3 Tratamento *in vitro*

4.3.1 Avaliação de citotoxicidade

O teste de Vermelho Neutro (2 amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) foi realizado para determinação do IC₅₀ para os fármacos de escolha: Benznidazol e Zidovudina. Este ensaio fornece informações sobre as funções metabólicas celulares, especificamente do lisossomos, uma organela que participa de vários processos celulares. O princípio do teste é avaliar a sobrevivência e viabilidade celular através da incorporação do vermelho neutro, um corante catiônico fraco que penetra facilmente as membranas celulares por um mecanismo distinto da difusão, acumulando-se nos lisossomos, onde se liga aos sítios de matriz aniônica lisossomal. Alterações causadas por xenobióticos resultam em mudanças na superfície celular ou na membrana do lisossoma ou outras alterações que podem levar a fragilidade lisossomal resultando numa redução da ligação e absorção do vermelho neutro, tornando-se possível distinguir células mortas, danificadas, e vivas.

Para avaliar a viabilidade das células aos fármacos Benznidazol e Zidovudina quanto à integridade lisossomal, células foram colocadas em placa de 96 poços numa concentração de 1×10^5 , em meio DMEM completo, mantidas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, foi preparado uma solução contendo 2 mL de DMEM incolor, 10% de SFB, e 67 µL, 33,5µL, 16,8µL, 8,4µL, 4,2 µL e 2,1 µL de Benznidazol nas concentrações de 2580µM,

1290 μ M, 645 μ M, 322 μ M, 161 μ M. Para a outra placa, foi preparada uma solução contendo 2 mL de DMEM incolor, 5% de SFB e 108 μ L, 54 μ L, 27 μ L, 13,5, 6,75 μ L, 3,375 μ L nas concentrações de 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,13 μ M. Em seguida, a placa foi incubada por 48 horas nas mesmas condições. Após o período de incubação com os fármacos, o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com a solução tampão fosfato salina (PBS 1X- pH 7.4) e 100 μ L de meio DMEM 5% e suplementado com 50 μ g/mL de vermelho neutro foram adicionados aos poços. A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO² por 3 horas. Após esse período, o meio foi descartado e as células foram lavadas 5 vezes com PBS 1X para de remover o corante não incorporado às células. Para fixar o vermelho neutro nas células, foram adicionados aos poços 100 μ L de solução de álcool-ácido (50% de etanol, 1% de ácido acético e 49% de água destilada). A placa foi levemente homogeneizada durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 492nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células não tratadas, usando a equação: Viabilidade (%) = (n° de células viáveis/número total de células) X 100.

4.3.2 Tratamento com Benznidazol

Inicialmente na concentração 100 mg, os comprimidos foram diluídos em 1mL de PBS 1x, acrescidos de 9 mL de água milli-Q estéril. O Benznidazol foi aliqotado em tubos *ependorf* de 1,5 mL e estocado à -20°C até o início dos experimentos.

As células foram tratadas com 50 μ g/mL 24 horas pós-infecção, e mais uma vez a cada semana, totalizando quatro semanas. O IC₅₀ (índice de citotoxicidade) foi calculado com base nas porcentagens obtidas de teste de citotoxicidade com vermelho Neutro em macrófagos J774.A1 e as porcentagens de tripanomacida de LC₅₀ (dose letal) *T. cruzi*, realizado por Vega *et al.* (2012).

4.3.3 Tratamento com Zidovudina

Inicialmente na concentração de 50 mg, os comprimidos foram diluídos em 1mL de PBS 1x, acrescidos de 9 mL de água ultra pura estéril. Posteriormente, a solução foi filtrada (filtro 0,22 μ m) para retirada dos excipientes. O AZT foi então aliqotado em tubos de 1,5mL e estocado à -20°C até o início dos experimentos.

Após 24 horas de infecção, as células foram tratadas com 35µg/ml, uma vez a cada semana. O IC₅₀ foi calculado com base nas porcentagens obtidas de teste de citotoxicidade com vermelho Neutro em macrófagos J774.A1 e as porcentagens de inibição do crescimento de *T. cruzi* conforme realizado por Nakajima-Shimada, Hirota e Aoki (1996).

4.4 Coleta das amostras e extração de DNA

4.4.1 Extração de DNA total de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, crescidas em meio LIT, previamente contadas (10⁸), foram colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS 1X gelado, ressuspensão em tampão de lise em igual volume e incubado a 37 °C por 1 h. Após essa primeira incubação, foi adicionado proteinase K (100 µg/mL) e o material foi incubado *overnight* a 37 °C. Após este período, foram realizadas duas extrações com clorofane e uma com clorofil. O DNA foi precipitado com 2,5V de etanol 100% gelado. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e, após seco, foi ressuspensão em tampão TE. O DNA total de *T. cruzi* foi estocado a -20 °C.

4.4.2 Amostras de células e amostras de camundongos

Para a extração de DNA das células, após os intervalos de tempo estabelecido, foi retirada, e acrescidos de 3 mL de meio novo. Em seguida as células foram raspadas com auxílio de haste de plástico e cerca de 1 mL foi colocada em novo frasco de cultura para repique e 2 mL foram colocados em tubos eppendorfs e submetidos à extração de DNA com kit Biopur Mini Spin Plus. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Para a extração de DNA de amostras de camundongos, após os intervalos de tempo estabelecidos, foi coletado o sangue total dos camundongos dos diferentes grupos experimentais por via intracardíaca e pool de tecidos - músculo cardíaco, músculo esquelético (coxa) e músculo liso (intestino). Todas as amostras de sangue foram coletadas com seringa de 1,0 mL, colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 100µL de citrato e submetidas à extração de DNA com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), conforme recomendações do fabricante.

As amostras de tecidos foram maceradas e seus DNAs extraídos pelo método convencional de clorofane/clorofil descrito por Sambrook & Russel modificado (2001). Para a

extração de tecidos, depois de maceradas, as amostras foram colocadas em eppendorffs de 2,0mL, e acrescidas de 1 mL de tampão de lise e incubado a 37 °C por 1 h. Após essa primeira incubação, foi adicionado proteinase K (100 µg/mL) e o material foi incubado *overnight* a 37 °C. Após este período, foram realizadas duas extrações com clorofane e uma com clorofil. O DNA foi precipitado com 2,5V de etanol 100% gelado. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e, após seco, foi ressuspensão em tampão TE. O DNA total de *T. cruzi* foi estocado a -20 °C.

A Figura 7 sintetiza todos os grupos de amostras que foram utilizados no presente trabalho.

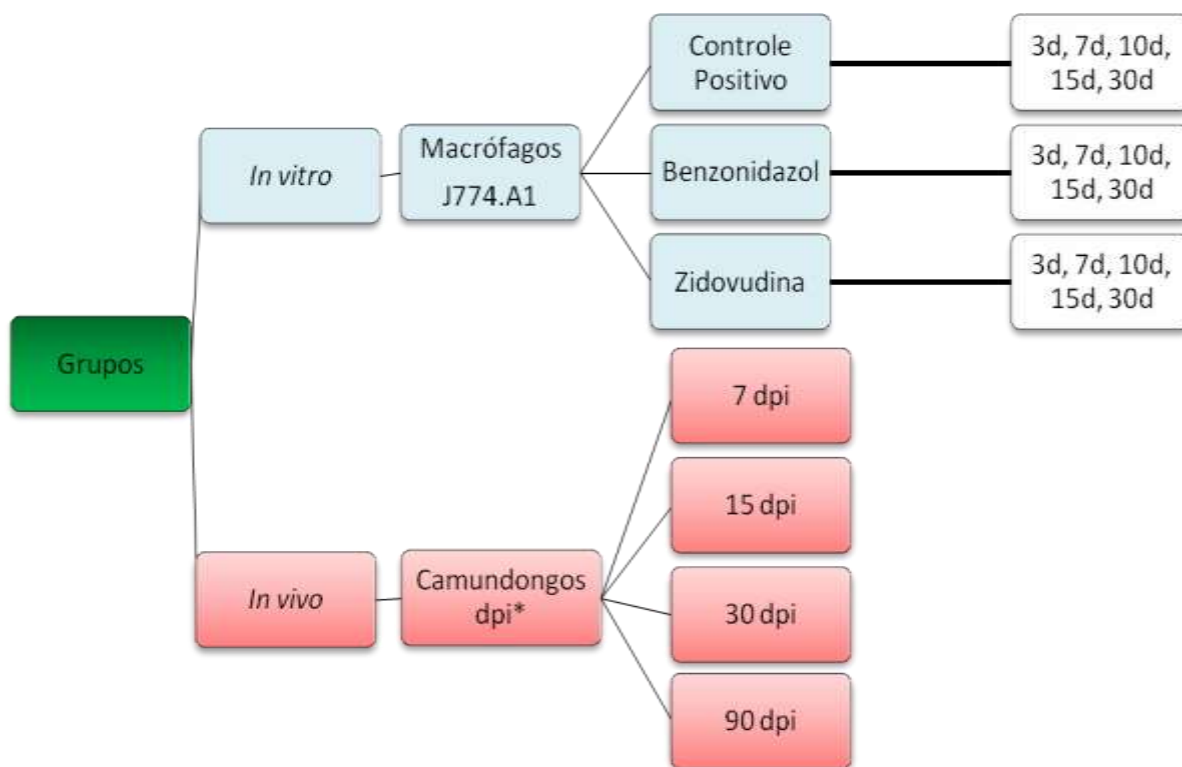


Figura 7: Grupos experimentais utilizados no estudo. *dias pós-infecção; d = dias.

4.4.3 Quantificação e análise do DNA extraído

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoVue (GE) com 3 µL da amostra. A verificação da integridade do DNA extraído das culturas de *T. cruzi*, das células J774.A1 das amostras de sangue e de tecido de camundongo foi realizada por PCR convencional específica para o gene β -actina e visualizada em gel de agarose a 0,8%, corado

com brometo de etídeo a 0,5mg/mL, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris acetato 90mM, pH 8,0 e EDTA 25 mM).

4.5 PCR quantitativa (qPCR)

Foi desenvolvido um protocolo de PCR quantitativa (qPCR) para quantificação das integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de células e de animais experimentais infectados por esse parasito. Para isso, foi estabelecida a proporção de kDNA e nDNA encontrada no *T. cruzi* de diferentes estoques de parasito (10 *pools* do estoque Berenice, 5 *pools* do estoque Tulahuen e 8 *pools* do estoque Ernestina). Cada pool contendo uma concentração inicial de 10^8 de *T. cruzi*. Assim, após a quantificação do kDNA e do nDNA desses pools por qPCR, a relação kDNA/nDNA foi determinada. Amostras com valores superiores àqueles encontrados nos *pools* indicam integração.

4.5.1 Padronização da qPCR

Os dados das qPCRs foram analisados por quantificação absoluta. Para isso, foram construídas curvas padrão a partir de diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*. Foram realizadas diluições seriadas de DNA do parasito (de 10^5 a 10^{-3} parasitos/mL para o nDNA, e de 10^5 a 10^{-2} parasitos/mL para o kDNA) (Figura 8). A curva padrão do nDNA apresentou eficiência de 96.4%, $R^2 = 0.953$ e slope de -3.41 , enquanto a de kDNA apresentou eficiência de 96.6%, $R^2 = 0.951$ e slope de -3.41 . Essas curvas foram salvas e utilizadas para a quantificação de todas as reações de qPCR através do uso da equação da reta ($y = a+b$, onde y é o C_q da amostra; x é a quantidade do produto amplificado a ser calculada; a é o coeficiente angular da reta e b é o coeficiente linear).

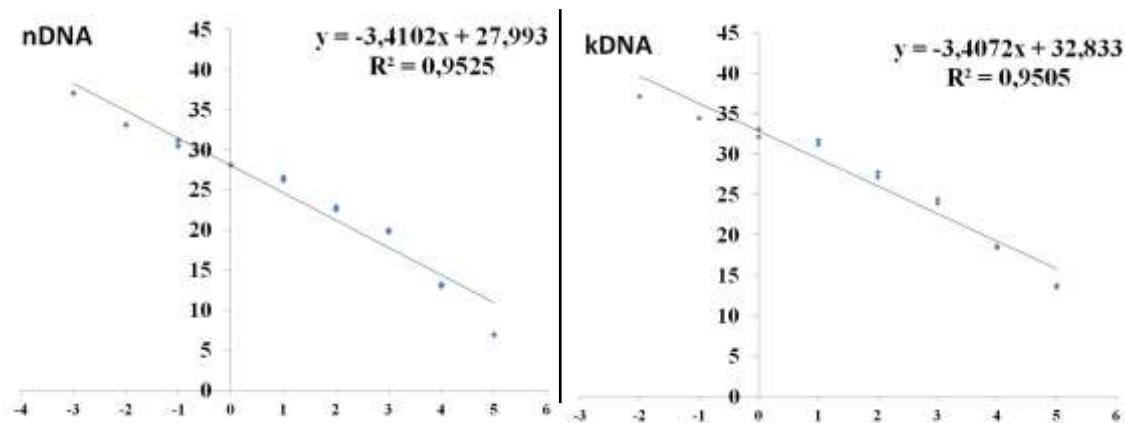


Figura 8: Curvas padrão a partir de diferentes concentrações de nDNA e kDNA. nDNA com eficiência de 96.4%, $R^2 = 0,953$ e slope de $-3,41$; kDNA com eficiência de 96.6%, $R^2 = 0,951$ e slope de $-3,41$.

Para a quantificação absoluta da qPCR a concentração de uma amostra é determinada de acordo com a curva padrão gerada pela relação dos valores de Cq (*quantification cycle*) e do logaritmo (log) do número de cópia inicial (os quais são inversamente proporcionais). O Cq é o número de ciclos necessário para atingir o limiar de fluorescência, fazendo com que esta seja detectada. Ele representa, então, o número mínimo de ciclos necessário para que a amplificação seja detectada. O Cq é proporcional ao log da quantidade inicial do DNA alvo da amostra. Assim, esse ponto permite a quantificação de fragmentos de DNA e RNA baseado em fluorescência.

Com a utilização do sistema *SYBR Green* é possível obter a curva de dissociação ou curva de *melt* ou de dissociação (*Melting curve*) realizada no final dos ciclos de amplificação da qPCR. Essa curva indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos iniciadores específicos para as sequências-alvo pesquisadas. Essa curva é essencial para verificar se a amplificação foi específica, com a formação do produto de PCR desejado. Neste caso, a curva de dissociação apresenta um pico único. O aparecimento de vários picos na curva sugere a formação de produtos inespecíficos na reação ou dímeros de iniciadores. A eletroforese em gel de agarose é um procedimento útil para confirmar os dados da curva de dissociação.

Na qPCR é gerado uma curva de amplificação (*amplification plot*) para cada amostra. Essa curva mostra a variação do log (ΔRn) com o número de ciclos da PCR. Ou seja, o *plot* do número de ciclos contra o sinal de fluorescência se correlaciona com a quantidade inicial de ácido nucleico alvo durante a fase exponencial da PCR. O Rn é a fluorescência do

corante repórter dividida pela fluorescência do corante de referência passiva. Diante disto, a qPCR do nDNA foi feita com os iniciadores TcZ3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TcZ4 (5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'), gerando um produto de aproximadamente 168 pb (NDAO *et al.*, 2000). Como molde para a qPCR foi usado 1 µL de DNA, 0,2 µM de cada iniciador, 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em triplicata, no termociclador 7500 *Real-time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação

50 °C — 10'	
95 °C — 10'	
95 °C — 15''	} x 40
60 °C — 45''	
72 °C — 10''	

Para a quantificação dos minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores S36 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G3') e S67rev (5'GAA CCC CCC TCC CAA AAC C3'), gerando um produto de cerca de 250pb. As demais condições da reação foram as mesmas da qPCR de nDNA, excetuando-se as condições de do ciclo de amplificação:

50 °C — 2'	
95 °C — 10'	
95 °C — 15''	} x 40
60 °C — 45''	
72 °C — 10''	

4.6 Purificação de DNA em gel de agarose

Após a visualização dos produtos de PCR em gel de agarose e identificação das bandas de interesse. O gel, no local os amplicons, foi cortado com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova e acondicionada em eppendorfs de 1,5 mL. A purificação de DNA em gel foi

realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

O DNA purificado foi quantificado em NanoVue Espectrofotômetro (GE) com 2 μ L de DNA e guardadas a - 20°C.

4.7 Sequenciamento direto dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados comercialmente pela empresa Genomic Engenharia Molecular, São Paulo, para a identificação do kDNA de *T. cruzi*. As reações foram processadas em tubos de eppendorf de 0,2 mL contendo 5 μ L de DNA e 2,5 μ L de cada primer (S36 e S67rev). A concentração do produto estava conforme exigido pelo sequenciador de 20ng/ μ L, valor estipulado pelo tamanho do produto final da PCR ~380pb. As sequências obtidas foram editadas usando o software *Genious* e a análise foi realizada pelo algoritmo BLASTn disponível no site do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio de técnicas estatísticas paramétricas e não paramétricas, a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis, respectivamente. A ANOVA é uma técnica estatística paramétrica utilizada para comparar três ou mais tratamentos por meio de suas médias, em que se quer saber quanto da variabilidade dos resultados é devido ao tratamento (variância entre grupos) e quanto é devido a erro amostral (variância dentro dos grupos) e testa a ideia de que duas ou mais populações são iguais. O teste de Kruskal-Wallis dispõe as respostas dos tratamentos que serão comparados na forma de postos. Quanto maior for a diferença entre a soma dos postos, maior será a evidência de que existe diferença entre os mesmos (KRUSKAL & WALLIS, 1952; FIELD, 2009).

O teste de Levene foi utilizado para verificar a não rejeição à hipótese de igualdade de variância entre os grupos, um dos pressupostos para a utilização da ANOVA. Em experimentos que consistem em medir um grupo de participantes em todas as condições, o teste F é dito ANOVA de medidas repetidas. O teste de Friedman é uma ferramenta análoga ao teste F, que representa uma alternativa não paramétrica para o teste de experimentos em

blocos ao acaso (RBD - Random Blocks Design) na ANOVA regular. Ele é muito utilizado para medidas repetidas (DANIEL, 1990). Uma das limitações dos testes não paramétricos é que apesar de identificar as diferenças entre os grupos, não é possível identificar qual dos grupos são estatisticamente diferentes.

Neste sentido, destaca-se que, devido ao número de amostras em cada grupo das células J774.A1 ser pequeno ($n=3$), foi usado o nível de significância da distribuição exata.

Nesse estudo os testes paramétricos e não paramétricos de comparação de médias foram realizados utilizando-se o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 22.0.

V. RESULTADOS

5.1 Determinação da razão kDNA/ nDNA em pools de *Trypanosoma cruzi*

Para estabelecer a proporção de kDNA e nDNA presente no *T. cruzi*, foi realizado a quantificação desses DNAs em pools de três linhagens distintas do parasito. Foi observado na Figura 9 que a razão kDNA/ nDNA da linhagem Tulahuen difere significativamente das outras duas ($p < 0,01$). Não foi encontrado diferença estatística da razão kDNA/nDNA entre Berenice e Ernestina ($P > 0,05$). De acordo com o gráfico apresentado, foi determinado que a integração de minicírculos de kDNA no genoma da célula hospedeira estaria ocorrendo quando o valor da razão kDNA/nDNA estivesse acima de 20.

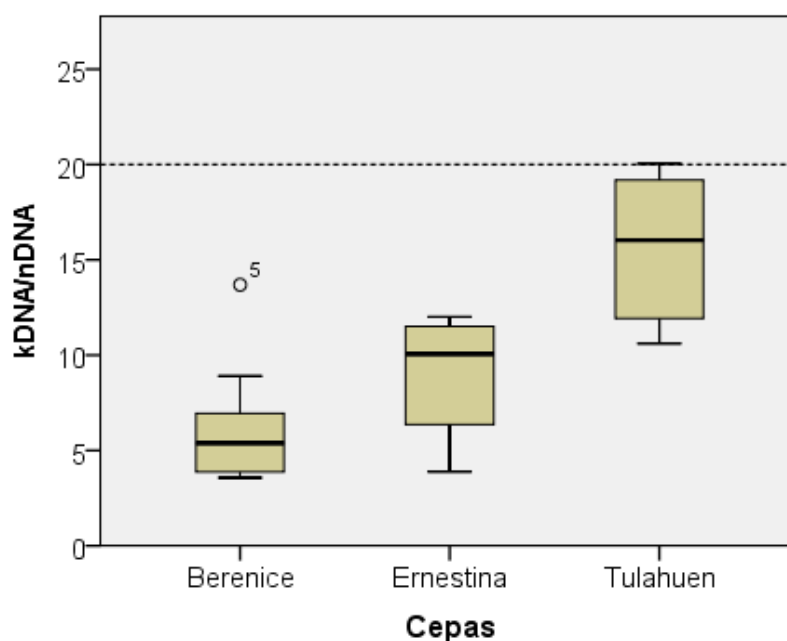


Figura 9. Distribuição da razão kDNA/nDNA em pools de *Trypanosoma cruzi*. A proporção de DNA mitocondrial e DNA nuclear das linhagens Berenice, Ernestina e Tulahuen de *T. cruzi* foi determinada por qPCR. A linha tracejada representa o ponto de corte a partir do qual se considera que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA. Média e desvio padrão entre as linhagens: Berenice (Média: 6,1860; dp: 3,1557), Ernestina (Média: 8,9688; dp: 3,1969) e Tulahuen (Média: 15,5580; dp: 4,2201).

5.2 Acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma da célula hospedeira ao longo do tempo

Inicialmente, avaliamos a transferência do kDNA de *T. cruzi* do isolado Berenice para o genoma de macrófagos J774.A1 ao longo do tempo (Figura 10). A partir dos 10 dias pós-infecção (dpi), o valor da razão kDNA/nDNA superou o ponto de corte (>20), sugerindo a ocorrência de integrações de kDNA. Foi observado um acúmulo de integrações com o passar do tempo, com a razão kDNA/nDNA chegando a 316,26 em 15 dpi e 946,04 em 30 dpi. O teste Friedman demonstrou haver diferença significativa entre os diferentes tempos testados ($p=0,001$).

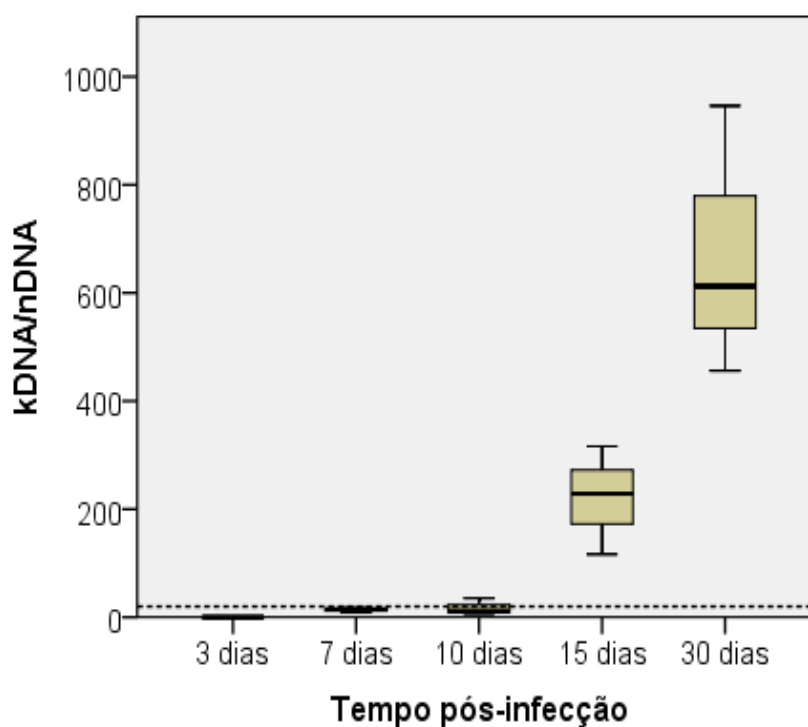


Figura 10. Aumento da razão kDNA/nDNA ao longo do tempo de células J774.A1 infectadas e não tratadas (Controle Positivo). As culturas de células J774.A1 infectadas pelo *T.cruzi* tiveram seus DNAs extraídos a diferentes intervalos de tempo pós-infecção: 3d, 7d, 10d, 15d e 30d. A linha tracejada representa o ponto de corte a partir do qual se considera que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA (>20). Os experimentos foram realizados em triplicata. Média dos grupos: 3d (0,0460), 7 dias (13,4300), 10 dias (17,7867), 15 dias (220,3267) e 30 dias (671,5267).

5.3 Influência de drogas tripanocida e anti-retroviral no acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*

5.3.1 Teste de Citotoxicidade

Nos testes de citotoxicidade frente às drogas Benznidazol e Zidovudina (AZT) foi selecionada uma das doses que obteve maior concentração do fármaco e mais de 90% de células viáveis. Assim, conforme mostra a Figura 11, as concentrações de 161 μ M até 645,12 μ M de Benznidazol, após 48 horas do tratamento, apresentaram porcentagens acima de 90% de células viáveis. Desse modo, a dose selecionada para os ensaios de integração de kDNA foi de 322 μ M, tendo em vista tanto o efeito tripanomacida, conforme Vegas *et al.* (2012), em que a dose letal para aproximadamente 80% dos *T. cruzi* é maior que 256 μ M, e a citotoxicidade das células obtida nos ensaios deste estudo.

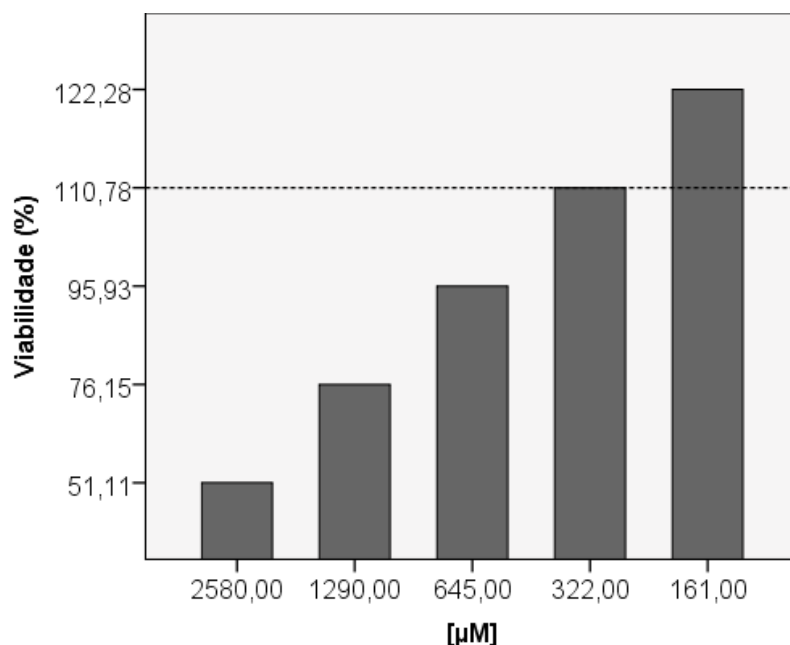


Figura 11. Viabilidade das células J774.A1 frente a diferentes concentrações de Benznidazol pelo teste de Vermelho Neutro. Após o período de incubação, 48 horas depois do tratamento, foi estabelecida a concentração utilizada, que está destacada pela linha tracejada.

A Figura 12 dispõe sobre a curva de viabilidade celular das células J774.A1 frente ao AZT. Nota-se que, 48 horas pós-tratamento, as concentrações de 3,125 μ M e 6,25 μ M,

apresentaram porcentagens acima de 90% de células viáveis. A concentração escolhida para ser usada neste estudo foi de 6,25 μ M.

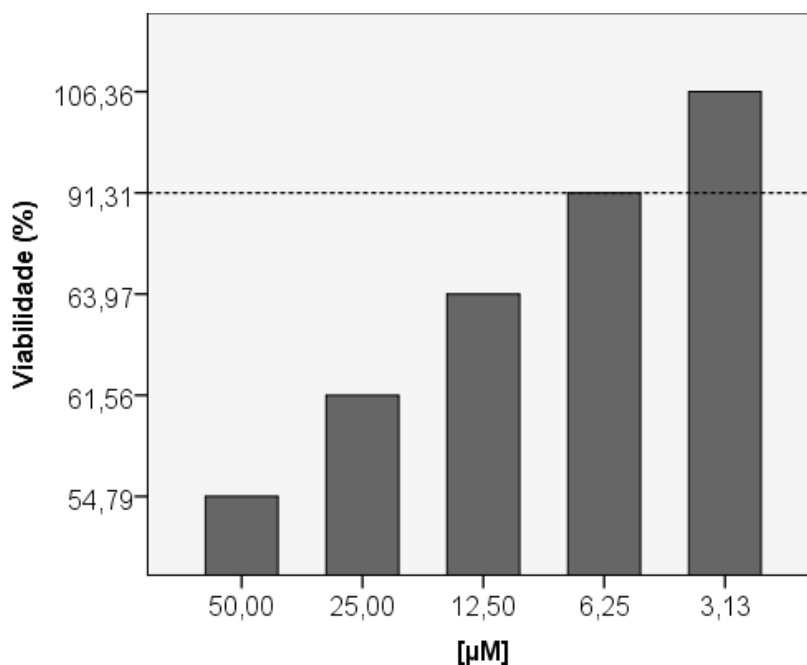


Figura 12. Viabilidade das células J774.A1 frente a diferentes concentrações de Zidovudina pelo teste de Vermelho Neutro. Após o período de incubação, 48 horas depois do tratamento, foi estabelecida a concentração utilizada, que está destacada pela linha tracejada.

5.3.2 Benznidazol

As integrações de minicírculos de kDNA também foram avaliadas após o culturas infectadas com *T. cruzi* serem tratadas com Benznidazol ou AZT, através da qPCR. A primeira droga foi capaz de diminuir a carga parasitária até os 15dpi e erradicá-lo por completo aos 30 dpi. Entretanto, o kDNA foi detectado nas culturas celulares até o último intervalo de tempo testado, ou seja 30 dpi (Figura 13a). Desta forma, foi possível se evidenciar o acúmulo das integrações de kDNA ao longo do tempo ao se calcular a razão kDNA/nDNA (Figura 13b). E de acordo com o teste Friedman, há diferença significativa entre os grupos nos diferentes tempos testados ($p=0,002$).

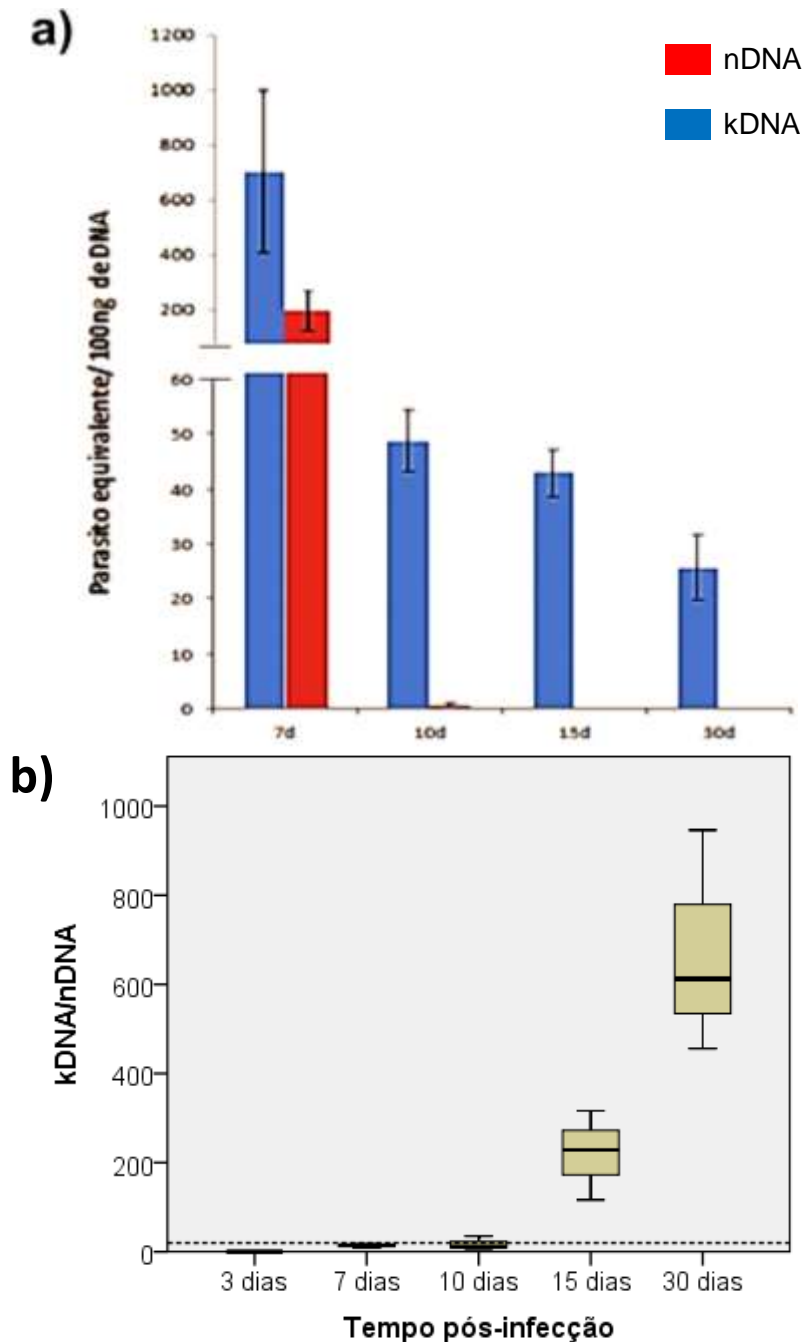


Figura 13. Tratamento com Benznidazol não impede as integrações de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma da célula hospedeira. a) Quantificação absoluta do número de parasitos presentes nas culturas de células tratadas com Benznidazol, a diferentes intervalos pós-infecção, utilizando diferentes marcadores genéticos: kDNA (azul) e nDNA (vermelho). b) Aumento da razão kDNA/nDNA ao longo do tempo. A linha tracejada representa o ponto de corte a partir do qual se considera que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA. Os experimentos foram realizados em triplicata. Média dos grupos: 3d (0,9574), 7 dias (7,2790), 10 dias (69,9896) e 15 dias (371,8533).

5.3.3 Zidovudina (AZT)

Ao se tratar as culturas de células infectadas com *T. cruzi* com o AZT, observou-se que a droga inibiu por completo os eventos de integração do kDNA nos diferentes intervalos de tempo avaliados, resultando em valores da razão kDNA/nDNA muito inferiores ao ponto de corte. Interessantemente, nos períodos de 15 dpi e 30 dpi, a razão kDNA/nDNA ficou menor que 1,0, indicando que a qPCR detectou uma maior quantidade de nDNA do parasito do que de kDNA (Figura 14).

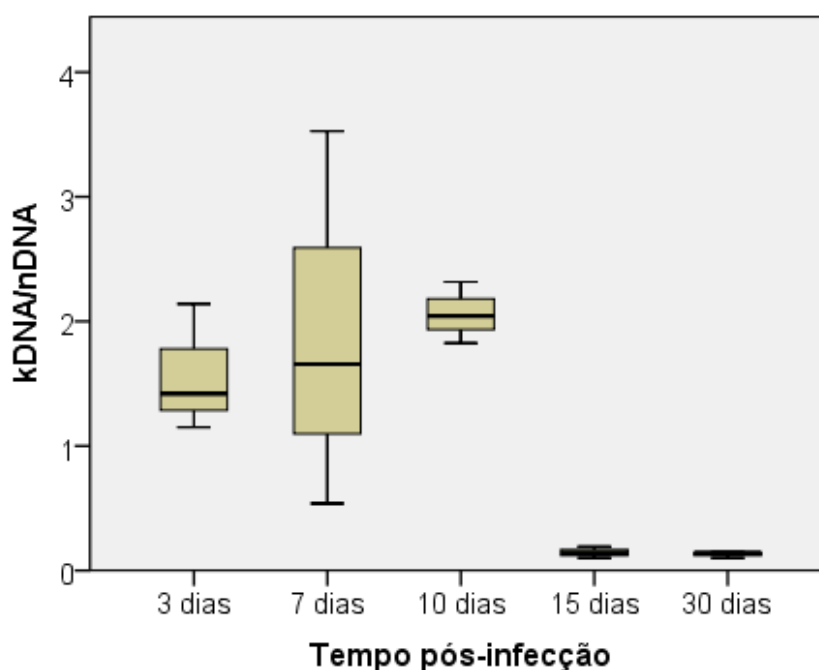


Figura 14. AZT inibe as integrações de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma da célula hospedeira. As culturas de células J774.A1 infectadas pelo *T.cruzi* e tratadas com AZT tiveram seus DNAs extraídos a diferentes intervalos de tempo pós-infecção: 3d, 7d, 10d, 15d e 30d. Os experimentos foram realizados em triplicata. Média dos grupos: 3d (1,5718), 7 dias (1,9073), 10 dias (2,0620), 15 dias (0,1446) e 30 dias (0,1296).

5.4 Análise do perfil da curva de dissociação após integração do kDNA no genoma da célula hospedeira.

Após verificarmos o acúmulo das integrações de kDNA no genomas das células de cultura, realizamos a análise do padrão das curvas de dissociação geradas a partir da amplificação do DNA extraído das culturas de J774.A1 infectadas com *T. cruzi* e não tratadas e das culturas que receberam Benznidazol ou AZT, utilizando-se os iniciadores de kDNA. De acordo com a Figura 15, nas células não tratadas pode-se notar que, à medida que ocorre o acúmulo das integrações de kDNA, há formação de um segundo pico da curva de dissociação. Entretanto, tratamento com o Benznidazol elimina a presença do primeiro pico a partir de 15 dpi, e o tratamento com o AZT impede a formação do segundo pico.

A análise da curva de dissociação (*melting curve*) permite a identificação da temperatura de amplificação da sequência de interesse (temperatura de *melting*), baseando-se na fluorescência detectada pelo equipamento. Alterações na composição das sequências resultam em mudanças de suas temperaturas de dissociação.

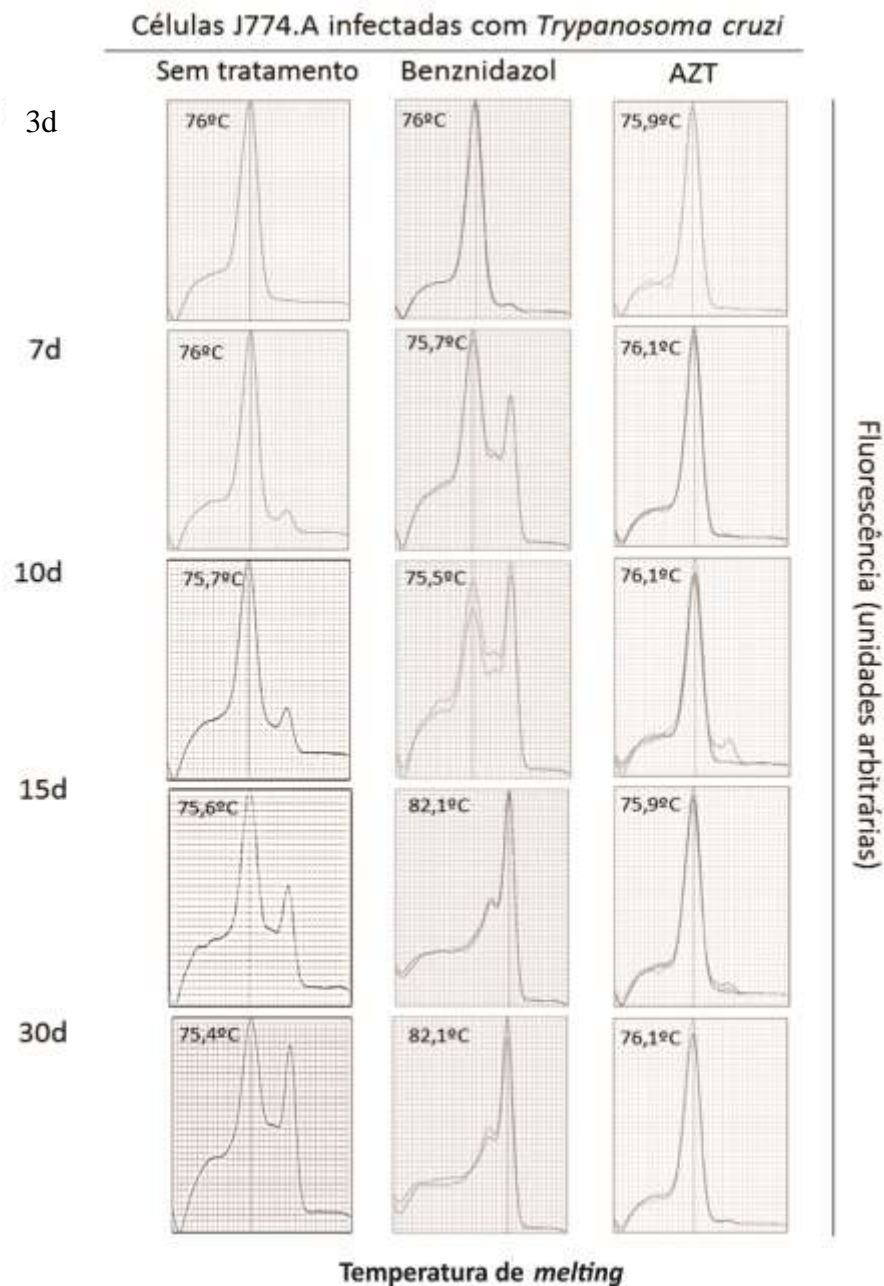


Figura 15. Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de **kDNA.** Células infectadas com *T. cruzi* e não tratadas ou tratadas com Benznidazol ou AZT tiveram suas curvas de dissociação avaliadas a diferentes intervalos de tempo pós-infecção: 3d, 7d, 10d, 15d e 30d.

A possibilidade de que a presença de um duplo-pico estivesse associada à dimerização de iniciadores foi descartada ao se avaliar a curva de amplificação (*amplification plot*) das amostras, em que foi verificado o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras não sigmoide e com pouco ruído nos ciclos iniciais de amplificação (Figura 16).

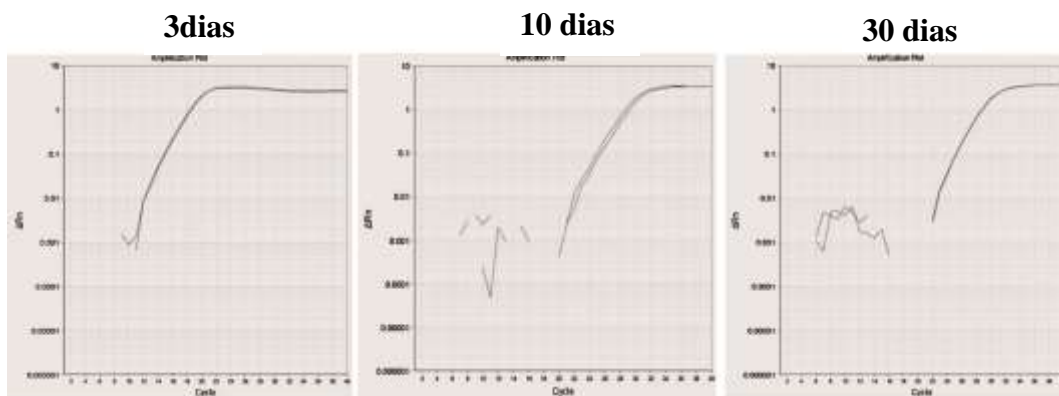


Figura 16. Análise do padrão da curva de amplificação. Observa-se a curva de amplificação de amostras de DNA extraídas de culturas de células J774.A1 infectadas com *T. cruzi* e tratadas com Benznidazol a diferentes tempos pós-infecção: 3d, 10d e 30d.

As curvas de dissociação geradas a partir da amplificação do DNA de amostras controles com iniciadores específicos para sequências nucleares do *T. cruzi* também foram avaliadas e nenhuma alteração foi observada ao longo do tempo (Figura 17). Ademais, os controles da reação, utilizando iniciadores específicos para sequencias de kDNA, também se comportaram de maneira adequada (Figura 18).

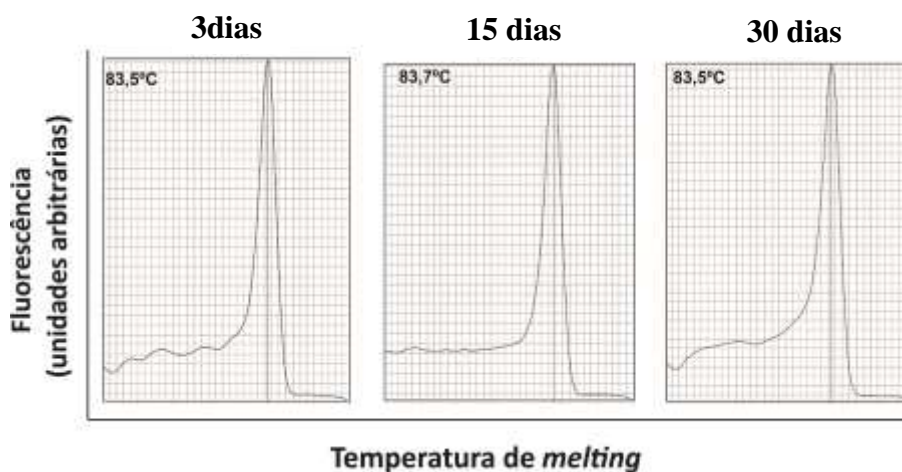


Figura 17. Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de nDNA. As temperaturas de dissociação mantiveram-se constantes ao longo do tempo.

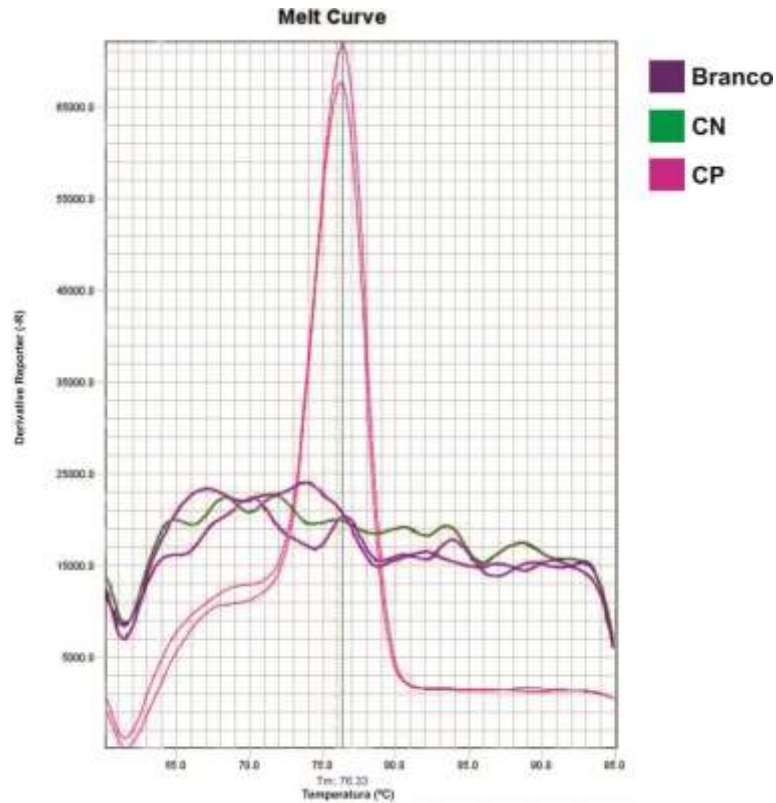


Figura 18. Perfil da curva de dissociação das amostras controle da qPCR de kDNA. CN, controle negativo; CP, controle positivo.

5.5 Caracterização dos produtos de PCR formados durante a qPCR com iniciadores para kDNA

Visando caracterizar os produtos resultantes da amplificação do DNA das culturas com iniciadores de kDNA, os produtos de PCR (*amplicons*) foram submetidos à separação eletroforética. Na Figura 19 (painel superior), podemos notar que o padrão de bandas geradas a partir do DNA de culturas infectadas com *T. cruzi* e tratadas com Benznidazol se altera com o passar do tempo, havendo uma diminuição do peso molecular dos produtos a partir de 15 dias. Já o perfil de bandas referentes às culturas que foram tratadas com AZT se manteve constante durante todo o período avaliado.

A análise dos produtos de PCR resultantes da amplificação com iniciadores para nDNA confirmou a ação tripanocida do Benznidazol (ausência de bandas aos 15 e 30 dpi) e a ausência de efeitos do AZT sobre o parasito (Figura 19, painel inferior).

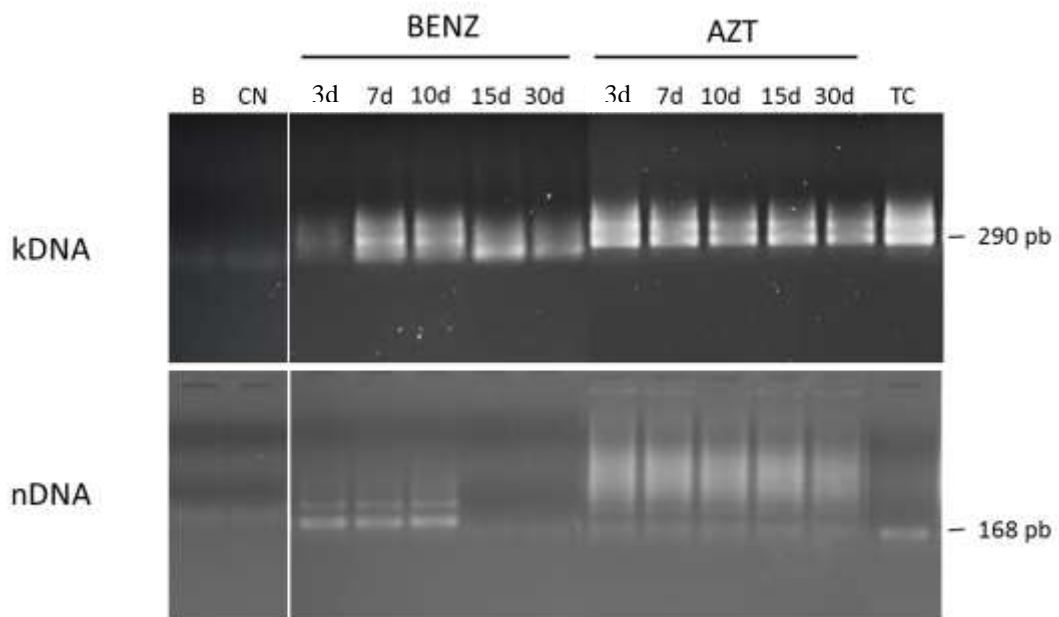


Figura 19. Padrão de bandas referentes aos produtos de PCR resultantes da amplificação com iniciadores de kDNA e nDNA. Foram avaliados os perfis de bandas geradas a partir da amplificação do DNA de culturas de células J774.A1 infectadas com *T. cruzi* e tratadas com Benznidazol ou AZT, ao longo de diferentes intervalos de tempo pós-infecção: 3d, 7d, 10d, 15d, 30d. No painel superior, observamos o produtos da qPCR com iniciadores para kDNA e, no painel inferior, com iniciadores para nDNA. B, branco; CN, controle negativo; TC, *Trypanosoma cruzi*.

O sequenciamento direto das bandas observadas a 3 dpi e 30 dpi revelou que, no último intervalo de tempo, trechos de kDNA estavam associados ao DNA hospedeiro, enquanto que, nas horas iniciais da infecção, só detectamos o DNA do parasito (Figura 20).

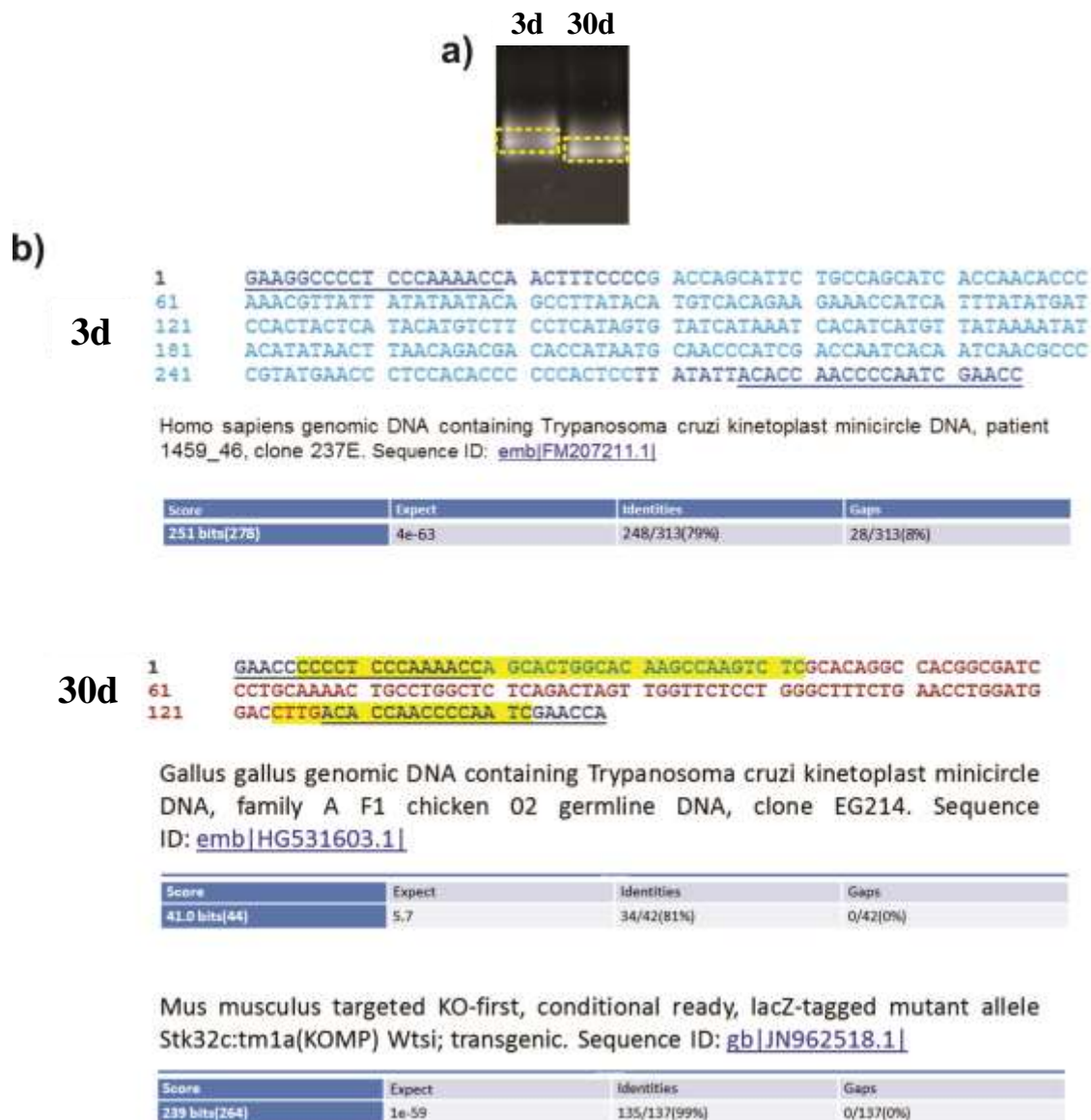


Figura 20. Sequências obtidas de células J774.A1 infectadas com *Trypanosoma cruzi* e tratadas com Benznidazol. (a) Bandas eluídas do gel e enviadas para sequenciamento automático. Foram sequenciadas as amostras referentes aos tempos de 3d e 30 dias pós-infecção. (b) Sequências de nucleotídeos. A 3 dpi, a sequência obtida continha exclusivamente trecho de kDNA do *T. cruzi* (azul). A 30 dpi, notou-se a associação de sequências de kDNA (azul) com sequências de DNA murino (vermelho). Em amarelo, regiões de micro homologia. Os trechos sublinhados representam os iniciadores utilizados na reação.

5.6 Avaliação das integrações de kDNA *in vivo*

Após analisarmos a dinâmica de integração dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* *in vitro*, foi avaliado se o mesmo fenômeno também ocorresse *in vivo*. Para tanto, foi obtido o DNA a diferentes intervalos de tempo pós-infecção: 7d, 15d, 30d e 90d. Como pode ser

observado nas Figuras 21 e 22, ocorreu um aumento da razão kDNA/nDNA à medida que os animais passavam da fase aguda para a fase crônica da infecção, fato que ficou mais evidente ao se analisar os tecidos dos animais. No sangue, apesar de haver uma tendência de aumento na quantidade de kDNA, as análises estatísticas utilizando o teste Kruskal-Wallis mostraram não haver diferenças significativas entre os grupos ($p=0,058$).

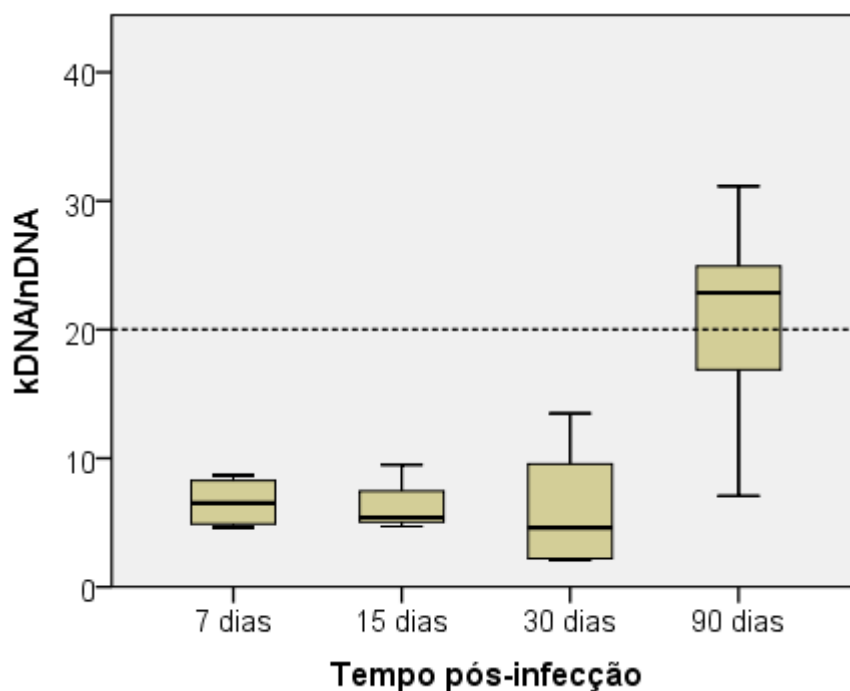


Figura 21. Razão kDNA/nDNA de sangue de camundongos nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. DNA extraído a partir do sangue camundongos infectados com *T. cruzi* a diferentes intervalos de tempo: 7dpi (Média: 6,5875; dp: 1,9887), 15dpi (Média: 6,5400; dp: 2,5872), 30dpi (Média: 6,0901; dp: 4,7112) e 90dpi (Média: 20,5784; dp: 9,1038). A linha tracejada representa o ponto de corte a partir do qual se considera que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Entretanto, a análise dos experimentos em tecidos, a diferentes intervalos de tempo pós-infecção (7d, 25d, 30d e 90d), revelou haver diferença significativa entre os grupos no nível de significância de 5% ($p<0,02$) pelo teste Kruskal-Wallis (Figura 22).

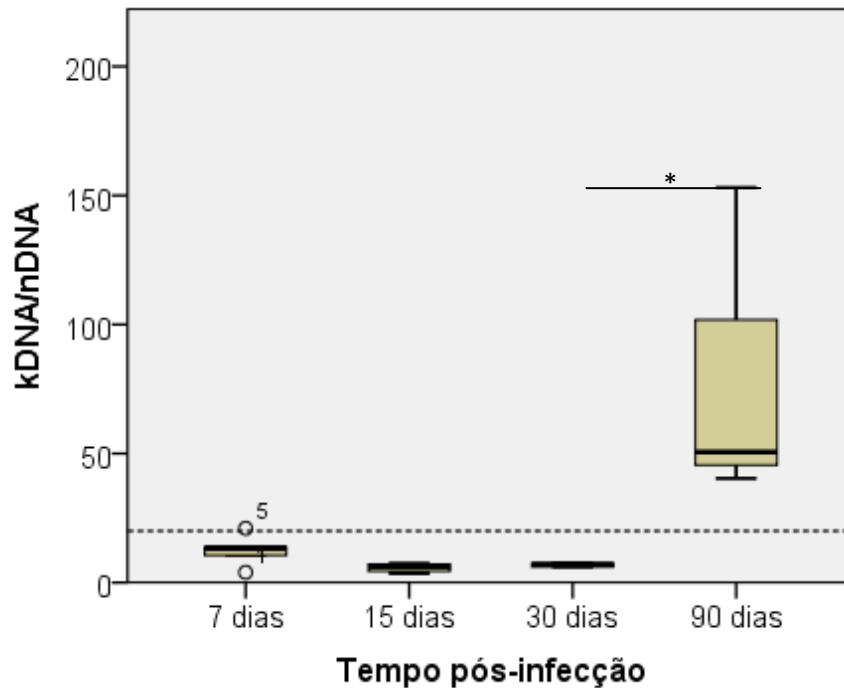


Figura 22. Razão kDNA/nDNA de tecido em camundongos nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. DNA extraído a partir do tecido camundongos infectados com *T. cruzi* a diferentes intervalos de tempo: 7dpi (M: 12,5280; dp 6,1491), 15dpi (M: 5,7750; dp 1,7571), 30dpi (M: 6,8600; dp: 0,7382) e 90dpi (M: 81,3667; dp 62,3306). A linha tracejada representa o ponto de corte a partir do qual se considera que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os grupos foram comparados dois a dois para verificar a significância da diferença por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Dessa forma, foram realizados dois testes para verificar em quais períodos o nível de kDNA/nDNA difere: Teste 1 (Período de 7 dias comparado ao de 90 dias) e teste 2 (Período de 30 dias comparado ao de 90 dias). Para cada teste, o nível de significância foi ajustado usando a correção de Bonferroni, adotando o valor de $0,05/2=0,025$. Nesse caso, os dados não apresentam diferenças significativas nas medidas da razão kDNA/nDNA entre os grupos de 7 e 90 dias ($p>0,025$). Entretanto entre os grupos de 30 e 90 dias existe diferença significativa nas medidas da razão kDNA/nDNA ($p<0,025$).

As curvas de dissociação das amostras de sangue e tecido dos camundongos mostraram padrões similares, com a presença de um duplo-pico ainda na fase aguda da infecção e a existência de um único pico com temperatura de dissociação de cerca de $83,3^{\circ}\text{C}$ aos 90 dpi (Figura 23).

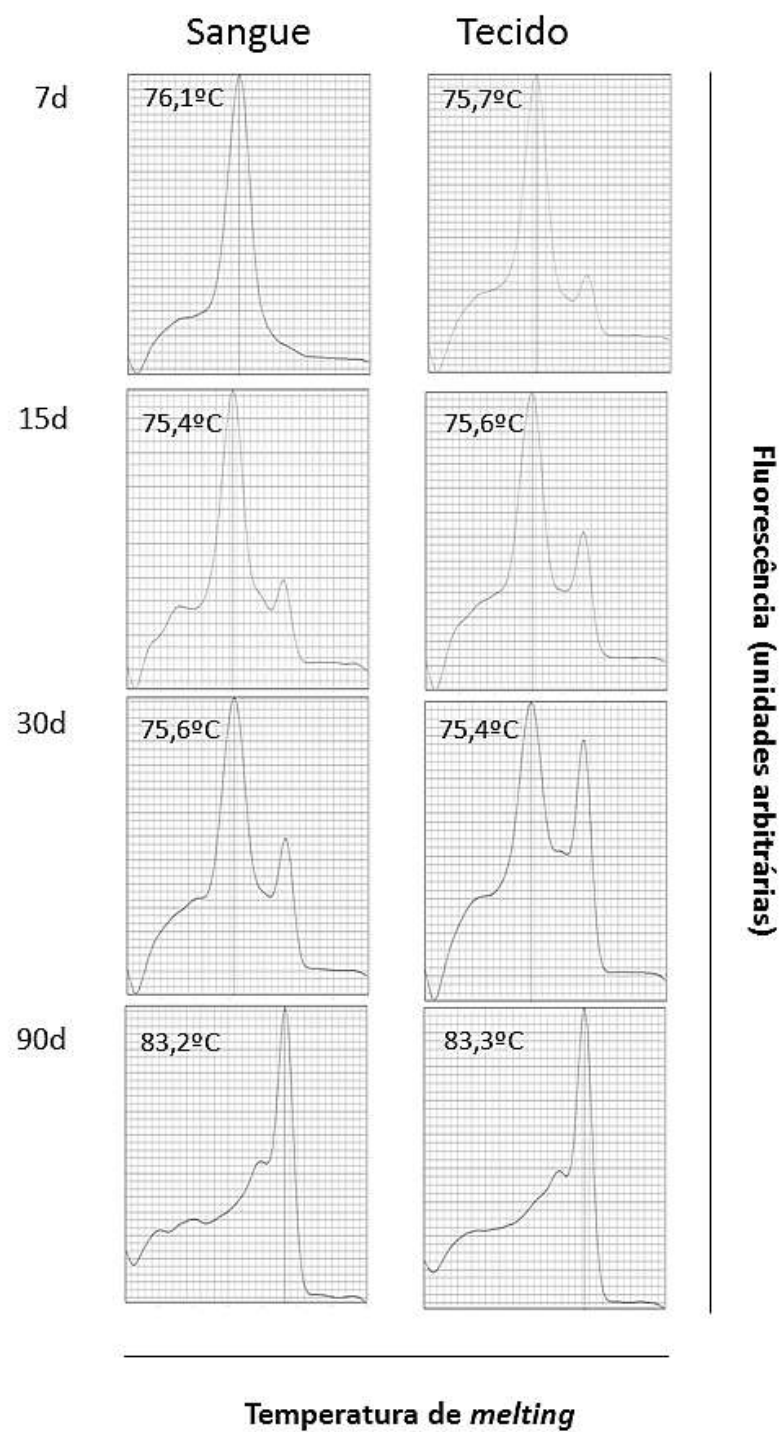


Figura 23. Padrão da curva de dissociação da qPCR com iniciadores de kDNA de amostras de sangue e tecido de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi*. A coleta das amostras foi realizada durante a fase aguda (7dpi, 15dpi e 30dpi) e na fase crônica (90 dpi) da infecção.

VI. DISCUSSÃO

6.1 Variabilidade genética entre cepas de *Trypanosoma cruzi* e sua importância para a determinação da razão kDNA/nDNA

Neste trabalho, foi observada variação na quantidade de nDNA e kDNA entre as diferentes linhagens de *T. cruzi* utilizadas, bem como dentro da mesma linhagem, fato já conhecido na literatura. Tal variação pode ser demonstrada tanto em nível de proteínas quanto em nível de DNA (MACEDO & PENA, 1998). A diferença média de sequências entre dois haplótipos é de 5,4%, e as regiões de codificação de proteínas são consideravelmente mais conservadas do que as regiões intergênicas, com diferença de 2,2% (EL-SAYED *et al.*, 2005). No que se refere aos minicírculos de kDNA, ainda que apresentem uma organização extremamente conservada, com todas as moléculas possuindo o mesmo número e comprimento de regiões conservadas e variáveis, sabe-se que a quantidade dessas moléculas pode variar de parasito para parasito (JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDÃO, 2005).

Desta forma, estudos que realizem a quantificação absoluta da carga parasitária de *T. cruzi*, independentemente do alvo de amplificação (nDNA ou kDNA), devem levar em consideração a alta variabilidade genética inerente a essa espécie, o que pode interferir nos resultados. Para minimizar o efeito das diferenças genômicas características do *T. cruzi*, nós definimos o ponto de corte para determinar a integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* baseado em três linhagens diferentes (Berenice, Tulahuen e Ernestina), ainda que nós tenhamos utilizado apenas a cepa Berenice para realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. O uso de cepas distintas gera uma maior confiabilidade em nossos resultados, permitindo a quantificação das integrações de minicírculos de kDNA no genoma hospedeiro com maior segurança.

6.2 Acúmulo de sequências de minicírculos de kDNA no genoma hospedeiro

Diversos estudos já demonstraram a transferência gênica lateral do kDNA de *T. cruzi* para o genoma hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1994; HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011b; GUIMARO *et al.*, 2014), fenômeno pouco conhecido entre dois organismos eucariotos, mas que vem sendo cada vez mais reconhecido como um canal de troca genética entre o parasito e seus hospedeiros (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY,

2013). Entretanto, tais trabalhos concentraram-se em demonstrar os eventos de integração de maneira qualitativa, diferindo de nosso estudo que utiliza uma abordagem quantitativa.

Os experimentos *in vitro* demonstraram haver um aumento significativo da razão kDNA/nDNA a partir do 15º dia pós-infecção, sugerindo um acúmulo das integrações ao longo do tempo. Esse fato pode estar associado à própria replicação do parasito, que ocorre a cada 15 horas, aproximadamente (ENGEL; DOYLE; DVORAK, 1985), e que seria o momento provável de liberação dos minicírculos. O modelo atual propõe que, durante o processo de multiplicação celular, os minicírculos sofrem a ação da enzima topoisomerase II, que os cliva e os lineariza, propiciando a liberação destes para a periferia da rede de kDNA, onde serão replicados na presença de uma série de proteínas, como DNA primases e polimerases. Os minicírculos replicados apresentam *gaps* que deverão ser removidos antes que eles retornem ao disco de kDNA (LIU *et al.*, 2005; LUKES *et al.*, 2002, ENGLUND, 2014). Esses mecanismos de replicação podem levar a uma perda de alguns desses minicírculos livres, os quais poderiam ser encaminhados para o genoma da célula hospedeiro, levando a perpetuação do material genético do parasito no genoma das células. O processo de multiplicação do parasito, entretanto, não seria o único sistema a ocasionar o acúmulo das integrações de kDNA, uma vez que o uso do Benznidazol não evitou um aumento da razão kDNA/nDNA ao longo do tempo, mesmo com a diminuição da carga parasitária até os 15 dpi e a completa erradicação do parasito no 30º dia.

Nos experimentos *in vivo*, também se observou uma tendência de acúmulo das integrações com o passar dos dias, o que ficou mais evidente nas amostras de tecidos do que nas de sangue. Esse achado pode ser explicado pelo fato de, à medida que a infecção vai se tornando crônica, ocorre uma diminuição da parasitemia sanguínea e um maior número de formas amastigotas passa a ser encontradas nos tecidos (BRENER, 1973; YOUNÈ-CENNOUFI *et al.*, 1988; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Outro fator que também pode estar vinculado à maior quantidade de integrações de kDNA nos tecidos dos camundongos infectados com *T. cruzi* é a longevidade das células estudadas. Em média, os leucócitos, após serem liberados da medula óssea, passam de seis a oito horas na corrente sanguínea e duram de dois a três dias no tecido (SOUZA & ELIAS, 2006, p116). Enquanto que, o tecido muscular, o processo de renovação celular é mais complexo e demorado, ou seja, possuem baixa taxa de renovação tecidual (JOE *et al.*, 2010).

Poucos estudos avaliam de maneira quantitativa as alterações genômicas que se acumulam com o passar dos anos. De interesse, a teoria da mutação somática de

envelhecimento propõe que o acúmulo de mutações em células somáticas é uma das causas envelhecimento. Estudos em ratos mostraram que frequência de mutação, em linfócitos do baço, aumenta com o aumento da idade. Essas mutações são heterogêneas, inclui mutações no sítio da transferase hipoxantina fosforribosil (HPRT), além de alterações cromossômicas visíveis, recombinações mitóticas, deleção do gene inteiro, exclusão intragênica e mutações pontuais (ODAGIRI *et al.*, 1998).

Além disso, um estudo realizado em humanos observou, através de qPCR, o acúmulo de mutação pontual no nucleotídeo 3243 A/G de DNA mitocondrial. O acúmulo dessa mutação foi relacionado com os MELAS (miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios de acidente vascular cerebral e similares) e diabetes. Os pesquisadores observaram que o nível de mutação 3243 A/G foi insignificante no grupo de recém-nascido, enquanto que houve aumento considerável ao longo do tempo em indivíduos saudáveis nas idades 20 a 29 e 41 a 60. (NOMIYAMA *et al.*, 2002). Neste sentido, nosso trabalho é um dos primeiros a realizar uma avaliação quantitativa das mudanças que ocorrem nos genomas ao longo do tempo.

6.3 A integração de minicírculos de kDNA é mediada por retroelementos

Estudos prévios demonstraram que o sítio preferencial de integração do kDNA é o retroelemento LINE-1 (HECTH *et al.*, 2010; ROSE, 2013; GUIMARO *et al.*, 2014). Esse fato está de acordo com nossos resultados, que mostraram que o uso de droga inibidora de retrotransposição (AZT) impediu a integração de minicírculos de kDNA no genoma das células J774.A1 infectadas com o *T. cruzi*.

Além dos estudos realizadas com o kDNA outros estudos também demonstraram o papel mediador de elementos transponíveis na transferência gênica lateral. Os Hélitrons, transposons circulares, são sequências de DNA comum em plantas, conhecidos por sua capacidade de captar e amplificar fragmentos de genes do hospedeiro gerando centenas de cópias que podem representar uma fração substancial do genoma (THOMAS *et al.*, 2011). Essas moléculas de DNA circular transportam uma variedade de sequência do hospedeiro, incluindo RNAs mensageiro, retrotransposons, transposons de DNA, íntrons, éxons e regiões reguladoras (THOMAS *et al.*, 2014). Sequências de Hélitrons foram encontradas no genoma de muitos mamíferos incluído primatas e morcegos (THOMAS *et al.*, 2011). Igualmente importante, os *numts*, cópias nucleares de mtDNA, são identificados em regiões ricas em

retrotransposons, o que indica a participação da maquinaria dos elementos móveis na transferência dos genes mitocondriais para o núcleo (TSUJI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). O acúmulo de *numts* é um processo evolutivo contínuo. Já foi constatado que número de cópias de *numts* varia de nenhuma ou poucas em *Anopheles* a mais de 500 cópias em humano (RICHLY & LEISTER, 2004).

Desse modo, a integração do kDNA mediada por retroelementos LINE-1 se mostra bastante interessante, uma vez que a molécula exógena poderia utilizar a maquinaria existente na célula hospedeira para alcançar o núcleo e se inserir no genoma. Evidentemente, o trajeto percorrido pelo kDNA, desde a liberação pelo parasito até invadir o núcleo, atravessando o citoplasma da célula hospedeira e encontrando o sítio de integração no cromossomo, requer estudo detalhado. De acordo com nossos conhecimentos, propõe-se o seguinte modelo de integração: inicialmente, a proteína da ORF1 (ORF1p), que tem afinidade por RNA e DNA fita simples e atua como uma chaperona (MARTIN, 2010, NAUFER *et al.*, 2016), se liga ao kDNA e o transportaria para o núcleo. No núcleo, as sequências dos minicírculos se integram no genoma do hospedeiro, mediante auxílio das proteínas da ORF2, que possuem atividade de endonuclease e a transcriptase reversa (Figura 24).

Isso seria mais um mecanismo que ajudaria a explicar o acúmulo das integrações. Futuramente, novos tratamentos combinando drogas tripanocidas e drogas inibidoras de retrotransposição poderão ser avaliados quanto seu papel na redução da quantidade de integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*.

6.4 Alteração do perfil de integrações de minicírculos de kDNA ao longo do tempo

A análise do perfil da curva de dissociação de kDNA mostrou ocorrer uma mudança na temperatura de dissociação ao longo do tempo, tanto nos experimentos *in vitro* quanto nos experimentos *in vivo*. Essa alteração representa mudanças no fragmento amplificado, seja na composição ou no tamanho da sequência. A separação eletroforética dos *amplicons* evidenciou uma redução de tamanho, que foi confirmada quando se sequenciou os produtos amplificados das amostras de 3d e 30 dias pós-infecção, sugerindo a perda de grandes porções do kDNA que havia integrado.

Uma possível explicação para o truncamento das sequências de kDNA estaria associada à forte curvatura encontrada na estrutura tridimensional dessa molécula (HUNT *et al.*, 2011; HARAN & MOHANTY, 2009) (Figura 24, modelo). Diversos estudos demonstram

que deformações da estrutura e mudança da flexibilidade do DNA por sequências que acentuam a curvatura são reconhecidas por regiões distantes na fita-dupla de DNA, porém próximas na estrutura tridimensional, que ativam o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês, *nucleotide excision repair*). Assim, existe um complexo de enzimas de reparo do DNA que monitoram a flexão do DNA e, quando detectam algum tipo de alteração, são ativadas para iniciar a retirada de nucleotídeos e “distorcer a sequência lesionada” (MISSURA *et al.*, 2001 ; SEIBERT *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2010; JACIUK *et al.*, 2011). Rose (2013) verificou através de análise conformacional sequências de minicírculos de kDNA integradas no *locus* do gene da enzima málica e do gene da distrofina. No *locus* onde ocorreu a inserção, foi verificada uma acentuação na curvatura. Do mesmo modo, posteriormente, foi observado deleção de parte das regiões inseridas no DNA resultando também na perda da curvatura da molécula.

Em relação aos retroelementos, também é conhecido o fato de que eles podem causar grande instabilidade genômica devido a eventos de recombinação genética provenientes de deleções, inserções e translocações em grande escala (CALLAHAN *et al.*, 2012; KINES *et al.*, 2014). O deslocamento de retrotransposons L1 pode danificar o genoma e gerar quebras na fita-dupla de DNA, ativando outras vias de reparo de DNA, mediadas ou não por homologias, as quais também podem levar a perdas de sequências do DNA (SFEIR & SYMINGTON, 2015; CECCALDI; RONDINELLI; D’ANDREA, 2016).

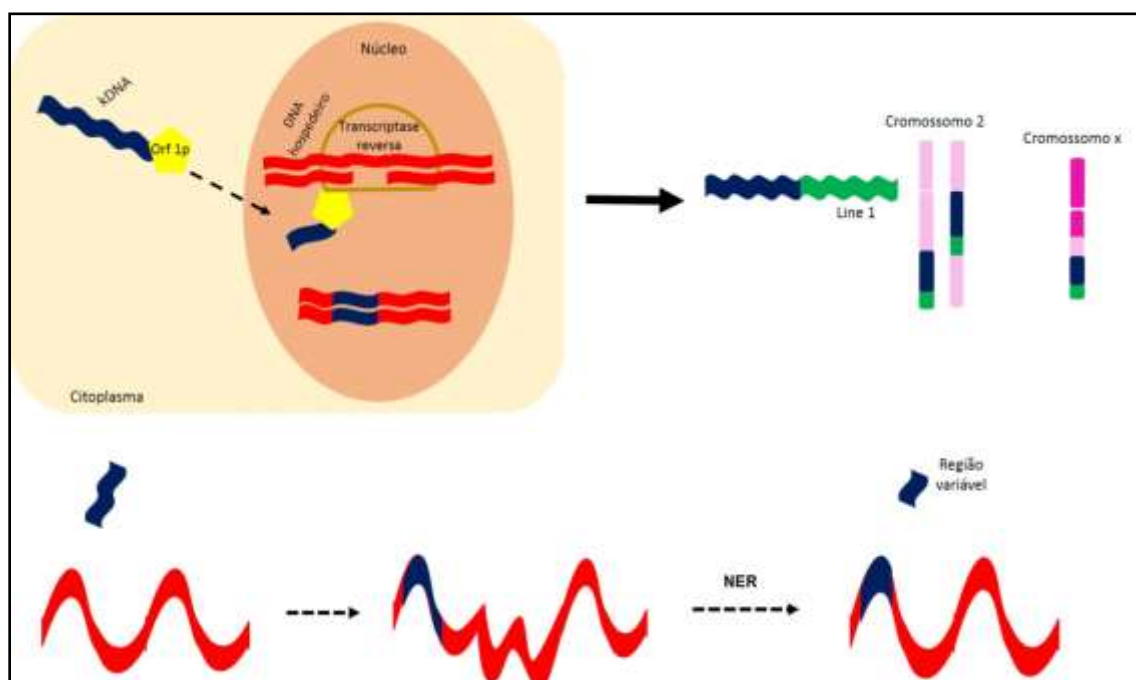


Figura 24. Modelo de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro. Durante o processo natural de integração de elementos L1 (verde), o

kDNA (azul) associado à proteína ORF1p (amarelo) utiliza a transcriptase reversa de L1 para se integrar e formar uma nova sequência quimérica. O acúmulo das sequências de kDNA se daria pela mobilização de elementos L1 associados ao kDNA para novos sítios do genoma, seja em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes. Como o kDNA apresenta curvatura acentuada, notadamente na região variável, sua integração pode alterar a estrutura tridimensional do local onde ele se inseriu, ativando enzimas da via de reparo NER, que promoveria a excisão de nucleotídeos e o truncamento da sequência de kDNA.

6.5 Possíveis impactos do acúmulo de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma hospedeiro

Sabe-se que a integração dos minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro resulta em manifestações clínicas características da doença de Chagas, mesmo na ausência do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Entretanto, o mecanismo exato que desencadeia as reações autoimunes em indivíduos chagásicos ainda não foi elucidado. O mapeamento dos sítios de integração do kDNA, por metodologia randômica (*tp*TAIL-PCR), foi realizado em vários modelos experimentais e em humanos, porém não foi possível se detectar uma relação direta entre o *locus* de integração e a severidade do quadro clínico (GUIMARÃES, 2014). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, especula-se que o aumento da quantidade de integrações de kDNA de *T. cruzi* no genoma hospedeiro seja o fator responsável por desencadear as reações autoimunes observadas em pacientes chagásicos e que costumam se manifestar décadas após a infecção inicial. Mais estudos serão necessários para se confirmar essa hipótese.

O acúmulo de mutações e sua associação com a severidade de câncer já foi descrito na literatura nos casos de câncer de pulmão, próstata e ovário. O aumento de mutações e a alteração da interação entre moléculas de forma dinâmica ao longo do tempo, com mudanças na expressão de determinados genes, podem afetar o anacronismo celular e levar ao aparecimento de tumores (FLECK; PAVEL; CASSANDRAS. 2016). Modelos matemáticos, visando refletir a correlação entre o acúmulo de mutações distintas e o risco de câncer, revelaram uma relação de 1:1 em 41 tipos diferentes de linhagens cancerígenas com base nos dados de sequenciamento de 5.542 pacientes (HAO; WANG; DI, 2016). Estudos de tumores gástricos indicam que o acúmulo de mutações somáticas em vários genes da mucosa gástrica, decorrente da infecção por *Helicobacter pylori*, aumentam a atividade da citidina-deaminase e pode promover a carcinogênese nesse tecido (SHIMIZU *et al.*, 2014).

Alguns estudos de retrotransposição de L1 proporcionam um suporte experimental para a maior mobilização de retroelementos em tumores humanos em relação a tecidos somáticos normais (SOLYOM *et al.*, 2012; TUBIO *et al.*, 2014). Pesquisas que buscam a associação entre elementos móveis e envelhecimento também demonstram o aumento da quantidade de determinadas sequências no genoma, como o acúmulo de milhões de sequências de L1 no genoma de neurônios com o passar dos anos. A inativação sequencial de múltiplas vias de reparo de DNA relacionada à senescência, como a NER, parece ser responsável pelo aumento da atividade de elementos L1 (BELANCIO *et al.*, 2014).

Ainda que não existam estudos conclusivos sobre como a integração do kDNA resulta nas manifestações clínicas da doença de Chagas, uma coisa é certa: a presença do DNA do parasito contribui para o remodelamento genômico e processo evolutivo das espécies. A aquisição de material genético exógeno é um fenômeno evolucionário reconhecido. A ocorrência de trocas de DNA mitocondrial do tripanossomatídeo para seus hospedeiros pode resultar no surgimento de novas proteínas (quimeras), na alteração da expressão de genes já existentes ou, até mesmo, no silenciamento de genes (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; VOGT *et al.*, 2014; AMIÑOSO *et al.*, 2013).

VII. CONCLUSÕES

- A estratégia de avaliar a integração do kDNA por PCR quantitativa mostra-se apropriada;
- Ocorre acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma hospedeiro ao longo do tempo, seja em experimentos *in vitro* ou em experimentos *in vivo*;
- O AZT é capaz de inibir as integrações de kDNA *in vitro*;
- Alterações no perfil de integração dos minicírculos de kDNA são observadas ao longo do tempo.

VIII. PERSPECTIVAS

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

- Demonstrar se há uma relação direta entre o acúmulo das integrações de kDNA e as manifestações clínicas da doença de Chagas;
- Elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na integração dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma hospedeiro;
- Avaliar se o uso de drogas tripanocidas combinadas com drogas antirretrovirais diminuem a quantidade de integrações de kDNA no genoma hospedeiro.

IX. REFERÊNCIAS

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

AMIÑOSO, C.; VALLESPIN, E.; FERNÁNDEZ, L.; ARRABAL, L. F.; DESVIAT, L. R.; PÉREZ, B.; SANTOS, F.; SOLERA, J. **Identification of the first deletion-insertion involving the complete structure of GAA gene and part of CCDC40 gene mediated by an Alu element.** *Gene*, 519 (1). 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/j.gene.2013.01.051>.

ALBERT, L. J.; INMAN, R. D. **Molecular Mimicry and Autoimmunity.** *The new England journal of Medicine.* 341:2068-2074, 1999, DOI: 10.1056/NEJM199912303412707.

ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. **Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(7): e3010, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010>.

ARJAN-OEDRA, S.; SWANSON, C. M., SHERER, N. M., WOLINSKY, S. M., & MALIM, M. H. **Endogenous MOV10 inhibits the retrotransposition of endogenous retroelements but not the replication of exogenous retroviruses.** *Retrovirology*, 2012, 9, 53. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1742-4690-9-53>.

ARNER, E.; KINDLUND, E.; NILSSON, D.; FARZANA, F.; FERELLA, M.; TAMMI, M. T.; ANDERSSON, B. **Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants.** *BMC Genomics*, 8, 391. 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-391>.

ATWOOD, J. A. III; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. **The *Trypanosoma cruzi* proteome.** *Science*, 309:473–476, 2005. doi: 10.1126/science.1110289.

BECK, C. R.; COLLIER, P.; MACFARLANE, C.; MALIG, M.; KIDD, J. M.; EICHLER, E. E.; BADGE, R. M.; MORAN, J. V. **LINE-1 Retrotransposition Activity in Human Genomes.** *Cell*, 141 (7). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/j.cell.2010.05.021>>

BELANCIO, V. P.; BLASK, D. E.; DEININGER, P.; HILL, S. M; JAZWINSKI, S. M. **The aging clock and circadian control of metabolism and genome stability.** *Frontiers Genetics*, 14 (5). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/fgene.2014.00455>>

BERN, C. **Chagas' Disease.** *The New England Journal of Medicine.* 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>>

BONNEY, K. M. **Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?** *Parasite*, 21:11, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1051/parasite/2014012> .

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?** *Current Molecular Medicine*, 8(6), 510–518, 2008.

BONNEY, K. M.; GIFFORD, K. M.; TAYLOR, J. M.; CHEN, C.I.; ENGMAN, D. M. **Cardiac damage induced by immunization with heat-killed *Trypanosoma cruzi* is not antibody mediated.** *Parasite Immunology*, 35: 1–10, 2013. doi: 10.1111/pim.12008

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde, 46 (21). 2015. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/editora>

BRENER, Z. **Biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Annual Review of Microbiology* Vol. 27: 347-382, 1973, DOI: 10.1146/annurev.mi.27.100173.002023 .1973;27:347-82.

BURNS, K. H.; BOEKE, J. D.; **Review Human Transposon Tectonics.** *Cell*, 149. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.019>>

CAI, Y.; KROPACHEV K.; XU, R.; TANG, Y.; KOLBANOVSKII, M.; KOLBANOVSKII, A.; AMIN, S.; PATEL, D. J.; BROYDE, S.; GEACINTOV, N. E. **Distant neighbor base sequence context effects in human nucleotide excision repair of a benzo[a]pyrene-derived DNA lesion.** *Journal of Molecular Biology*, 399 (3). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/j.jmb.2010.04.004>>

CALLAHAN, K. E.; HICKMAN, A. B.; JONES, C. E.; GHIRLANDO, R.; FURANO, A. V. **Polymerization and nucleic acid-binding properties of human L1 ORF1 protein.** *Nucleic Acids Research*, 40 (2). 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gkr728>>

CASTILLO, C., RAMÍREZ, G., VALCK, C., AGUILAR, L., MALDONADO, I., ROSAS, C., FERREIRA, A. **The Interaction of Classical Complement Component C1 with Parasite and Host Calreticulin Mediates *Trypanosoma cruzi* Infection of Human Placenta.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2376, 2013. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002376>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 2013. **Global health - Division of parasitic diseases and malaria** - Estados Unidos da América. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html> Acesso em: 06 de janeiro de 2016.

CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. **Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break.** *Trends Cell Biol*, 26 (1). 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>>

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 81-112, 2008.

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

CHEN, L.; DAHLSTROM, J. E.; LEE, S.; RANGASAMY, D. **Naturally occurring endo-siRNA silences LINE-1 retrotransposons in human cells through DNA methylation.** *Epigenetics*, 7 (7). 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.4161/epi.20706>

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(3):286-296, may-jun, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000300002>

DA SILVA, A. R., **Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*.** 2013. 77 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas. Brasília. Universidade de Brasília.

DASKALOS, A.; NIKOLAIDIS, G.; XINARIANOS, G.; SAVVARI, P.; CASSIDY, A.; ZAKOPOULOU, R.; KOTSINAS, A.; GORGOULIS, V.; FIELD, J.K; LILOGLOU, T. **Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer.** *International Journal of Cancer*. 1;124(1):81-7, 2009. doi: 10.1002/ijc.23849

DANIEL, W. W. "**Friedman two-way analysis of variance by ranks**". *Applied Nonparametric Statistics*, 2^a ed. Boston: PWS-Kent. p. 262–274. 1990.

DIAO, Y.; RODRIGUEZ, V.; KLINGBEIL, M.; ARSUAGA, J. **Orientation of DNA Minicircles Balances Density and Topological Complexity in Kinetoplast DNA.** *PLoS ONE*, 10 (6). 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130998>

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M.M.; BORGES, E. C.; MOREIRA, E. F; GONTIJO, C.; AZEREDO, B. V. M. **Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação clínico-epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas.** Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000200007>

DOUCET, A. J.; DROC, G.; SIOL, O.; AUDOUX, J.; GILBERT, N. **U6 snRNA Pseudogenes: Markers of Retrotransposition Dynamics in Mammals.** *Molecular Biology and Evolution*, 32 (7). 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/molbev/msv062>

DUFFY T.; CURA C. I.; RAMÍREZ J. C.; ABATE T.; CAYO N. M.; PARRADO, R.; BELLO, Z. D.; VELAZQUEZ, E.; MUNOZ-CALDERÓN, A.; JUIZ, N. A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIARTE, A.; NASSER, J. R.; OCAMPO, S. B.; YADON, Z. E.; TORRICO, F.; NOYA, B. A.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G. **Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (1). 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>

EISENBERG, E. **Proteome diversification by genomic parasites.** *Genome Biology*, 17, 17. 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s13059-016-0875-6>

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.;... ANDERSSON, B. **The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease.** *Science*, 309. 2005.

ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; DVORAK, J.A. **Trypanosoma cruzi: biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle.** Journal Protozool, 32(1):80-3. 1985.

ENGLUND, P. T. **A Passion for Parasites.** The journal of Biological Chemistry, 289 (49). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/jbc.X114.620666>>

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. **Review article Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity.** Acta Tropica, 81. 2001.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. **DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes.** Annual Review of Genetics, 41, 331–368, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>

FIELD, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS 2009.** 2ª ed. p298.

FINNEGAN, D. J.; **Retrotransposons.** Current Biology, 22 (11). 2012.

FLECK, J. L.; PAVEL, A. B.; CASSANDRAS, C. G. **Integrating mutation and gene expression cross-sectional data to infer cancer progression.** BMC System Biology, 10 (1). 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s12918-016-0255-6>>

FRANZÉN, O.; OCHAYA, S.; SHERWOOD, E.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; ANDERSSON, B. **Shotgun Sequencing Analysis of Trypanosoma cruzi I Sylvio X10/1 and Comparison with T. cruzi VI CL Brener.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 5 (3). 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000984>>

GEISTER, K. A.; BRINKMEIER, M. L.; CHEUNG, L. Y.; WENDT, J.; OATLEY, M. J.; BURGESS, D. L.; KOZLOFF, K. M.; CAVALCOLI, J. D.; OATLEY, J. M.; CAMPER, S. A. **LINE-1 Mediated Insertion into Pocl1 (Protein of Centriole 1 A) Causes Growth Insufficiency and Male Infertility in Mice.** PLoS Genetics, 11 (10). 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005569>>

GILBERT, C; SCHAACK, S; PACE 2ND, JK; BRINDLEY, PJ; FESCHOTTE, C. **A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla.** Nature. 464(7293): 1347-1350, 2010. doi:10.1038/nature08939

GOODIER, J. L.; KAZAZIAN, H. H. JR. **Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites.** Cell, 135. 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.022>>

GUIMARÃES, A. J. B.A. **Associação de locus das mutações de kDNA de Trypanosoma cruzi no genoma com manifestação clínica da Doença de Chagas.** 2014. 142 páginas. Tese de doutorado em Ciências Médicas. Brasília. Universidade de Brasília.

GUIMARO, M. C.; ALVES, R. M.; ROSE, E.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; HECHT, M. M.; SOUSA, M. V.; ANDRADE, R. R.; VITAL, T.; PLACHY, J.; NITZ, N.; HEJNAR, J.; GOMES, C.; TEIXEIRA, A. R. L. **Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 8 (12). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003384>>

HAN, J. S. **Review Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions.** *Han Mobile DNA*, 1(15). 2010. Disponível em: <<http://www.mobilednajournal.com/content/1/1/15>>

HAO, D.; WANG, L.; DI, L. J. **Distinct mutation accumulation rates among tissues determine the variation in cancer risk.** *Sci Rep*, 6. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/srep19458>>

HARAN, T. E.; MOHANTY, U. **The unique structure of A-tracts and intrinsic DNA bending.** *Quarterly Reviews of Biophysics*, 42 (1). 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/S0033583509004752>>

HAVECKER, E.; GAO R. X.; VOYTAS, D. F. **The diversity of LTR retrotransposons.** *Genome Biology*, 5:225, 2004. doi: 10.1186/gb-2004-5-6-225 Disponível em: <<http://genomebiology.com/2004/5/6/225>>

HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. L. **Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts.** *PLoS ONE*, 5 (2). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009181>>

HUNT, R. A.; MUNDE, M.; KUMAR, A.; ISMAIL, M. A.; FARAHAT, A. A.; ARAFA, R. K.; SAY, M.; BATISTA-PARRA, A.; TEVIS, D.; BOYKIN, D. W.; Wilson, W. D. **Induced topological changes in DNA complexes: influence of DNA sequences and small molecule structures.** *Nucleic Acids Research*, 39 (10). 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gkq1362>>

JACIUK, M.; NOWAK, E.; SKOWRONEK, K.; TAŃSKA, A.; NOWOTNY, M. **Structure of UvrA nucleotide excision repair protein in complex with modified DNA.** *Nature Structural & Molecular Biology*, 18 (2). 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/nsmb.1973>>

JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. **Network News: The Replication of Kinetoplast DNA.** *Annual Review Microbiology*, 66. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150057>>

JOE, A. W. B.; YII, L.; NATARAJAN, A.; GRAND, F. L.; SO, L.; WANG, J.; RUDNICKI, M. A.; ROSSI, F. M. V. **Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis.** *Nature Cell Biology*, 12. 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/ncb2015>>

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations.** *Trends in Parasitology*, 21 (6). 2005. Disponível em: <<http://doi.org/10.1128/j.pt.2005.04.001>>

KAPPELLER, IRIT.; MILMAN, N.; YAFFE, N.; SHLOMAI, J. **Interactions of a Replication Initiator with Histone H1-like Proteins Remodel the Condensed Mitochondrial Genome.** *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (47). 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1074/jbc.M111.270322>>

KEMP, J. R., & LONGWORTH, M. S. **Crossing the LINE Toward Genomic Instability: LINE-1 Retrotransposition in Cancer.** *Frontiers in Chemistry*, 3, 68. . 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fchem.2015.00068>.

KAZAZIAN, JR, H. H; WONG, C. YOUSSEFIAN; H.; SCOTT, A. F.; PHILLIPS, D. G.; ANTONARAKIS, S. E. **Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man.** *Nature*, 332, 164-166,1988.
doi:10.1038/332164a0

KINES, K. J.; SOKOLOWSKI, M.; DEHARO, D. L.; CHRISTIAN, C. M.; BELANCIO, V. P. **Potential for genomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci.** *Nucleic Acids Research*, 42 (16). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gku687>>

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. **Use of ranks in one-criterion variance analysis.** *Journal of the American Statistical Association*, 47 (260). 1952.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E.E.C.; ENGLUND, P.T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *TRENDS in Parasitology*, Volume 21, Issue 8, p363–369, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.008>

LUKES, J.; LYS GUILBRIDE, D.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. **Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure.** *Eukaryotic Cell*, 1(4), 495–502, 2002. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>

MACEDO, A. M.; PENA, S.D.J. **Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease.** *Parasitology Today*, 14 (3). 1998.

MACHADO, F. S; JELICKS, L. A; KIRCHHOFF, L. V; SHIRANI, J; NAGAJYOTHI, F; MUKHERJEE, S; NELSON, R; COYLE, CM; SPRAY, D. C; CARVALHO, A. C. C; GUAN, F; PRADO, C. M; LISANTI, M.P; WEISS, L.M; MONTGOMERY, S. P; TANOWITZ, H. B. **Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments.** *Cardiol Rev.* 20(2), 53–65. 2012.

MARTIN, S. L. **Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1, RNA.** *Biology*, 7 (6). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.4161/rna.7.6.13766>>

MISSURA, M.; BUTERIN, T.; HINDGES, R.; HÜBSCHER, U.; KASPÁRKOVÁ, J.; BRABEC, V.; NAEGELI, H. **Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair.** *Embo Journal*, 20 (13). 2001.

MOREIRA, O. C.; RAMÍREZ, J. D.; VELÁZQUEZ, E.; MELO, M. F.A.D.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J.A.; MORILLO, C. A.; BRITTO, C. A.; **Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial.** *Acta Tropica*, 125. 2013.
Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020>>

MORILLO, C.A.; MARIN-NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI A. JR.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S.J.; YUSUF, S. **Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy.** The New England Journal of Medicine, 1. 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>>

MUSOVA, Z.; HEDVICKAKOVA, P; MOHRMANN, M.; A, 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. Volume 347, Issue 1, p 145–149, 2006.

NAGAJYOTHI, F., MACHADO, F. S., BURLEIGH, B. A., JELICKS, L. A., SCHERER, P. E., MUKHERJEE, S.; TANOWITZ, H. B. **Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease.** Cellular Microbiology, 14(5), 634–43, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x>

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J. D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B. J. **Trypanosoma cruzi infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries.** Comp. Med., v. 50, n. 06, p. 658-665, 2000.

NAUFER, M. N.; CALLAHAN, K. E.; COOK, P. R.; PEREZ-GONZALEZ, C. E.; WILLIAMS, M. C.; FURANO, A. V. **L1 retrotransposition requires rapid ORF1p oligomerization, a novel coiled coil-dependent property conserved despite extensive remodeling.** Nucleic Acids Research, 44(1), 281–293. 2016, Disponível em:<http://doi.org/10.1093/nar/gkv1342>

NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA Y.; AOKI, T. **Inhibition of Trypanosoma cruzi Growth in Mammalian Cells by Purine and Pyrimidine Analogs.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40 (11). 1996.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. **Heritable Integration of kDNA Minicircle Sequences from Trypanosoma cruzi into the Avian Genome: Insights into Human Chagas Disease.** Cell, 118. 2004.

NOMIYAMA, T.; TANAKA, Y.; HATTORI, N.; NISHIMAKI, K.; NAGASAKA, K.; KAWAMORI, R.; OHTA, S. **Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA extracted from peripheral blood cells in diabetic patients.** Diabetologia, 45. 2002. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s00125-002-0893-7>>

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. **Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects.** Journal of the American College of Cardiology Foundation, 62 (9). 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>>

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. **Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.** Nature, 405, 299-30. 2000. doi:10.1038/35012500

ODAGIRI, Y.; UCHIDA, H.; HOSOKAWA, M.; TAKEMOTO, K.; MORLEY, A. A.; TAKEDA, T. **Accelerated accumulation of somatic mutations in the senescence-accelerated mouse.** Nature Genetics, 19. 1998.

OLIVER, K. R.; GREENE, W. K. **Transposable elements: powerful facilitators of evolution.** BioEssays, 31. 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/bies.200800219>>

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. C. **Challenges and perspectives of Chagas disease: a review.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 19 (34). 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/1678-9199-19-34>>

POVELONES, M. L. **Review Beyond replication: Division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids.** Molecular & Biochemical Parasitology, 196. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.008>>

POVH, J. A.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; PRIOLI, A. J.; VARGAS, L.; BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; STREIT JR, D. P. **Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD.** Acta Scientiarum. Animal Sciences, vol. 27, núm. 1, enero-marzo, 2005, pp. 1-10

RAMÍREZ, J. C.; CURA, C. I.; MOREIRA, O. C.; LAGES-SILVA, E.; JUIZ, N.; VELÁZQUEZ, E.; ...SCHIJMAN, A. G. **Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients.** Journal Molecular Diagnostics, 17 (5). 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; DE REZENDE J. M. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease) Infectious Disease Clinics of North America**, Volume 26, Issue 2, Pages 275-291. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.

RAY, D. S. **Conserved Sequence Blocks in Kinetoplast Minicircles from Diverse Species of Trypanosomes.** Molecular and Cellular Biology, 9 (3). 1989.

RIBEIRO, M. A. **Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos chagásicos crônicos.** 2013. 105 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas. Brasília. Universidade de Brasília.

RIBEIRO, M.; NITZ, N.; SANTANA C.; MORAES, A.; HAGSTRÖM, L.; ANDRADE, R.; RIOS, A.; SOUSA, A.; DALLAGO, B.; GURGEL-GONÇALVES, R.; HECHT, M. **Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model.** Experimental Parasitology, 162. 2016

RICHARDSON, S.R.; DOUCET, A. J.; KOPERA, H. C.; MOLDOVAN, J. B., GARCIA-PEREZ, J. L; MORAN, J. V. **The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes.** Microbiology Spectrum, 3(2):MDNA3-0061, 2014. Doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014.

RICHLY, E.; LEISTER, D. **NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes.** *Molecular Biology and Evolution*, 21 (6). 2004. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/molbev/msh110>>

ROSE, E. C. **Transferência vertical de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no modelo *Gallus gallus*.** 2013. 138 páginas. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Brasília. Universidade de Brasília.

ROTTA, D. S.; SIQUEIRA, L.; PEDROSO, D. **Transmissão Congênita da Doença de Chagas: Uma Revisão.** *Arq. Ciênc. Saúde, São Paulo*, out/dez, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. *Colsd Spring Harbor Lab. Press*, v. 01, 1989.

SCHIJMAN A. G.; BISIO M.; ORELLANA L.; SUED M.; , DUFFY T.; JARAMILLO, A. ... LADZINS, J. **International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 (1). 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>>

SEIBERT, E.; ROSS, J. B.; OSMAN, R. **Contribution of opening and bending dynamics to specific recognition of DNA damage.** *Journal of Molecular Biology*, 330 (4). 2003.

SERVANT, G.; DEININGER, P. L. **Insertion of Retrotransposons at Chromosome Ends: Adaptive Response to Chromosome Maintenance.** *Frontiers in Genetics*, 6, 358, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fgene.2015.00358>

SFEIR, A.; SYMINGTON, L. S. **Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway?** *Trends Biochemical Sciences*, 40 (11). 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.006>>

SHIMIZU, T.; MARUSAWA, H.; MATSUMOTO, Y.; INUZUKA, T.; IKEDA, A.; FUJII, Y.; MINAMIGUCHI, S.; MIYAMOTO, S.; KOU, T.; SAKAI, Y.; CRABTREE, J. E.; CHIBA, T. **Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection.** *Gastroenterology*, 147 (2). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.036>>

SIMÕES-BARBOSA, A.; ARGÃOARAZ, E. R.; BARROS, A. M.; ROSA, A. C.; ALVES, N. P.; LOUVANDINI, P.; D'SOUZA-AULT, M. R.; NITZ, N.; STURM, N. R.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (8). 2006.

SIMPSON, L. **Structure and Function of Kinetoplast DNA.** *The Journal of Protozoology*, 20: 2–8,1973. doi:10.1111/j.1550-7408.1973.tb05993.x

SOLYOM, S.; EWING, A. D.; RAHRMANN, E. P.; DOUCET, T.; NELSON, H. H.; BURNS, M. B; KAZAZIAN, H. H. **Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors.** *Genome Research*, 22(12), 2328–2338, (2012). Disponível em: <http://doi.org/10.1101/gr.145235.112>

SOUSA, A. O. **Transferência de DNA de *Trypanosoma cruzi* para retrotransposons line-1 de camundongos chagásicos tratados com Nitroderivado Benzonidazol**. 2012. 119 páginas. Tese de doutorado em Patologia Molecular. Brasília. Universidade de Brasília.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea**. 2ª Edição. Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction**. International Journal of Cell Biology, 20. 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1155/2010/295394>>

TEIXEIRA, A. R. L. **Animal model of human disease chagas' disease in inbred III/J rabbits**. AJP, 124 (2). 1986.

TEIXEIRA, A. R. L.; ARGAFIARAZ, E. R.; FREITAS JR, L. H.; LACAVA, Z. G. M.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection**. Mutation Research, 305. 1994.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease**. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6 (8). 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

TEIXEIRA A.R.; CÓRDOBA J.C; SOUTO MAIOR I; SOLÓRZANO E. **Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with Benznidazole**. American Journal Tropical Medicine Hygiene. August, 43(2):146-58,1990.

TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE FILHO, J.; MACÊDO, V. **A doença de Chagas: a parasitológicos, imunológicos e estudo clínico, patológico em coelhos**. American Journal Tropical Medicine Hygiene, March; 32 (2): 258-72. 1983.

TEIXEIRA A. R. L.; LACAVA, Z.; SANTANA J. M.; LUNA H.; **Nota Prévia. Inserção de DNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de célula hospedeira de mamífero por meio de infecção**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 24. 1991.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; NITZ, N.; SOUSA, A.; ALVES, R. M.; GUIMARO, M. C.; CORDEIRO, C.; BERNAL, F. M.; ROSA, A. C.; HEJNAR, J.; LEONARDECZ, C.; HECHT, M. M. ***Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism**. PLOS Neglected Tropical Diseases 5 (3). 2011a. Disponível em: <<http://doi.10.1371/journal.pntd.0001000>>

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity**. Clinical Microbiology Reviews, 24 (3). 2011b. Disponível em: <<http://doi.10.1128/CMR.00063-10>>

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. **Evolution and pathology in Chagas disease: a review**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>>

TEMIN, H. M. **Gener transfer: Retrovirus Vectors for Gene Transfer: Efficient Integration into and Expression of Exogenous DNA in Vertebrate Cell Genomes**, Cap. 6, pp 149-187, 1986. Editora Raju Kucherlapati. doi: 10.1007/978-1-4684-5167-2

THOMAS, J.; PHILLIPS, C. D.; BAKER, R. J.; PRITHAM, E. J. **Rolling-Circle Transposons Catalyze Genomic Innovation in a Mammalian Lineage**. *Genome Biology Evolution*, 6 (10). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/gbe/evu204>>

THOMAS, J.; SOROURIAN, M.; RAY, D.; BAKER, R. J.; PRITHAM, E. J. **The limited distribution of Helitrons to vesper bats supports horizontal transfer**. *Gene*, 474 (1-2). 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.gene.2010.12.007>>

THOMAS, S.; MARTINEZ, L. L. I. T.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. **A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing**. *BMC Genomics*, 8 (133). 2007. Disponível em: <<http://doi.10.1186/1471-2164-8-133>>

TSUJI, J.; FRITH, M. C.; TOMII, K.; HORTON, P. **Mammalian NUMT insertion is non-random**. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9073–9088, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gks424>>

TUBIO, J. M. C.; LI, Y.; JU, Y. S.; MARTINCORENA, I.; COOKE, S. L.; TOJO, M.; ... ICGC Prostate Cancer Group. **Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes**. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6196), 1251343, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1126/science.1251343>

VEGA, M. C.; ROLÓN, M.; MONTERO-TORRES, A.; FONSECA-BERZAL, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; GÁLVEZ, J.; MARRERO-PONCE, Y.; ARÁN, V. **Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58. 2012. Disponível em: <<http://doi.10.1016/j.ejmech.2012.10.009>>

VOGT, J.; BENGESSER, K.; CLAES, K. B.; WIMMER, K.; MAUTNER, V. F.; VAN MINKELN, R.; LEGIUS, E.; BREMS, H.; UPADHYAYA, M.; HÖGEL, J.; LAZARO, C.; ROSENBAUM, T.; BÄMMERT, S.; MESSIAEN, L.; COOPER, D. N.; KEHRER-SAWATZKI, H. **SVA retrotransposon insertion-associated deletion represents a novel mutational mechanism underlying large genomic copy number changes with non-recurrent breakpoints**. *Genome Biology*, 15 (6). 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/gb-2014-15-6-r80>

WANG, D.; QU, Z.; ADELSON, D. L.; ZHU, J.-K.; TIMMIS, J. N. **Transcription of Nuclear Organellar DNA in a Model Plant System**. *Genome Biology and Evolution*, 6(6), 1327–1334. 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/gbe/evu111>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis). 2015.** Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

WIJAYAWARDENA, B. K.; MINCHELLA, D. J.; DEWOODY, A. **Hosts, parasites, and horizontal gene transfer.** Trends in Parasitology, 29, Issue 7, p329–338, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.001>

YOUNÈ-CHENNOUFI, A. B.; HONTEBEYRIE-JOSKOWIC, M.; TRICOTTET, V.; EISEN, H.; REYNES, H. F.; SAID, G. **Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82. 1988.

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; ZOGOVICH, M.; MACHADO, A. C. L.; MENDES, I. C.; THIRY, M.; GALINA, A.; SOUZA, W.; MACHADO, C. R.; MOTTA, M. C. M. **Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on *Trypanosoma cruzi*: implications for kDNA ultrastructure and replication.** Parasitology Research, 114. 2015. Disponível em: <<http://doi.10.1007/s00436-014-4199-8>>