



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



ALINE SILVA MORAES

**ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTEGRAÇÃO DE  
MINICÍRCULOS DE *k*DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO  
GENOMA DO HOSPEDEIRO**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**Brasília – DF**  
**2022**

ALINE SILVA MORAES

**ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTEGRAÇÃO DE  
MINICÍRCULOS DE κDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO  
GENOMA DO HOSPEDEIRO**

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

Orientadora: Mariana Machado Hecht

**Brasília – DF  
2022**

MORAES, Aline Silva.

**Elucidação dos mecanismos de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro / Aline Silva Moraes. – Brasília: UnB, 2022.**

Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2022.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Machado Hecht.

1. Transferência lateral de DNA. 2. Minicírculos de kDNA. 3. Vesículas extracelulares. 4. Retroelementos LINE-1. 5. Vias de reparo do DNA. I. Elucidação dos mecanismos de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro.

ALINE SILVA MORAES

**ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTEGRAÇÃO DE  
MINICÍRCULOS DE kDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO  
GENOMA DO HOSPEDEIRO**

**Tese defendida e aprovada no dia 27 de junho de 2022 pela banca examinadora  
constituída pelos professores:**

Dra. Mariana Machado Hecht (Orientadora)  
Universidade de Brasília

Dr. José Raimundo Corrêa (Membro)  
Universidade de Brasília

Dra. Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves (Membro)  
Universidade Federal de Goiás

Dr. Alessandro Oliveira de Sousa (Membro)  
Secretaria de Saúde do Distrito Federal

Dra. Marcelle Araújo Ribeiro (Suplente)  
Fiocruz

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

*“Portanto, quer comais quer bebais, ou façais  
outra qualquer coisa, fazei tudo para glória  
de Deus.”*

1 Coríntios 10:31

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a Ele toda honra e glória,  
Aos meus amados pais Jaime Santos e Claudia Maria,  
Às queridas irmãs Jaqueline S. e Danielle S. e  
Aos amados sobrinhos Átila Henrique e Bianca Miranda,  
meus presentes.

## AGRADECIMENTOS

Aqui está a realização de um grande sonho: o desafio, o aprendizado e a superação. Assim encerro este importante ciclo da vida, ciente de que poderia ter feito melhor, mas com o coração profundamente agradecido pela oportunidade.

Agradeço primeiramente a Deus pela magnífica oportunidade de estudar no LIB, com essa equipe maravilhosa, pelo dom da vida, pelo amanhecer e anoitecer e por ter me sustentado até aqui.

À minha família, minha base, pelo apoio principalmente nas horas mais difíceis, pela amizade e companhia.

À querida orientadora Mariana Hecht, uma das pessoas mais brilhantes que já conheci. Excelente pesquisadora, orientadora e uma pessoa visionária. Obrigada pela compreensão, pelo carinho, pela paciência, pela oportunidade e pela presteza nas orientações. Você é extraordinária! Foi uma honra caminhar contigo.

Às queridas professoras Nadjar Nitz, Luciana H. e Juliana Lott que sempre se mantiveram a disposição para sanar qualquer dúvida, inclusive, para ajudar nos déficits de bancada. A unidade, a competência e o comprometimento de vocês tornam o ambiente do LIB extremamente enriquecedor.

Ao Bruno Dallago pelo auxílio nas análises estatísticas. Ao professor Marcus Texeira pela imprescindível cooperação e ao professor André Sampaio pela compreensão e incentivo ao ensino continuado.

À professora Daniella Mendes, primeira orientadora na vida. A pessoa que Deus colocou na minha vida para que portas fossem abertas. Sou grata pela amizade, pelo aprendizado e pela oportunidade. Você foi um grande canal de Deus para mim.

À Thaís Minuzzi que, mesmo sem me conhecer, deu-me um voto de confiança e me indicou para o mestrado.

À querida amiga Cássia, minha mentora em células e companheira nas horas extras noturnas. Sua amizade e apoio foram fundamentais. Amo-te!

Aos amigos LIBianos, frequentadores do café psicologia: Bruna Carvalho, Tamires Vital, Taís Milene, Ester Rose, Nayra Suellen, Andressa Ribeiro, Isabela Teotônio,



Guilherme Marques, Danielle Marques e Tatiana Shiroma pela amizade, apoio e lanches. Certamente nossa amizade, conversas e desabafos foram essenciais.

Um agradecimento especial à Ester Rose, Nayra Suellen e Isabella Teotônio, que foram braço direito em momentos decisivos. E à Danielle Marques por se dispor, e garantir, sempre que possível, o bom funcionamento do laboratório. Ao Nélio e Maria Clara, meus filhinhos científicos, que muito me auxiliaram nos *Southern* da vida e nas culturas de células. À Emannelle Garcia por toda ajuda na manutenção das células e dos parasitas e ao Dimitri Sokolowski pela disposição e apoio nas análises.

À Eloá pelas palavras de incentivo e ao Rafael Rocha pela compreensão e por sempre dar apoio para que eu pudesse me dedicar ao projeto. Agradeço também às colegas de trabalho Mariana Damázio e Fernanda Natividade pela compreensão e incentivo.

Aos queridos Ruben de Oliveira e Lídia Santos, meus pastores, conselheiros e amigos. Suas orações, conselhos e amizade foram basilares. Também aos pastores Pedro Couto e Ayla Couto, meus amigos e intercessores. Obrigada por suas orações, foram essenciais.

À tia Ivonete Santos pela torcida, pelos puxões de orelha, pelas palavras de incentivo e pela compreensão. À Jaqueline Moraes, Danielle Moraes e ao Pedro Teodoro por todo o suporte.

À Equipe Multimídia por compreender as minhas ausências e por se manter fiel ao propósito da nossa equipe. Vocês são grande tesouro. Aproveito para agradecer à Luciana e ao Michael Borges pela compreensão às minhas ausências no DDC para a finalização deste trabalho.

Ao Daniel Xavier pela companhia e deliciosas marmitas, carinhosamente empacotadas. Pelo cuidado, compreensão e por cada gesto de carinho. Muito obrigada.

Aos amigos da igreja El Shadai, em especial, Josué Vilela, Poliane Vilela, Thaís Rodrigues, Ana Clara Gurgel, Sabrina Cardozo, Laryssa Machado, Marjoyree Campos, Ana Karla Gregório, Ana Priscila, Davi Wilson e tantos outros amigos que, carinhosamente, transmitiram palavra de ânimo, incentivo e esperança.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa importante jornada, muito obrigada!

## EPÍGRAFE

*“A esperança adiada faz o coração ficar doente, mas o sonho realizado é árvore de vida.”*

Provérbios 13.12

*Nas mãos de Deus*

*10/7/2012*

*Os sonhos frustrados*

*As ambições*

*A felicidade*

*Todas as projeções*

*As conquistas realizadas,*

*A alegria sentida,*

*As doenças superadas,*

*A vida a ser vivida.*

*O acordar e o dormir,*

*Os segredos meus,*

*Aquilo que me faz triste ou feliz,*

*Entreguei nas mãos de Deus.*

*A saudade do passado,*

*A incerteza do futuro,*

*O objetivo idealizado,*

*O erro prematuro.*

*A dolorosa ilusão,*

*O medo da solidão,*

*Até as próprias leis,*

*A Deus, eu as entreguei.*

*E por fim a hipocrisia*

*Que todo humano tem,*

*As mais doces fantasias,*

*Até aquilo que convém.*

*A próxima lágrima,*

*O porvir adeus,*

*A comemoração e a lástima,*

*[Absolutamente tudo] Coloquei nas mãos de Deus.*

*A.S.M.*

*2012*

*Um poema para quem gosta!*

MORAES, Aline Silva. **Elucidação dos mecanismos de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro.** 2022. Tese – Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2022.

### RESUMO

A doença de Chagas (DC), infecção tropical causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), afeta de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo. Ainda não existe um tratamento adequado para a doença na sua forma avançada e a causa para síndrome chagásica severa não está muito bem estabelecida. Acredita-se que fenômenos de transferência lateral de minicírculos de kDNA (minikDNA) estejam envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas e que vesículas extracelulares (VEs) de *T. cruzi* sejam o principal veículo de transferência dessas moléculas para o genoma da célula. Sabe-se que os minikDNA se integram preferencialmente em regiões de retroelemento LINE -1 e que sequências de minikDNA foram encontradas no genoma de células somáticas e de tecidos tais como o tecido cardíaco e do intestino. No entanto, ainda não foram descritos quais os tipos celulares mais permissivos à integração de minikDNA e quais os mecanismos envolvidos na dinâmica de integração dessas moléculas no genoma hospedeiro. Dessa forma, a análise de integração pelo método de quantificação de kDNA e nDNA por qPCR permitiu-nos verificar que diferentes linhagens celulares foram permissivas à integração de sequências de minikDNA, sendo as células HEK 293 e Caco 2 as mais permissivas. Verificamos também que VEs de *T. cruzi* contêm minikDNA na conformação de dupla fita. A infecção por *T. cruzi* em células HEK 293 aumentou a expressão de retroelemento LINE-1, principalmente às 72 horas pós-infecção. O uso de inibidores de transcriptase reversa inibiu a integração reforçando a hipótese de que os retroelementos LINE-1 têm um importante papel na integração do kDNA. Inibidores de vias de reparo, histona deacetilase (HDAC) e síntese de purina, também inibiram a integração do kDNA. Vale ressaltar que a expressão reduzida para os genes envolvidos nos mecanismos de *checkpoint* e vias de reparo no DNA, tais como p53, ATM, XP-A e XP-V, impediram a integração do kDNA. Assim, conclui-se que a integração do kDNA parece depender do pleno funcionamento da maquinaria de reparo do DNA. Desse modo, postulamos que a integridade das vias BER, NER, HR, NHEJ possa ter alguma relação com a permissividade à integração dos minicírculos de kDNA, pois essas vias influenciam na atividade dos retroelementos.

**Palavras-chave:** transferência lateral de DNA, minicírculos de kDNA, vesículas extracelulares, retroelementos LINE-1, vias de reparo do DNA.

MORAES, Aline Silva. **Elucidation of the mechanisms of integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host genome.** 2022. Thesis – Postgraduate Diploma in Molecular Pathology, Medical School, University of Brasília, Brasília-DF, 2022.

### ABSTRAC

Chagas disease (CD), a tropical infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), affects 6 to 8 million people worldwide. There is still no adequate treatment for the disease in its advanced form. Furthermore, the cause for severe chagasic syndrome is not well established. It is believed that lateral transfer of minicircles of kDNA (minikDNA) are involved in the development of clinical manifestations and that *T. cruzi* extracellular vesicles (EVs) are the main vehicle for the transfer of these molecules to the cell genome. MinikDNAs preferentially integrate into LINE-1 retroelement regions and minikDNA sequences have been found in the genome of somatic cells and tissues such as heart and intestine. However, the most permissive cell types for minikDNA integration and the mechanisms involved in the dynamics of integration of these molecules into the host genome have not yet been described. Thus, the analysis of integration by the method of quantification of kDNA and nDNA by qPCR allowed us to identify different cell lines permissive to the integration of minikDNA sequences, with HEK 293 and Caco 2 cells being the most permissive. We also verified that *T. cruzi* EVs contain minikDNA in the double-stranded conformation. *T. cruzi* infection in HEK 293 cells increased LINE-1 retroelement expression, mainly at 72 hours post-infection. In addition, the use of reverse transcriptase inhibitors inhibited integration, reinforcing that LINE-1 retroelements play an important role in kDNA integration. Inhibitors of repair pathways, histone deacetylase (HDAC) and purine synthesis, also inhibited kDNA integration. It is worth mentioning that the reduced expression for genes involved in *checkpoint* mechanisms and DNA repair pathways, such as p53, ATM, XP-A and XP-V, also prevented kDNA integration. Thus, the kDNA integration seems to depend on the perfect functioning of the DNA repair machinery. Thus, we postulate that the integrity of the BER, NER, HR, NHEJ pathways may have some relationship with the permissiveness to the integration of kDNA minicircles, as these pathways influence the activity of retroelements.

**Keywords:** DNA side transfer, kDNA minicircles, extracellular vesicles, LINE-1 retroelements, DNA repair pathways.

## LISTA DE FIGURA

<b>FIGURA 1.</b> EXPANSÃO MUNDIAL DA DOENÇA DE CHAGAS. ....	<b>23</b>
<b>FIGURA 2.</b> CICLO BIOLÓGICO De <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> . ....	<b>24</b>
<b>FIGURA 3.</b> CURSO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS. ....	<b>26</b>
<b>FIGURA 4.</b> MECANISMOS DE PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS. ....	<b>28</b>
<b>FIGURA 5.</b> DNA MITOCONDRIAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> . ....	<b>32</b>
<b>FIGURA 6.</b> ESTRUTURA DO LINE-1 .....	<b>37</b>
<b>FIGURA 7.</b> PRINCIPAIS VIAS DE REPARO DO DNA .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 8.</b> DESENHO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO SECRETOMA DE <i>T. CRUZI</i> .....	<b>52</b>
<b>FIGURA 9.</b> AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE minikDNA NO SECRETOMA DE <i>T. cruzi</i> CO-CULTIVADO COM DIFERENTES TIPOS CELULARES.....	<b>53</b>
<b>FIGURA 10.</b> DESENHO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR SE OS minikDNA PRESENTES NO SECRETOMA SE INTEGRAM NO GENOMA DA CÉLULA HOSPEDEIRA. ....	<b>54</b>
<b>FIGURA 11.</b> CURVA PADRÃO E CURVA DE <i>MELTING</i> DOS <i>PRIMERS</i> DE kDNA E nDNA. ....	<b>60</b>
<b>FIGURA 12.</b> CURVA PADRÃO E CURVA DE <i>MELTING</i> DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LINE-1.....	<b>63</b>
<b>FIGURA 13.</b> INTEGRAÇÃO DE minikDNA .....	<b>74</b>
<b>FIGURA 14.</b> INTEGRAÇÃO DE minikDNA EM DIFERENTES TIPOS CELULARES AO LONGO DO TEMPO. ....	<b>76</b>
<b>FIGURA 15.</b> PERMISSIVIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES À INTEGRAÇÃO DE minikDNA.....	<b>77</b>
<b>FIGURA 16.</b> <i>T. cruzi</i> LIBERA miniKDNA NO SECRETOMA. ....	<b>80</b>
<b>FIGURA 17.</b> PRESENÇA DE miniKDNA NO INTERIOR DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR <i>T. cruzi</i> . ....	<b>81</b>

<b>FIGURA 18.</b> MINICÍRCULOS DE KDNA DE <i>T. cruzi</i> TRANSFERIDOS VIA SECRETOMA SÃO INCORPORADOS PELA CÉLULA HOSPEDEIRA .....	82
<b>FIGURA 19.</b> EXPRESSÃO DE RETROELEMENTO LINE-1 EM CÉLULAS INFECTADAS POR <i>T. cruzi</i> .....	83
<b>FIGURA 20.</b> INIBIÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO KDNA POR INIBIDORES DE RETROTRANSCRIÇÃO.....	86
<b>FIGURA 21.</b> INIBIDORES DE VIAS DE REPARO DE DNA, SÍNTESE DE PURINA E HDAC INIBIRAM A INTEGRAÇÃO DE MINI KDNA .....	87
<b>FIGURA 22.</b> A INTEGRAÇÃO DO minikDNA NÃO OCORREU EM CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> PARA GENES ENVOLVIDOS NAS VIAS DE REPARO DO DNA E GENE p53 .....	89
<b>FIGURA 23.</b> MODELO DE INTEGRAÇÃO DE minikDNA DE <i>T. cruzi</i> NO GENOMA DO HOSPEDEIRO. ....	100
<b>FIGURA S1.</b> ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO BZ SOBRE <i>T. cruzi</i> E TESTE DE TOXICIDADE DO BZ SOBRE AS CÉLULAS.....	122
<b>FIGURA S2.</b> TOXICIDADE DO ITR SOBRE CÉLULAS HEK 293 .....	123
<b>FIGURA S3.</b> TOXICIDADE DOS INIBIDORES DE SÍNTESE DE PURINA, VIAS DE REPARO DO DNA E HDAC SOBRE AS CÉLULAS HEK 293 .....	123
<b>FIGURA S4.</b> QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE kDNA E nDNA DE MACRÓFAGOS J774A.1.....	124
<b>FIGURA S5.</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PRODUTO PCR DAS CÉLULAS L6, CACO 2, HEK 293 E JURKAT DURANTE 28 DIAS .....	125
<b>FIGURA S6.</b> QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE minikDNA E nDNA DAS CÉLULAS L6, CACO 2, HEK 293 E JURKAT DURANTE 28 DIAS .....	126
<b>FIGURA S7.</b> QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE KDNA E NDNA CÉLULAS HEK 293 INFECTADAS E TRATADAS COM BZ E COM INIBIDORES DE VIAS DE REPARO DE DNA, INIBIDORES DE HDAC E INIBIDOR DE SÍTIOS DE PURINAS .....	127
<b>FIGURA S8.</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PRODUTO PCR DE CÉLULAS HEK 293 INFECTADAS E TRATADAS COM BZ E COM INIBIDORES DE	

VIAS DE REPARO DE DNA, INIBIDORES DE HDAC E INIBIDORES DE SÍTIOS DE PURINAS .....	128
<b>FIGURA S9.</b> RAZÃO $\text{minikDNA/nDNA}$ E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE $\text{minikDNA}$ E $\text{nDNA}$ DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> TRATADAS COM BENZNIDAZOL .....	129
<b>FIGURA S10.</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PRODUTO PCR DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> .....	130

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR CONVENCIONAL. ....	57
<b>TABELA 2.</b> INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE qPCR. ....	59
<b>TABELA 3.</b> SEQUÊNCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE QPCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE LINE-1 E TBP, TEMPERATURA DE ANELAMENTO (T. A.) E EFICIÊNCIA DA CURVA UTILIZADA NO PROGRAMA DA REAÇÃO. ....	61
<b>TABELA 4.</b> PLANO DE EXPERIMENTO PARA O TESTE DE CITOTOXICIDADE DO BENZNIDAZOL E DOS INIBIDORES. ....	69
<b>TABELA 5.</b> MÉDIA DA RAZÃO mini kDNA/nDNA, DESVIO PADRÃO E VALOR DE P DOS TIPOS CELULARES J774A.1, HEK, CACO 2, L6 E JURKAT BZ E ST. ....	78
<b>TABELA 6.</b> MÉDIA DA RAZÃO mini kDNA/nDNA, DESVIO PADRÃO E VALOR DE P DE EXPRESSÃO DE LINE -1 EM CÉLULAS HEK INFECTADAS COM <i>T. cruzi</i> COLOMBIANA E BERENICE. ....	84
<b>TABELA 7.</b> MÉDIA DA RAZÃO mini kDNA/nDNA, DESVIO PADRÃO E VALOR DE P DE CÉLULAS TRATADAS COM INIBIDORES AOS 28 DIAS. ....	88
<b>TABELA 8.</b> MÉDIA DA RAZÃO mini kDNA/nDNA, DESVIO PADRÃO E VALOR DE P DAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> AOS 28 DPI. ....	89
<b>TABELA S1.</b> MÉDIA DA RAZÃO minikDNA/nDNA, DESVIO PADRÃO E VALOR DE P DAS CÉLULAS HEK 293, INFECTADAS COM <i>T. cruzi</i> BERENICE E TRATADAS COM INIBIDORES. ....	131



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM - ataxia telangiectasia mutada  
ATR - ataxia telangiectasia e proteína relacionada com Rad3  
BER - reparo por excisão de base  
Bz - benznidazol  
CDK - quinase ciclo dependente  
cDNA - DNA complementar  
céls - células  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
Ct - *cycle threshold*  
DDR - resposta ao dano de DNA  
DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco  
DNA - ácido desoxirribonucleico.  
DNA-PK - proteína quinase dependente de DNA  
dpi - dias pós-infecção  
DSB - quebra de dupla fita de DNA  
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
ETs - elementos transponíveis  
gDNA - DNA genômico  
h - Horas  
HDAC - histona deacetilase  
HDR - Recombinação Homóloga  
HEK- *Human Embryonic Kidney*  
HR - Recombinação homóloga  
iTR - inibidores de transcriptase reversa  
kDNA - DNA do cinetoplasto  
LINE-1- Elemento nuclear longo intercalado 1  
LIT - meio de infusão de fígado triptose  
LTR - *Long Terminal Repeat*  
M - molar  
maxikDNA – maxicírculo de kDNA  
MET - microscopia eletrônica de transmissão

minicDNA – minicírculo de kDNA

MIQE - informação mínima para publicação de experimentos de PCR quantitativa em tempo real

MMEJ - junção final mediada por micro homologia

MMR - reparo de bases mal pareadas

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

mRNA - RNA mensageiro

MSI - instabilidade de microssatélites

nDNA – DNA nuclear

NER - reparo por excisão de nucleotídeos

NHEJ - reparo por junção não homologa

NNRTI - inibidores não nucleotídeos

NRTI - inibidores de nucleosídeos ou nucleotídeos

OD - densidade ótica

ORFs - *Open Reading Frame*

PCR- reação em cadeia da polimerase

PARP1 - poli [ADP-ribose] polimerase 1

PBS - tampão fosfato salino

pi - pós-infecção

PI3K – fosfatidilinositida 3-quinase

qPCR - em tempo real

Quant. - quantificação

RNA - ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

RNS - espécies reativas de nitrogênio

ROS - espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR- reação de polimerase em cadeia transcriptase reversa quantitativa

SFB - soro fetal bovino

shRNA - short hairpin RNAs

SSB - quebra de simples fita de DNA

ssDNA - DNA de fita simples

SV40 - vírus vacuolante símio 40

TBP - proteína de ligação TATA

TGH - transferência gênica horizontal

T. A. - temperatura de anelamento

Tc - relativo ao *Trypanosoma cruzi*

TBP - proteína de ligação TATA

Tm - temperatura de melting

TSA – Trichostatina

TTO - tratamento

UTR - untranslated region

VEs - vesículas extracelulares

VETc – vesículas extracelulares de *T. cruzi*

XPA - proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo A

XPV - proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo V

# SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
1. Aspectos gerais	23
2. Patogênese	27
2.1. Persistência parasitária	28
2.2. Autoimunidade	29
2.2.1. Mimetismo molecular	29
2.2.2. Ativação <i>bystander</i>	30
2.2.3. Integração do kDNA	31
2.3. Transferência Gênica Horizontal (TGH)	33
2.4. Possíveis rotas de transferência e inclusão do kDNA na célula hospedeira	34
2.4.1. Vesículas extracelulares (VEs)	34
2.4.2. Elementos transponíveis (ETs)	35
2.5. Vias de reparo do dna e seus inibidores	39
<b>II. JUSTIFICATIVA</b>	<b>45</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
1. Objetivo geral	47
2. Objetivos específicos	47
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>48</b>
1. Cultivo de células e parasitas	48
1.1. Linhagens celulares	48
1.2. Manutenção das células	48
2. Manutenção dos parasitas	50
2.1. Manutenção das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
2.2. Obtenção e manutenção das formas tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
2.3. Obtenção das formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
2.4. Avaliação da atividade tripanocida do benznidazol (Bz)	51

3.	Identificação de kDNA no secretoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
3.1.	Uso de sistemas <i>transwell</i>	52
3.2.	Isolamento de Vesículas Extracelular (VE)	54
3.3.	Digestão com DNase I	55
3.4.	Digestão com S1 nuclease	55
4.	Extração e análise de ácidos nucleicos	56
4.1.	Extração e quantificação de DNA	56
4.2.	PCR convencional (cPCR)	56
4.3.	Quantificação absoluta por PCR quantitativa (qPCR)	58
4.4.	Eletroforese dos produtos amplificados por cPCR e qPCR	60
4.5.	Extração de RNA e síntese de cDNA	61
4.6.	Avaliação da expressão gênica	61
4.7.	Southern <i>blot</i> genômico	63
4.7.1.	Digestão do DNA genômico com Nsil	63
4.7.2.	Eletroforese de DNA genômico digerido com enzima	63
4.7.3.	Transferência de DNA genômico do gel para membrana	64
4.7.4.	Protocolo de marcação de DNA com Biotina	64
4.7.5.	Hibridização da membrana	64
4.7.6.	Deteção da sonda por quimioluminescência	64
5.	Determinação da integração de kDNA	65
5.1.	Avaliação da Permissividade da integração em diferentes tipos celulares.	66
5.2.	Estudo da integração com inibidores das vias de reparo do DNA e de retroelementos	66
5.2.1.	Avaliação da citotoxicidade	66
5.2.2.	Ensaio com os inibidores	68
5.3.	Ensaio com células <i>knockdown</i>	70
6.	Análise estatística	70
<b>V. RESULTADOS</b>		<b>72</b>
2.	Os minicírculos de kDNA são liberados no secretoma de <i>T. cruzi</i>	79
3.	A infecção por <i>T. cruzi</i> modula a atividade de retroelementos LINE-1	82
4.	Inibidores de restrotransposição inibiram a integração de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i>	85

5. Inibidores de vias de reparo de DNA, controle epigenético e síntese de inibiram a integração de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i>	86
--	----

<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>90</b>
----------------------	-----------

1. Diferentes tipos celulares foram permissivos à integração do kDNA	91
2. Vesículas extracelulares secretadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> carregam minicírculos de kDNA	93
3. Retroelementos LINE-1 são modulados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
4. Vias de reparo de DNA e de controle epigenético estão envolvidas na integração	96
5. Proposta de integração do kDNA no genoma hospedeiro	99

<b>VII. CONCLUSÃO</b>	<b>101</b>
-----------------------	------------

<b>VIII. REFERÊNCIAS</b>	<b>102</b>
--------------------------	------------

<b>ANEXO I</b>	<b>122</b>
----------------	------------

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Aspectos gerais

A doença de Chagas (DC), ou Tripanossomíase Americana, é uma infecção tropical causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida (ECHAVARRÍA *et al.*, 2021). Foi inicialmente descrita por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909) e, desde então, milhões de casos foram registrados, o que leva a DC ser a principal endemia infecciosa da América Latina. No entanto, a expansão dos processos de migração impulsionou a globalização da DC (LEWIS *et al.*, 2014; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015). Atualmente, estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o *T. cruzi*, com uma incidência de 30 mil novos casos e cerca de doze mil mortes por ano (Fig. 1). Avalia-se que aproximadamente 70 milhões de pessoas vivam em áreas de exposição, podendo contrair a infecção (DNDi's, 2022; WHO, 2022).

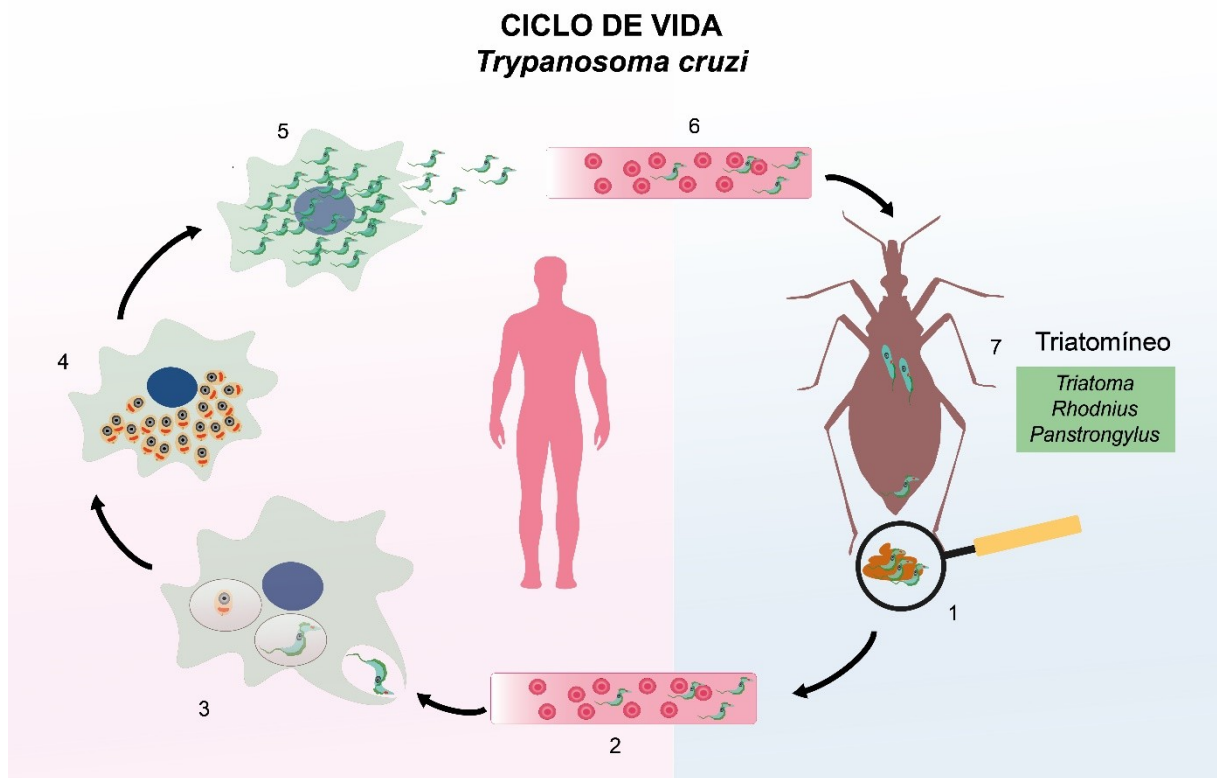


**Figura 1.** Expansão mundial da doença de chagas. Distribuição de casos estimados da doença de Chagas no mundo (Adaptado de MARTINEZ *et al.*, 2019). Dados estimados entre 2006 e 2009 (DNDi's, 2022).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteróximo, que se alterna entre dois hospedeiros diferentes: o vetor triatomíneo e o hospedeiro vertebrado, mamífero. Resumidamente, o triatomíneo, durante o repasto sanguíneo, libera as formas tripomastigotas metacíclicas nas

fezes que invadem a corrente sanguínea do hospedeiro através da lesão provocada pela picada, pela ferida na pele ou pelas mucosas. O parasita, ao infectar as células, diferencia-se em amastigota (multiplicativa), prolifera-se e se diferencia novamente para a forma tripomastigota. As formas tripomastigotas provocam a ruptura mecânica da membrana celular, e outra vez, na corrente sanguínea podem invadir novas células espalhando a infecção e eventualmente serem ingeridas pelo triatomíneo.

Ao ser ingerido, no estômago do vetor, o parasita se diferencia para forma epimastigota, se multiplica e, no intestino médio, se diferencia em tripomastigota. As formas tripomastigotas metacíclicas são, então, liberadas nas fezes do vetor, no momento do repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo (TEIXEIRA *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2018) (Fig. 2).



**Figura 2.** Ciclo de biológico de *Trypanosoma cruzi*. 1. Triatomíneo libera nas fezes as formas tripomastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. 2. Os tripomastigotas invadem a corrente sanguínea. 3. *T. cruzi* infectam as células. 4. Diferenciam-se dentro da célula em amastigota e se multiplicam. 5. Os parasitas se diferenciam, ainda dentro da célula, para forma tripomastigota e rompem a célula. 6. Podem invadir novas células ou ser ingeridos pelo vetor durante um novo repasto sanguíneo. 7. No intestino do vetor, o *T. cruzi* se diferencia para forma epimastigota, se multiplica, e na porção média do intestino se diferencia para forma tripomastigota (Adaptado de VACANI-MARTINS *et al.*, 2021).

A transmissão é mediada principalmente por vetores de insetos triatomíneos, mas outras vias como a via oral, transfusional, congênita e sexual também são consideradas como



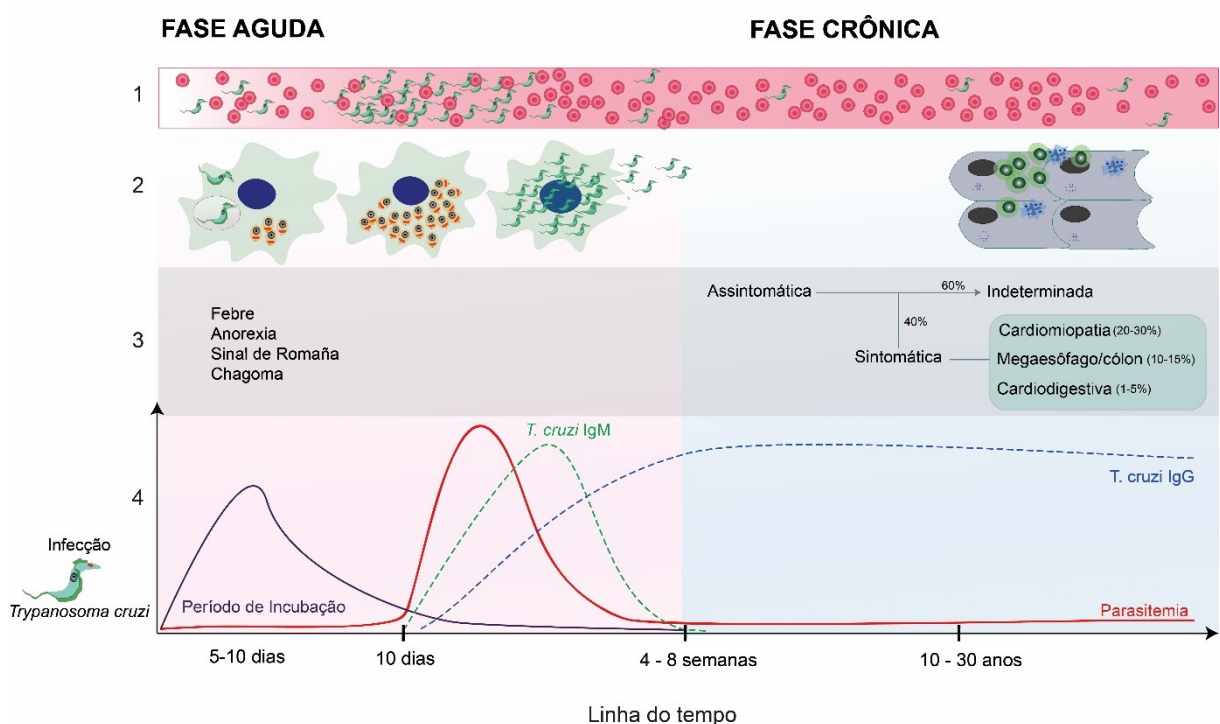
riscos de infecção (RIBEIRO *et al.*, 2016; CHATELAIN, 2017; ARAUJO *et al.*, 2017; A PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018, RIOS *et al.*, 2018).

Segundo a organização mundial de Saúde (OMS) existem apenas dois tratamentos disponíveis para DC baseados em dois compostos nitro-heterocíclicos: o nifurtimox (5-nitrofurano) e o benznidazol (2-Nitroimidazol) (KRATZ, 2019). Ambos os compostos apresentam baixa eficácia na fase crônica da infecção e significativas reações adversas, podendo ser letais na fase avançada da doença, por isso, ainda se considera que não existe tratamento adequado para a doença na sua forma avançada (MILLER *et al.*, 2015; ALDASORO *et al.*, 2018; CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019). No Brasil, a principal estratégia de tratamento é com o benznidazol (Bz) e, apesar de ser a droga de escolha na maioria dos países da América Latina, possui variações regionais de eficácia, com relatos de cepas resistentes ao medicamento (WILKINSON *et al.*, 2011; MEJIA *et al.*, 2012; A PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015). Esse composto interage covalentemente com macromoléculas específicas do parasita, aumentando sua fagocitose e lise, e inibindo seu crescimento através da ação da enzima nitro redutase tipo I (WILKINSON *et al.*, 2011; TROCHINE *et al.*, 2014).

A DC é altamente heterogênea, podendo se manifestar de maneira única em cada paciente. Seu desenvolvimento é considerado peculiar e a doença se divide em duas fases, aguda e crônica, sendo esta subdividida em indeterminada (também conhecida como crônico-assintomático) e crônico-sintomática (MARTINEZ; ROMANO; ENGMAN, 2020). A fase aguda ocorre no estágio inicial da doença podendo ter uma duração de 6 a 8 semanas. É caracterizada por uma alta parasitemia no sangue periférico, podendo ou não apresentar sintomas. Esses, por sua vez, são sintomas inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico logo no estágio inicial, representando um quadro clínico com febre, mal-estar e linfadenopatia. Outros sintomas bem característicos podem ocorrer na transmissão vetorial, tais como a inflamação no local da picada (chagoma) e o edema palpebral unilateral (sinal de Romaña). Alguns pacientes, cerca de 1 a 5%, apresentam miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (A PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Na fase crônica sintomática, os pacientes podem levar de 10 a 30 anos para manifestar a doença. Nessa fase, ocorre uma redução da parasitemia, normalmente abaixo dos níveis detectados por microscopia. Aproximadamente 20 a 30% dos indivíduos infectados apresentam disfunção orgânica, desenvolvendo as manifestações cardíacas e as gastrointestinais, popularmente conhecidos como megacárdio, megacólon e megaesôfago (GUARNER, 2019). A cardiomiopatia chagásica apresenta inflamação crônica em todas as

câmaras e danos ao sistema de condução e ao músculo cardíaco. As manifestações incluem arritmias ventriculares, disfunção do nó sinusal e bradicardia, bloqueio cardíaco completo persistente ou intermitente, aneurisma apical geralmente no ventrículo esquerdo, fenômenos tromboembólicos e cardiomiopatia dilatada progressiva. O envolvimento gastrointestinal é muito menos frequente, e pode variar de leve até o comprometimento completo do esôfago e do intestino, apresentando disfagia, odinofagia, refluxo esofágico. No intestino, o paciente pode apresentar constipação prolongada, fecaloma, volvo, isquemia intestinal (BERN *et al.*, 2019). Tanto o megaesôfago quanto o mega cólon resultam de defeitos no sistema nervoso entérico (BONNEY *et al.*, 2019). A Figura 3 apresenta didaticamente o curso clínico da DC.



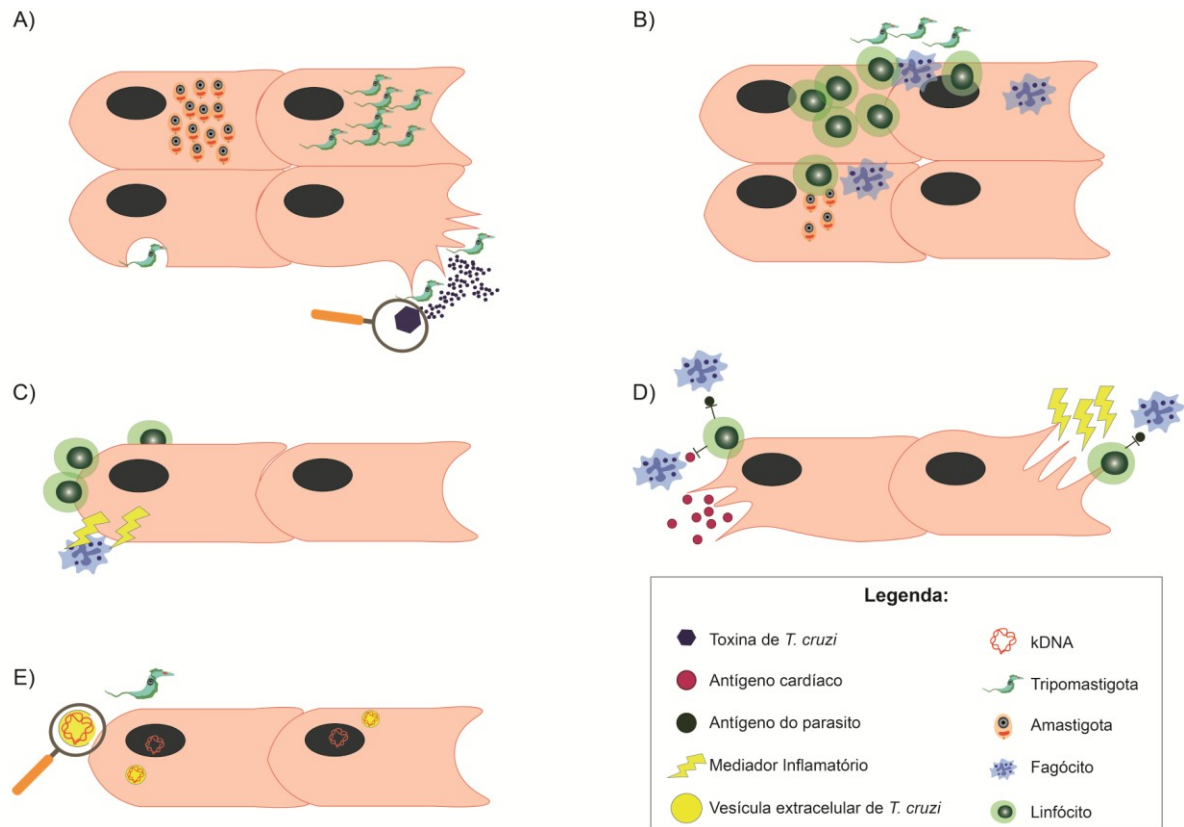
**Figura 3.** Curso clínico da doença de Chagas. O período de incubação dura de 5 a 10 dias seguido pela fase aguda da doença, que perdura de 4 a 8 semanas, e tem como característica formas tripomastigotas circulantes com alta parasitemia e presença de anticorpos IgM. A maioria dos pacientes têm sintomas inespecíficos, como febre e anorexia, chagoma de inoculação ou sinal de Romã. Na fase crônica a parasitemia cai abaixo de níveis detectáveis no sangue periférico e tecidos, com a presença de anticorpos anti-T. cruzi IgG. Nessa fase a maioria das pessoas infectadas entra na forma assintomática conhecida como indeterminada e não desenvolverão sintomas relacionados à doença de Chagas. Cerca de 30-40% das pessoas cronicamente infectadas apresentarão algumas manifestações clínicas, incluindo cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas. 1. Parasitemia no sangue periférico (representada no gráfico pela linha vermelha); 2. Parasitemia nas células/tecido (linha vermelha). 3. Manifestações clínicas na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* 4. Gráfico representando período de incubação (linha azul), parasitemia (linha vermelha) e curva de produção de anticorpos IgM (linha tracejada verde) e IgG (linha tracejada azul). (Adaptado de LINDANI *et al.*, 2017; BONA *et al.*, 2018)

O diagnóstico na fase aguda consiste na visualização microscópica direta de tripomastigota no sangue ou em outros fluidos corporais, como líquido cefalorraquidiano. Outros métodos de detecção como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e testes sorológicos para detecção, de anticorpos IgM nas primeiras semanas da infecção, também

podem ser realizados. O diagnóstico na fase crônica depende de testes sorológicos através da detecção de anticorpos IgG contra *T. cruzi* e PCR. Recomenda-se fazer pelo menos dois testes diferentes, concordantes entre si. Os testes sorológicos mais comuns são imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) (A PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

## 2. Patogênese

Mesmos após décadas de estudo, sendo a DC ainda muito emblemática no meio científico, uma série de questionamentos foram levantados, culminando, assim, na construção de teorias que elucidem os mecanismos envolvidos na DC. Entre as teorias, consideram-se duas como principais: persistência parasitária e mecanismos de autoimunidade. A primeira sustenta a hipótese de que a persistência parasitária é a única responsável pela inflamação e danos teciduais, uma vez que os parasitas se utilizam de diversos mecanismos que os fazem vencerem a defesa do hospedeiro, driblando a ativação do sistema complemento, e sobreviver no hospedeiro (RAMÍREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017). Sabe-se, no entanto, que a ausência de parasitas no tecido na fase crônica não impediu o dano no tecido cardíaco (LEWIS *et al.*, 2014). A segunda defende que o parasita *T. cruzi* induz uma resposta do sistema imune contra os tecidos normais do hospedeiro, levando, assim, a uma autoimunidade (CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Apesar de distintas, essas teorias não são excludentes. Muito provavelmente, a DC é o resultado de interações complexas entre o parasita, o sistema imunológico e outros fatores genéticos. (CHATELAIN, 2017; WESLEY *et al.*, 2019; PEREZ-MAZLIAH; WARD; LEWIS, 2020). A seguir, um detalhamento das principais teorias que visam explicar a patogênese da DC (Fig. 4).



**Figura 4.** Mecanismos de patogênese da doença de Chagas. a) Persistência do parasita resulta em lise celular durante sua diferenciação e multiplicação. b) Ativação da imunidade específica contra *T. cruzi* contribui para a destruição dos miócitos. c) Ativação exacerbada da imunidade inata leva a reconhecimento não específico por ativação *bystander*. d) Autoimunidade induzida por parasitas gerada por mimetismo molecular entre parasita e autoantígenos (parte à esquerda da imagem) ou ativação de células T autorreativas após a lise celular por *T. cruzi* (à direita da imagem); e) Transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma da célula hospedeira (Imagem adaptada de BONNEY e ENGMAN, (2015)).

## 2.1. Persistência Parasitária

De interesse, a teoria da persistência parasitária sugere que o dano tecidual se inicia com a infecção do parasita que se prolifera ativamente nas células, promovendo sua subsequente ruptura mecânica, ocasionando espaçamento microvascular, miocitólise e alteração dos nervos entéricos e cardíacos (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). O parasita *T. cruzi* possui uma versatilidade infectiva muito ampla, podendo invadir diversos tipos celulares e tecidos, incluindo macrófagos, fibroblastos, células do músculo esquelético e cardíaco, células neuronais e epiteliais, e se evadir do sistema imune, o que viabiliza sua persistência no organismo ao longo de toda a vida do hospedeiro (LEWIS, *et al.*, 2014; LEWIS; KELLY, 2016; RAMÍREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017).

Novos achados sobre a distribuição tecidual do parasita também têm sido utilizados como base para fortalecer a teoria da persistência do parasita (MARCON *et al.*,

2011; LEWIS *et al.* 2014; SILBERSTEIN *et al.*, 2018). O uso de PCR quantitativa (qPCR) e sistemas de imagem de bioluminescência permitiu verificar que a circulação de *T. cruzi* pelo organismo é bastante dinâmica e que existe um tropismo do parasita pelo trato gastrointestinal, especificamente cólon e estômago. Sugere-se, assim, que o intestino atua como reservatório de *T. cruzi* na fase crônica da doença e que, eventualmente, migram para o miocárdio, resultando, ao longo de anos, em miocardite e fibrose cardíaca. Igualmente, alguns estudos demonstraram que o tecido adiposo seria um nicho permissivo para a permanência de *T. cruzi* na fase crônica da infecção, contribuindo na patogênese da doença de Chagas (NAGAJYOTHI *et al.*, 2014; TANOWITZ *et al.*, 2017).

## **2.2. Autoimunidade**

Desde os meados da década de 1970, a autoimunidade tem sido conjecturada como um importante mecanismo desencadeado pelo *T. cruzi* no hospedeiro. Essa hipótese autorreativa sugere que, independentemente da causa inicial, ocorre uma desregulação do mecanismo de vigilância do organismo devido a um potente estímulo imunológico, e esse mecanismo desempenha um papel importante no dano do tecido cardíaco (BONNEY; ENGMAN, 2015; BONA *et al.*, 2018). Foi inicialmente demonstrada por SANTOS-BUCH e TEIXEIRA (1974), quando observaram destruição de fibras cardíacas de fetos de coelhos por linfócitos oriundos do sangue periférico de coelhos chagásicos crônicos, enquanto os linfócitos dos animais controles não atacaram as células do coração (SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974). Dessa forma, notou-se que linfócitos imunocompetentes do coelho chagásico tiveram capacidade pré-formada para destruir miofibras e neurônios do sistema nervoso parassimpático de coelhos saudáveis, sem doença de Chagas (TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Para explicar a autoimunidade, foram propostos diversos mecanismos, entre eles o mimetismo molecular, a ativação *bystander* e a integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma hospedeiro.

### **2.2.1. Mimetismo molecular**

A teoria de mimetismo molecular propõe que células imunocompetentes (T ou B) sejam estimuladas por antígenos do parasita que possuem motivos de aminoácidos ou epítomos tridimensionais semelhantes aos de proteínas encontradas no próprio organismo, desencadeando reações cruzadas e levando à ativação de células T, com consequente rejeição ao tecido (TEIXEIRA *et al.*, 2011b; BONNEY; ENGMAN, 2015; BONA *et al.*, 2018). Neste sentido, o mimetismo molecular entre a cadeia pesada da miosina (resíduos 1442 a 1447,

AAALDK) e a proteína B13 de *T. cruzi* sugere que as lesões cardíacas de Chagas podem ser desencadeadas por células T efectoras específicas do antígeno parasitário (CUNHA-NETO *et al.*, 1996; RODELES *et al.*, 2016). Outros mimetismos já foram identificados, como a proteína flagelar de tripomastigotas (FL-160) e epítomos encontrados em tecidos nervosos (VAN VOORHIS *et al.*, 1993), a proteína ribossomal L27 de *T. cruzi* e proteínas ribossomais de diferentes espécies, incluindo a de *Homo sapiens* (PERONE *et al.*, 2003); proteínas de 45 kDa do parasita, como a cruzipaina e a calreticulina, que reagem de forma cruzada com os antígenos do hospedeiro (TEIXEIRA, *et al.*, 2011b).

Outrossim, anticorpos específicos e células B podem participar do mecanismo de citotoxicidade mediado por células dependentes de anticorpos em que neutrófilos, eosinófilos e células *Natural Killer* interagem com esses anticorpos via CD16 (receptor Fc) e liberam moléculas líticas como enzimas, perforinas ou TNF nas células-alvo, independentemente do sistema de complemento (BONA *et al.*, 2018).

Entretanto, esse mecanismo parece não ser o único responsável por desencadear a resposta autoimune verificada na DC, visto que a imunização de camundongos com parasitas mortos por aquecimento não foi suficiente para produzir danos cardíacos com a mesma intensidade do ocasionado pelos parasitas vivos (BONNEY *et al.*, 2012), os quais tinham depósito significativo de anticorpos no miocárdio, indicativos de reação cruzada. Além disso, a transferência adotiva de soro de animais imunizados com *T. cruzi* morto para receptores saudáveis não induziu dano cardíaco (BONNEY *et al.*, 2012).

### **2.2.2. Ativação *bystander***

A ativação *bystander* é causada pela exposição das proteínas intracelulares do hospedeiro e do parasita, resultando na liberação de grande quantidade de autoantígeno em um ambiente rico em mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, componentes da linfotóxina, óxido nítrico e grânulos dos eosinófilos e polimorfonucleares, que induz a produção de autoanticorpos (WEN *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2018). Nesse contexto, ocorre uma quebra no sistema de auto tolerância, com o consequente estímulo de células T citotóxicas resultando numa resposta contra o hospedeiro (MACHADO *et al.*, 2012)

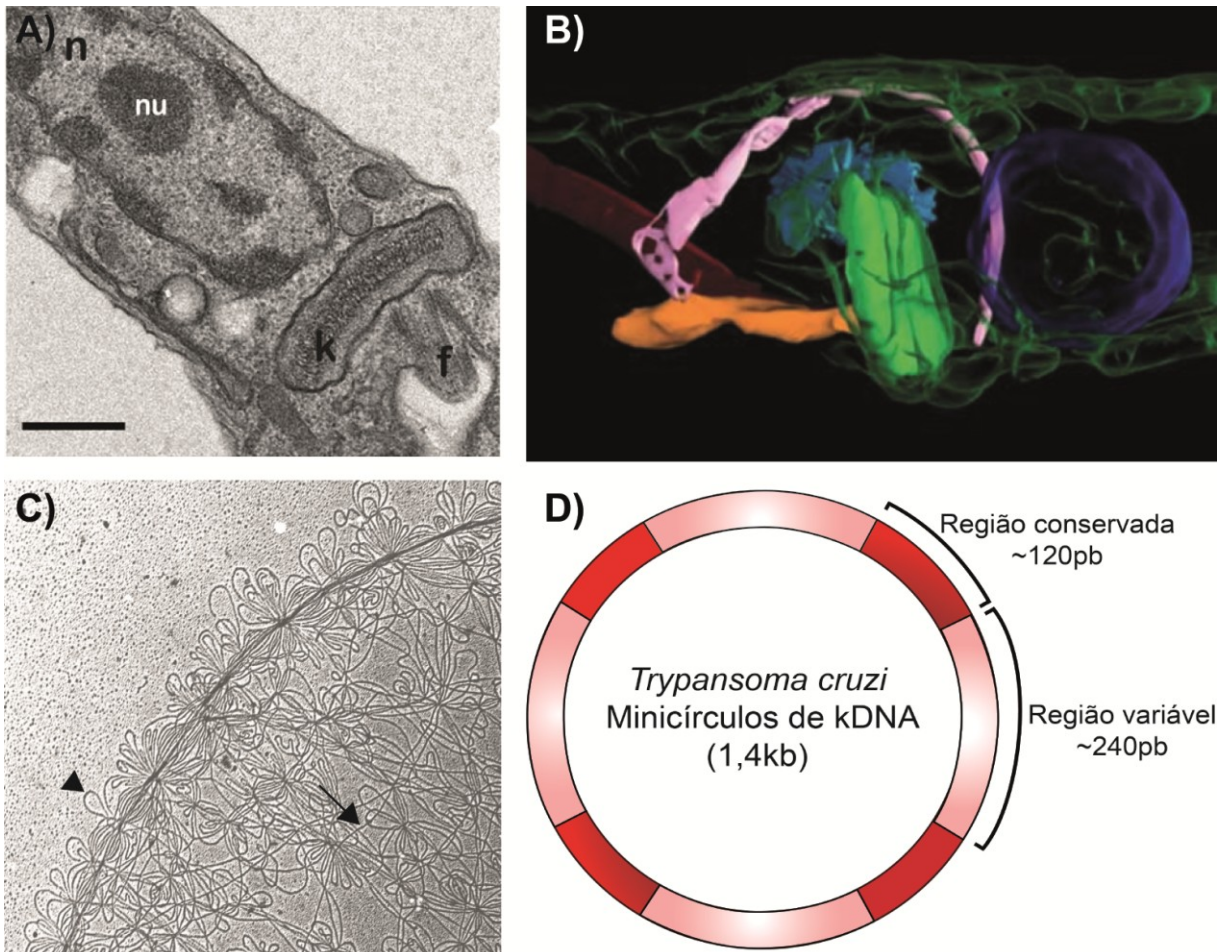
Além disso, também ocorre resposta a antígenos de *T. cruzi* apresentados por moléculas do complexo de histocompatibilidade I das células infectadas. Sabe-se que os fatores inflamatórios presentes no ambiente local, como o interferon- $\gamma$  e o óxido nítrico, promovem a ativação de células T potencialmente auto reativas, que encontram o principal

antígeno ligado ao complexo de histocompatibilidade. Uma vez ativados, os linfócitos auto reativos podem proliferar em resposta ao autoantígeno presente nas células apresentadoras de antígenos do hospedeiro (BONNEY; ENGMAN, 2015). Um aspecto questionável desta teoria refere-se ao fato de que é na fase crônica da doença de Chagas que se verifica o surgimento das manifestações clínicas, contrastando com uma diminuição acentuada de parasitemia, lise celular e liberação de proteínas próprias (KIERSZENBAUM, 1999; KIERSZENBAUM, 2005).

### **2.2.3. Integração do kDNA**

Por ser o parasita *T. cruzi* da ordem Kinetoplastida, apresenta, na região apical, dentro da mitocôndria, uma estrutura discoide, conhecida como cinetoplasto (Kinetoplasto). O cinetoplasto possui rede de milhares de DNA circulares concatenadas, denominado DNA do cinetoplasto ou kDNA. Os círculos de kDNA constituem aproximadamente 25% do genoma total do parasita e são divididos em dois tipos, maxicírculos e minicírculos (Fig. 5). Os maxicírculos têm cerca de 40 kb e codificam RNAs ribossomais e subunidades de complexos da cadeia respiratória. Já os minicírculos possuem aproximadamente 1,4 kb e consistem em quatro regiões constantes intercaladas por sequências variáveis. Estas últimas codificam os gRNAs (RNAs guia), moléculas que participam da edição do RNA mensageiro, que consiste na inserção e deleção de uridina dos transcritos dos maxicírculos para formar mRNAs funcionais (CAVALCANTI; SOUZA, 2018; LUKEŁ *et al.*, 2002).





**Figura 5.** DNA do cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi*. a) ME de formas epimastigota de *T. cruzi* evidenciando núcleo (n), nucléolo (nu) e cinetoplasto contendo o kDNA (k) e flagelo (f) (scala de barra: 0,5 $\mu$ m). b) Estrutura tridimensional de *T. cruzi* evidenciando a mitocôndria única (verde), o cinetoplasto (verde claro), o núcleo (azul), o flagelo (vermelho) e o complexo de Golgi (azul claro). c) Micrografia eletrônica de um segmento de uma rede de kDNA de *C. fasciculata*. É possível observar os minicírculos (pequenos loops) (cabeça de seta) e os maxicírculos (seta). d) Estrutura do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* (Adaptado de KLINGBEI; ENGLUND, 2004; RAMOS *et al.*, 2011; HECHT *et al.*, 2010) e GONÇALVES *et al.*, 2018).

Diversos estudos demonstram a transferência de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma de diferentes hospedeiros vertebrados (HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011a; TEIXEIRA *et al.*, 2011b), e isso parece estar relacionado ao aparecimento das manifestações clínicas da DC (TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Inicialmente, TEIXEIRA *et al.* (1991) detectaram o DNA de *T. cruzi* associado ao DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados pelo parasita, por técnica de citogenética. Posteriormente, demonstrou-se que apenas os minicírculos do kDNA se integravam no DNA nuclear de macrófagos humanos em cultura (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Em seguida, SIMÕES-BARBOSA *et al.* (1999) clonaram macrófagos infectados com *T. cruzi* e tratados com benznidazol e os mantiveram por 38 meses, com passagens seriadas semanais. Ao final do experimento, verificou-se que as linhagens subclonais retiveram o DNA exógeno. De



interesse, o *Southern blot* genômico dessas células apresentou tamanhos de bandas superiores a 1,4 kb quando hibridizadas com sondas específicas de kDNA, sugerindo a associação do minicírculo com o DNA do hospedeiro. O mesmo padrão de bandas não foi observado nas células não infectadas.

Experimentos *in vivo* corroboraram os achados *in vitro* (GUIMARO *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2011a; HECHT *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas em coelhos, camundongos e humanos sugeriram que as integrações se concentraram em elementos LINE-1 e são mediadas por micro homologias ricas em A/C, compartilhadas entre o kDNA e o sítio de integração (NITZ *et al.*, 2004; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; HECHT *et al.*, 2010). A associação da integração do kDNA e o surgimento das manifestações clínicas foram demonstrados em galinhas que nasceram de ovos inoculados com *T. cruzi*. As aves são refratárias ao parasita, porém permissivas à infecção até o oitavo dia do desenvolvimento embrionário, o que possibilitou o uso de um modelo experimental no qual se observaram os minicírculos de kDNA integrados no genoma, na ausência de *T. cruzi*. Interessantemente, as aves modificadas desenvolveram cardiomegalia semelhante a da doença de Chagas humana (NITZ *et al.*, 2004, TEIXEIRA *et al.*, 2011a; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Assim, acredita-se que essas modificações no genoma dão origem a perturbações de tolerância imunológica que levam à rejeição do coração. De interesse, a ablação de células da medula óssea de aves kDNA positivas seguida de transplante de células de medula óssea de ave sadia resultou na não rejeição do coração pela ave (GUIMARO *et al.*, 2014).

### **2.3. Transferência Gênica Horizontal (TGH)**

As trocas genéticas entre organismos de mesma espécie ou de espécies distintas é objeto de estudo desde Darwin, quando foram levantadas as primeiras evidências de variabilidade e transferências genômicas. Desde então, fenômenos como a transferência lateral de DNA vêm sendo observados como um importante componente da evolução. Muitos casos de eventos TGH funcionais entre reinos puros foram documentadas, principalmente de trocas genéticas entre procarioto e eucarioto (HUSNIK; MCCUTCHEON, 2017). Em regra, a grande maioria dessas aquisições é neutra, no entanto, em alguns casos, parece com o tempo produzir algum fenótipo, gerando assim um efeito benéfico ou maléfico. Quando os genes importados permanecem neutros ou causam mal ao hospedeiro, sem haver benefício óbvio associado à sua retenção, é provável que esses genes sejam perdidos com o tempo (SOUCY; HUANG; GOGARTEN; 2015). Hoje se sabe que essas transferências gênicas são partes

importantes das principais transições evolutivas, variabilidade genética que podem contribuir inclusive para o desenvolvimento de doenças e que tais eventos adaptativos levam à aquisição de novas funções em eucariotos, incluindo defesa contra patógenos bacterianos (HUSNIK; MCCUTCHEON, 2017; VAN ETTEN; BHATTACHARYA, 2020). Análises de sequências genômicas disponíveis em bancos de dados indicam que a transferência lateral de DNA em eucariotos tem duas fontes principais: transferência de material genético de organelas para o núcleo e TGH envolvendo espécies distintas de doadores e receptores, de tal modo que esses genomas são considerados quiméricos, pois contêm genes de múltiplas linhagens de doadores (A KATZ, 2002).

Os fragmentos de DNA mitocondrial e plastidial são continuamente transferidos para genomas nucleares eucarióticos, dando origem a cópias nucleares de DNA mitocondrial (numts) ou de DNA plastidial (nupts) (PORTUGEZ; MARTIN; HAZKANI-COVO, 2018). Vários exemplos sugerem que, semelhantes a numts, sequências transferidas horizontalmente são frequentemente integradas em regiões enriquecidas de transposons e retrotransposons de DNA (HUSNIK; MCCUTCHEON, 2017). Genes transferidos a parasitas parecem modificar ou dar uma maior resistência. Em *Trichomonas vaginalis*, por exemplo, é provável que genes transferidos horizontalmente codifiquem uma cisteína peptidase, proteína envolvida nas propriedades de virulência deste parasita. (VAN ETTEN; BHATTACHARYA, 2020; ARROYO *et al.*, 2015).

## **2.4. Possíveis rotas de transferência e inclusão do kDNA na célula hospedeira**

### **2.4.1. Vesículas extracelulares (VEs)**

Para que ocorra a transferência do DNA entre organismos de diferentes espécies, as células se munem de estratégias que viabilizam a saída desse material genético e a sua inclusão no genoma de destino. Entre os procariotos, por exemplo, foi observada que essas transferências ocorrem através de três mecanismos como transformação, transdução e conjugação (SIEBER; BROMLEY; HOTOPP, 2017). No reino protista, também existem mecanismos que supostamente estão envolvidos na TGH. Hoje sabe-se que vesículas secretadas por eucariotos são importantes carreadores da informação genética exógena, atuando como mediadores na comunicação intercelular. As VEs são partículas constituídas por uma bicamada lipídica, que protege seu conteúdo de enzimas degradantes presentes nos fluídos corporais, e podem modular eventos de curto e longo alcance, permitindo que células se comuniquem mesmo estando distantes (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Essas partículas são capazes de transportar moléculas de DNAs genômicos (gDNA) de dupla- e simples-fita, DNAs circulares, RNAs, miRNAs, de tal modo que recentemente postulou-se que essa transferência pode inclusive aumentar a expressão de proteínas específicas nas células receptoras, o que demonstra que os componentes intravesiculares são funcionais (CAI *et al.*, 2013). Os componentes das VEs podem ser transferidos de uma célula para outra por endocitose ou fusão com a célula receptora. Tais vesículas podem ser classificadas como corpos apoptóticos (<4000 nm), proteossomas (40–490 nm), exossomos (30–100 nm) e microvesículas (100 e 1000 nm) (AUCAMP *et al.*, 2018). Estudos recentes revelaram que tanto DNA mitocondrial quanto DNA cromossômico foram encontrados em VEs (CAI *et al.*, 2013). A presença de ácido nucleico em vesículas foi muito bem caracterizada em *Plasmodium falciparum* com o uso de nanotecnologias que forneceram evidências da presença de RNA não codificador e de DNA genômico desses parasitas nas vesículas (SISQUELLA *et al.*, 2017).

O estudo do papel dessas vesículas na interação parasita-hospedeiro tem se mostrado promissor. MOREIRA, SERRANO e OSUNA (2019) observaram que vesículas extracelulares de *T. cruzi* aumentaram os níveis de cálcio intracelular, o que parece afetar a dinâmica do citoesqueleto de actina, alterando permeabilidade da membrana celular, facilitando assim, a invasão do parasita à célula hospedeira (MOREIRA; SERRANO e OSUNA, 2019). Recentemente foi observada que VEs de *T. cruzi* induzem a liberação de fragmentos de DNA, que, por sua vez, sinaliza a via PARP1-cCAS NF- $\kappa$ B de ativação inflamatória de macrófago e essa ativação conseqüentemente potencializa a inflamação na fase crônica da doença. Desse modo, sabe-se que VEs carregam em sua membrana marcadores que auxiliam na resposta parasita-hospedeiro e podem, além de mediar a entrada do parasita nas células, mediar a resposta imune do hospedeiro (TORRECILHAS *et al.*, 2020). Há pouco tempo, foi detectado kDNA em isolados de vesículas extracelulares obtidas de sobrenadante de culturas de *T. cruzi* (CHOUDHURI; GARG, 2020). Apesar dos avanços, ainda são necessários a continuidade dos estudos, notadamente para caracterização dos componentes intracelulares de VEs de *T. cruzi* e sua conseqüência na interação parasita-hospedeiro.

#### **2.4.2. Elementos transponíveis (ETs)**

Uma vez que esse material genético exógeno alcança o citosol da célula receptora, as vias celulares do hospedeiro podem ser utilizadas para viabilizar a inserção do ácido

nucleico externo ao núcleo. Diversos estudos relatam o papel de elementos transponíveis na mediação de transferência gênica lateral, bem como seu frequente deslocamento entre espécies amplamente divergentes. Experimentos de hibridização *in situ*, PCR e análises computacionais demonstraram que sequências de retrotransposons do tipo *Penelope*-like foram transferidas de artrópodes para o genoma de coníferas (LIN; FARIDI; CASOLA, 2016). Estudos mostraram que a reativação de ET está claramente associada a condições patológicas incluindo envelhecimento, distúrbios neurológicos e autoimunidade (CHUONG; ELDE; FESCHOTTE, 2017)

Sabe-se que existem duas classes de elementos transponíveis, de um lado estão aqueles que são autônomos, uma vez que codificam genes que promovem sua replicação independentemente do cromossomo hospedeiro, e do outro lado aqueles elementos não autônomos. Os últimos dependem da maquinaria da célula hospedeira para expressar seus genes (CHUONG; ELDE; FESCHOTTE, 2017). O sequenciamento do genoma humano revelou que aproximadamente 45% do genoma humano são derivados de elementos transponíveis. Estes incluem transposons de DNA, retrotransposons de repetição terminal longa (*Long Terminal Repeat* - LTR) e retrotransposons não-LTR. Metade do nosso DNA é oriundo de elementos transponíveis antigos, principalmente retroelementos. Os retroelementos humanos são classificados em duas classes principais. A primeira categoria contém os Longos Elementos Nucleares Intercalados (*Long Interspersed Nuclear Elements* - LINEs), representado pelos elementos L1 e L2, enquanto os elementos Alu e SVA pertencem aos Elementos Nucleares Intercalados Curtos (*Short Interspersed Nuclear Elements* – SINEs) (MEDSTRAND; VAN DE LAGEMAAT; MAGER, 2002).

Os retroelementos LINE 1 representam a classe mais prolífica de retroelementos, compreendem aproximadamente 17 % do genoma humano, têm um comprimento aproximando de 6 kb e contêm uma região 5' não traduzida (UTR), duas regiões de leitura de fase aberta, ORFs (*Open Reading Frame*), e uma região UTR 3', que é pontuada por uma cauda poli (A) (Fig. 6). A LI 5' UTR abriga um promotor interno de RNA polimerase II que direciona a transcrição das extremidades 5' do elemento; ele também contém sítios de ligação de ação *cis* para múltiplos fatores de transcrição. As regiões ORFs se subdividem em ORF 1 e ORF 2 (BECK *et al.*, 2011). A região ORF 1 codifica ORF1p, proteína necessária para retrotransposição de L1. A ORF 1 tem um domínio amino-terminal enrolado em espiral, um motivo de reconhecimento de RNA localizado centralmente e um domínio carboxil-terminal básico. A ORF1p tem atividade de chaperona de ácido nucleico que pode ser importante na

integração de L1 (BECK *et al.*, 2011). A região ORF2 codifica a proteína ORF2p, que possui atividade de endonuclease e transcriptase reversa que são necessárias para sua mobilidade na geração de novas inserções distribuídas aleatoriamente nos genomas (PÉREZ; ALARCÓN-RIQUELME, 2017). Além disso, a ORF2p contém um domínio rico em cisteína de função ainda desconhecida, perto de seu terminal carboxil, necessário para retrotransposição (BECK *et al.*, 2011). Recentemente foi descoberto um novo quadro de leitura aberto, a ORF0. Ele está localizado na 5'UTR do transcrito de LINE-1 e na fita oposta aos genes estruturais ORF 1 e ORF 2. O promotor *antisense* (ASP) pode iniciar a transcrição e regular a ORF0 para aumentar a mobilidade de LINE -1 (ZHANG; ZHANG; YU, 2020).

Elementos Transponíveis	Estrutura	HGR (%)	kb
<b>Retrotransposons</b>			
Autônomo			
Não-LTR		~17%	6,0 - 7,0

**Figura 6.** Estrutura do LINE-1. Porcentagem na sequência de referência do genoma humano (HGR) e se está ativo. Abreviaturas para UTR, região não traduzida; CC, bobina enrolada; RRM, motivo de reconhecimento de RNA; CTD, domínio carboxil-terminal; EN, endonuclease; RT, transcriptase reversa; C, domínio rico em cisteína; *An*, cauda poli(A); ORF, quadro de leitura aberto (Adaptado de BECK *et al.*, 2011; PÉREZ e ALARCÓN-RIQUELME, 2017; ZHANG; ZHANG e YU, 2020).

Reforçando a importância dos elementos móveis na aquisição de DNA exógeno, KITSOU *et al.* (2016) demonstraram que espermatozoides pré-incubados com vetores plasmidiais contendo retroelementos LINE-1 apresentam maior capacidade de incorporar DNA externo (KITSOU *et al.*, 2016). Além dos elementos que trabalham no sistema “copia-e-cola”, existem também transposons que usam um mecanismo de replicação de “círculos rolantes” por meio de um intermediário de DNA fita-simples para realizar a transferência horizontal de material genético entre organismos distantes (BABII *et al.*, 2017; THOMAS; PRITHAM, 2015). Os hélintrons representam uma fração substancial do genoma de vários organismos, incluindo os mamíferos, e são capazes de transportar uma variedade de sequência do hospedeiro, como RNAs mensageiro, retrotransposons, transposons de DNA, íntrons, éxons e regiões reguladoras (THOMAS *et al.*, 2014). De interesse, sabe-se que os numts são identificados em regiões ricas em retrotransposons, indicando a participação da maquinaria dos elementos móveis na transferência dos genes mitocondriais para o núcleo (TSUJI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

A atividade do retroelemento LINE -1 também pode estar associada com o desenvolvimento de doenças e de processos de senescência. CECCO *et al.* (2019) observaram

que fibroblastos em senescência apresentaram maior quantidade de L1, e que esse aumento está relacionando com a expressão da citocina Interferon tipo I (INF-I), uma citocina com atividade inflamatória (CECCO *et al.*, 2019). Desse modo, sugere-se que a atividade de LINE-1 pode estar envolvida em doenças autoimunes, uma vez que está associada à liberação de grande quantidade ssDNA (DNA fita simples) livres no citosol aumentando a resposta inflamatória subsequente à expressão de INF-1 (THOMAS *et al.*, 2017; PÉREZ; ALARCÓN-RIQUELME, 2017).

Assim o uso de inibidores da transcriptase reversa (iTR) tem se mostrado promissor para o tratamento de câncer. A inibição de TR reduz a proliferação de células cancerígenas, promove sua diferenciação e antagoniza a progressão tumoral em modelos animais (SCIAMANNA; LUCA; SPADAFORA, 2016). Existem duas classes principais de inibidores de TR, os inibidores de nucleosídeos ou nucleotídeos (NRTI) e os inibidores não-nucleotídeos (NNRTI). Os NRTIs são inibidores que não possuem um grupo 3'-hidroxil na porção 2'-desixirribosil e terão um nucleosídeo como base. Eles são incorporados na fita de DNA em crescimento e atuam como terminadores de cadeia, impedindo a formação de uma ligação 3'-5'-fosofodiester nas cadeias de DNA em crescimento, de tal modo que impede a replicação viral. A incorporação da droga durante a síntese de DNA depende de RNA ou DNA dependente de DNA. Dentro desta classe encontram-se Zidovudina e Truvada (Emcitrabina e Tenorfovir). Tanto a Zidovudina quanto os inibidores Emcitrabina e Tenorfovir são NRTIs capazes de inibir a restrotransposição de LINE-1 de humano e de camundongos em diferentes graus (BAÑUELO-SANCHEZ *et al.*, 2019).

Os inibidores de TR não-nucleosídeos (NNRTI) são inibidores alostéricos da polimerização do DNA, interferindo diretamente na polimerização do DNA. Seu principal mecanismo de ação é agir através da ligação do NNRTI à TR, e a criação de uma bolsa hidrofóbica próxima ao sítio ativo. Esta bolsa cria uma nova configuração espacial do local de ligação ao substrato para reduzir a atividade geral da polimerase. Ao criar uma configuração diferente, a síntese de DNA torna-se globalmente mais lenta. Dentro desta classe destacamos o inibidor Nevirapina, que atua prevenindo a replicação do vírus HIV-1 por inibição não competitiva da TR. Mas não tem efeito inibitório significativo na TR do HIV-2 ou nas polimerases eucarióticas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (DAS *et al.*, 2012; USACH; MELIS; PERIS, 2013; PATEL; ZULFIQAR, 2022).

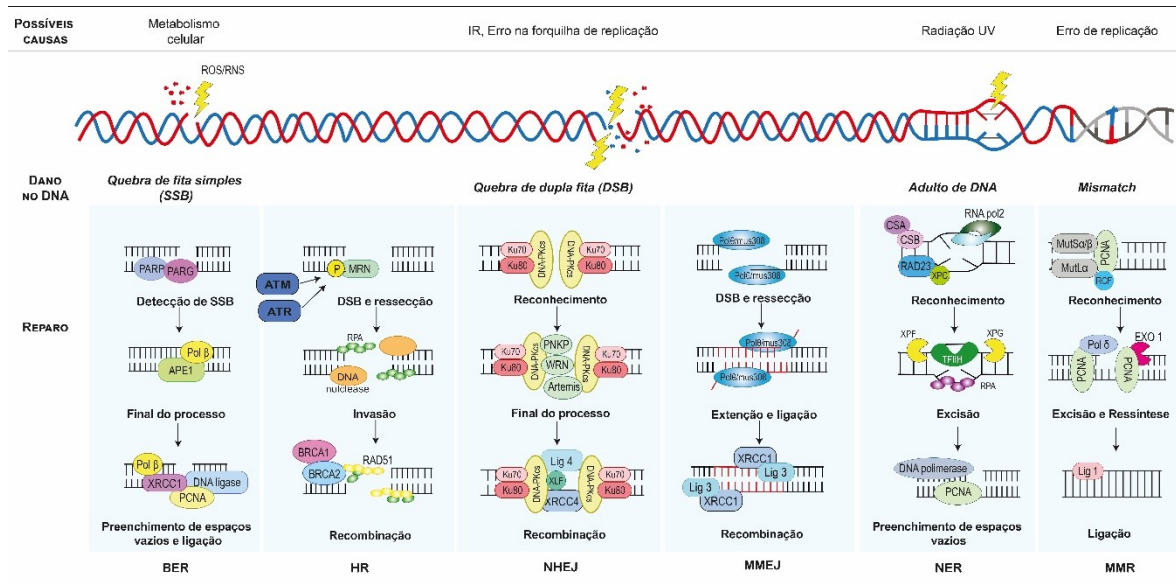
## 2.5. Vias de reparo do DNA e seus inibidores

O objetivo principal de cada forma de vida é entregar o seu material genético intacto e inalterado para a próxima geração. No entanto, cada célula humana experimenta mais de 10 mil lesões de DNA por dia, a maioria sendo tipicamente causadas por processos celulares normais. Em razão desses constantes ataques, as células desenvolveram um maquinário complexo de reparo de DNA, que funciona como um sistema de alarme endógeno, a depender do tipo de dano ocorrido, monitorando constantemente a integridade do genoma através da coordenação precisa de uma rede de vias, garantindo a transmissão fiel do material genético, incluindo replicação, reparo de recombinação do DNA, *checkpoint* do ciclo celular e segregação cromossômica (RAGU; MATOS-RODRIGUES; LOPEZ, 2020; JACKSON; BARTEK, 2009). Esses mecanismos compõem um sistema de correção chamado de Resposta ao Dano do DNA (DDR, do inglês *DNA Damage Response*). Danos excessivos ao DNA ou reparo deficiente resultariam no acúmulo de distúrbios genômicos que conseqüentemente resultam na morte ou no rearranjo celular (WANG; CHEN; AO, 2021).

Elementos do metabolismo que podem causar a produção de subprodutos e intermediários prejudiciais ao DNA, tais como espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécie reativas de oxigênios (ROS), são tidos como fatores endógenos que danificam o DNA. Já aqueles obtidos por fatores exógenos são oriundos do ambiente, podendo ser tanto físicos (radiação ionizante, luz UV) quanto químicos (agentes alquilantes, reticulantes, oxidantes) (MASLOWSKA; MAKIELA-DZBENSKA; FIJALKOWSKA, 2019).

Esses danos podem ser ocasionados por duas vias: via direta e a via indireta. Na via direta, o dano é causado diretamente na molécula do DNA, enquanto na via indireta, o dano corre por meio de, por exemplo, ativação dos radicais livres, que lesionam o DNA (HUANG; ZHOU, 2021). Assim, erros espontâneos durante a replicação do DNA podem resultar na incorporação de nucleotídeos errados na molécula de DNA recém-sintetizada, causando pares de bases incompatíveis. Da mesma forma, ROS ou RNS são geralmente produzidas como subprodutos de múltiplas atividades fisiológicas em diversos locais subcelulares. Entre os principais tipos de lesão ao DNA, destacam-se geração de sítiosapurínicos/apirimidínicos (AP), quebra de fita simples de DNA (SSB), quebra de Dupla Fita (DSB) ou substituição de bases, adutos volumosos de DNA, reticulação das fitas e erros de incompatibilidade, ligação cruzada entre cadeias (CARUSILLO; MUSSOLINO, 2020; HUANG; ZHOU, 2021). Para cada tipo de dano, ativa-se uma ou mais vias de reparo a

dependem dos mecanismos da célula. A figura abaixo exemplifica o dano, as possíveis causas e o tipo de via de reparo que é ativada para corrigir o dano (Fig. 7).



**Figura 7.** Principais vias de reparo do DNA. Possíveis causas de dano ao DNA, danos ao DNA, principais vias envolvidas no reparo nas células de mamífero. A quebra de fita simples, de origem metabólica, causadas por radicais livres, pode ser reparada pela via BER. Quebra de dupla fita, causadas por Radiação Ionizante ou erro na forquilha de replicação, pode ser reparada pela via HR, MMEJ e NHEJ. Adultos de DNA, gerados por radiação UV são reparados pela via NER e erros de pareamento de bases são reconhecidos e reparados pela via MMR. Abreviaturas: IR, Radiação Ionizante; DDR, Resposta ao Dano no DNA; SSB, quebra de fita simples de DNA; DBS, quebra de Dupla Fita; NER, reparo por Excisão de Nucleotídeo; BER, reparo por Excisão de Bases; MMR, reparo de incompatibilidade; NHEJ, reparo por recombinação não-homóloga; HR, Recombinação Homóloga; MMEJ, Junção de Extremidade Mediada por Microhomologia (Adaptado de ALHOMUD *et al.*, 2020; PERKHOFER *et al.*, 2020).

Em geral, a DDR envolve o reconhecimento da lesão do DNA, seguido pelo início de uma cascata de sinalização celular para promover o reparo do DNA, que pode ser auxiliado por uma pausa na progressão do ciclo celular (ativação de *checkpoint*) e/ou apoptose, presumivelmente para mitigar a propagação de células potencialmente mutadas, uma vez que o dano não reparado pode levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer ou outras patologias relacionadas à idade (BLACKFORD; JACKSON, 2017; MENCK; MUNFORD, 2014).

Entre os principais mecanismos de reparo destacam-se reparo pela via da Anemia Fanconi, reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER), reparo por Excisão de Bases (BER), reparo de incompatibilidade (MMR - do inglês, *Mismatch Repair*), vias de reparo envolvidas no SSD e DSB entre eles, reparo por Recombinação Homóloga (HDR), reparo por recombinação não-homóloga (NHEJ - *nonhomologous end-joining*), junção de Extremidade



Mediada por Microhomologia (MMEJ - *microhomology-mediated end-joining*) e reconhecimento de fita simples (SSA) (CARUSILLO; MUSSOLINO, 2020).

Resumidamente, a via BER é ativada pelo reconhecimento de SSB, pelo complexo PARP/PARG, que se liga ao DNA fita simples, ativa a APE, uma endonuclease apurínica/apiridinica (AP) que cliva o sítio AP para formar o terminal 3' OH no local do dano. A DNA Pol  $\beta$  e a ligase corrigindo as pequenas lesões e selando o corte. A maquinaria NER, por sua vez, é ativada por um dano maior e envolve a proteína de complementação cruzada de reparo por excisão (ERCC1), que participa ativamente na excisão do DNA da lesão, seguida de substituição com replicação (WANG; CHEN; AO, 2021). O reparo de DSB pode acontecer pelas vias HR, NHEJ e MMEJ, que podem ser ativadas simultaneamente. A HR e NHEJ são duas principais vias para correção de DSB. A HR é iniciada com a ressecção de pontas de quebra, seguida pela formação do filamento da nucleoproteína Rad 51 por BRCA2 e Rad51, que recupera a sequência homóloga e promove a formação de moléculas conjuntas entre DNA quebrado e o molde homólogo. Acredita-se que o NHEJ une diretamente as extremidades de quebra. Em NHEJ, o heterodímero composto por Ku70/Ku80 e a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) reconhece o DSB e facilita os fatores de sinalização e a junção, como XRCC4, XLF e DNA Ligase 4, que promovem então o reparo (WANG; CHEN; AO, 2021). Uma terceira via de reparo de DSB, que compartilha mecanismos semelhantes à HR e NHEJ, mas são geneticamente distintas, é a via de reparo Alt-EJ por junção de extremidade mediada por microhomologia (MMEJ). Essa via requer Pol  $\theta$  (mus308) para alinhar ou modelar microhomologias curtas gerando deleções e inserções. A Pol  $\theta$  reconhece o sítio danificado, liga-se ao ssDNA nas extremidades de um DSB e alinha sequências de microhomologias curtas de 4 a 10 pares de base. As extremidades são então ligadas entre si pelo complexo Ligase III (Lig3)/XRCC1. Essa via, apesar de ser considerada uma opção das vias utilizada pela célula para o DDR, é uma ferramenta altamente propensa a erros, podendo gerar deleções e inserções no sítio de alinhamento intervalo (ALEXANDER; ORR-WEAVER, 2016).

Se a modificação no DNA não for reparada a tempo, erros de incompatibilidade durante a transcrição podem ocorrer. Esses erros são identificados pela maquinaria de reparo via MMR, uma via de reparo direcionada a erros associados à replicação (WANG; CHEN; AO, 2021; MIKHED *et al.*, 2015). Nesta via, as enzimas MutS e MutL reconhecem desde erros de pareamento de base a loops de inserção/deleção. Ao reconhecerem a incompatibilidade, desencadeiam a cascata de reparo que irá ativar enzimas responsáveis por

retirar os nucleotídeos incorretos (EXO 1), acrescentar (Pol  $\delta$ ,  $\beta$ ) os corretos e ligar as regiões franqueadoras (Lig1) (WANG; CHEN; AO, 2021; MIKHED *et al.*, 2015).

De interesse, as proteínas quinases relacionadas à PI3K (fosfoinositida 3-quinase) com mutação AT (ATM), relacionadas à ATM (Ataxia Telangeactasia Multada), à ATR (Ataxia Telangeactasia Rad3) e à proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) são as principais proteínas reguladoras da DDR, que participam energeticamente nas vias de sinalização (*checkpoint*) e reparo de DSB (TURNELL e GRAND, 2012). Sabe-se que o recrutamento e ativação de DNA-PKcs (subunidade catalítica de proteína quinase dependente de DNA) requerem um heterodímero Ku, que contém duas subunidades de aproximadamente 70 à 80 kDa (Ku70 e Ku80), que se liga preferencialmente às extremidades do DNA fita dupla (dsDNA), de modo que a quebra da dupla fita do DNA leva a ativação de DNA-PK e que essa proteína é crucial para o reparo de DSB pela via NHEJ (BLACKFORD; JACKSON, 2017).

As proteínas a ATM, ATR e DNA-KP possuem um domínio PI3K em sua região C terminal (BLACKFORD; JACKSON, 2017) e têm preferência por fosforilar resíduos de serina ou treonina seguido por glutamina (S/TQ). A PI3K é comumente hiperativada em carcinoma foliculares e anaplásicos de tireoide. Normalmente fosforila proteínas que mantêm a integridade genômica promovendo principalmente o DDR, controlando a progressão celular, transcrição e apoptose (BURROWS *et al.*, 2016). Além disso, essas proteínas possuem capacidade de autofosforilação, aumentando assim suas atividades e, portanto, devem ser rigidamente reguladas para evitar ativação aberrante que pode levar ao reparo tóxico de DNA, levando à parada do ciclo celular, senescência ou apoptose.

Dentro da maquinaria de reparo de DNA, temos também as proteínas do grupo XP (xeroderma pigmentoso), o qual é constituído por oito variantes distintas os genes dos grupos do XP-A ao XP-G, que estão envolvidos na via NER e que, portanto, mutações em qualquer um desses genes pode inviabilizar o reparo do DNA. (FASSIHI, 2013). A proteína XP-V é uma variante que constitui o oitavo gene do grupo XP, que codifica a DNA polimerase  $\eta$ , necessária para a replicação do DNA contendo danos não reparados induzidos por radiação UV (FASSIHI, 2013).

A p53 é um fator de transcrição que desempenha um papel importante no ciclo celular, apoptose e DDR. Sua atividade protetiva contra a carcinogênese é bastante discutida (BUDDEN; BOWDEN, 2013). A p53 pode atuar tanto na indução da via apoptótica intrínseca, regulada por BCL-2, induzindo a transcrição de genes que levarão ao

desencadeamento de efetores da morte celular, como modificando a resposta apoptótica, aumentando a sensibilização a via extrínseca, por exemplo (AUBREY *et al.*, 2016).

Finalizado o reparo, faz-se necessária a regulação negativa da atividade das vias de reparo e a remoção de complexos multiproteicos ligados ao DNA. Isso ocorre, em grande parte, pela defosforilação dos fatores envolvidos no reparo. Por exemplo, a fosfase-1, induzida pela p53 tipo selvagem (WIP1), demonstrou catalisar a defosforilação de XPA em Ser196, proteína localizada no sítio de ligação, diminuindo a atividade de NER. O efeito negativo de WIP1 na atividade de reparo sugere seu potencial oncogênico (PULZOVÁ; WARD; CHOVANEC, 2020). Em contrapartida, em virtude da ação descontrolada das vias de reparo do DNA nas terapias oncogênicas, é comum o uso de inibidores de reparo de DNA, fazendo essa regulação negativa, que, na maioria das vezes, tem por objetivo a indução da morte celular.

Verificou-se, por exemplo, que a Pentoxifilina suprime efetivamente o reparo de fita dupla de DNA, ao inibir a ATM, proteína que controla os *checkpoints* via fosforilação da p53, em células de melanoma mutantes bloqueadas em G2 por irradiação, exercendo assim um importante papel na Recombinação Homóloga (BOHM, 2006). Já o NU 7441 é um inibidor altamente seletivo de DNA-PK capaz de aumentar o efeito antitumoral sinérgico em células NPC, uma vez que interrompe o reparo de DSB, prologando a progressão do ciclo celular e ativando os pontos de verificação do ciclo celular. O complexo de proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) desempenha um papel fundamental no reparo pela via NHEJ, contribuindo para parada do ciclo celular induzida por dano em estágio inicial do DDR. (DONG *et al.*, 2017; CISZEWSKI *et al.*, 2014).

Outros inibidores como inibidores de histona deacetilase (HDAC) também afetam o reparo de DSB. O uso de inibidores de HDAC concomitante a terapias antitumorais têm se mostrado promissor para o tratamento de câncer, uma vez que aumenta o efeito de morte celular, alterando os mecanismos de *checkpoint* da célula e prejudicando o reparo de DSB, tanto por recombinação homóloga quanto por NHEJ (GOSPODINOV *et al.*, 2012).

A enzima poli (ADP-ribose) polimerase, PARP 1, é um sensor de dano ao DNA e transdutor de sinal que se liga a quebras de DNA e sintetiza cadeias de polo (ADP-ribose (PAR) em proteínas alvos (PARilação). A PARP 1 está envolvida em diferentes vias de reparo de DNA incluindo SSB, NER, NHEJ, MHEJ e HR. No entanto, a inibição ou depleção de PARP 1 desempenha um papel crítico mais profundo no reparo de SSB por meio da via BER e na forquilha de replicação (JIANG *et al.*, 2019; SLADE, 2020). A Azatioprina

interfere na via de síntese de purinas, inibindo a proliferação celular, principalmente a proliferação de linfócitos (BROEN; VAN LAAR, 2020). Seu papel é corrigir erros cometidos por polimerases durante a replicação (KARRAN, 2006).

## II. JUSTIFICATIVA

A transferência lateral de DNA refere-se ao processo de troca genética de uma espécie para outra filogeneticamente distante. Ao mesmo tempo que essas trocas de DNA representam forças evolucionárias que dirigem a complexidade genômica em nível molecular e modulam a diversidade genotípica e fenotípica de uma população, elas também podem estar associadas ao surgimento de doenças. Em relação à doença de Chagas, existem evidências de que a transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma da célula hospedeira está relacionada com o desenvolvimento das manifestações clínicas características da fase crônica da infecção. Enquanto a invasão celular e os mecanismos de sobrevivência intracelular de *T. cruzi* na fase aguda estão cada vez mais claros, as adaptações que sustentam a infecção crônica são minimamente compreendidas. São muitos questionamentos não respondidos. Não se sabe ainda se a eliminação completa do parasita do paciente não evoluirá para fase crônica sintomática, qual dinâmica da resposta imune inata e adquirida e qual nível de comprometimento a integração do kDNA influencia na patogênese da DC. Estima-se, no entanto, que ocorre uma cooperação entre esses mecanismos, de maneira heterogênea em cada paciente, que culmina na forma grave da DC.

Diante dessa problemática envolvendo a doença de Chagas e do fato de que não existem tratamentos eficazes para esta enfermidade, é de extrema importância explorar a questão da patogênese dessa doença a partir dos resultados que apontam trocas genéticas entre *T. cruzi* e o hospedeiro vertebrado. Identificar as vias celulares envolvidas na integração de minicírculos de kDNA pode ajudar no desenvolvimento de novos alvos farmacêuticos e de estratégias de tratamento mais eficazes.

As células podem utilizar-se de diferentes mecanismos para inclusão e exclusão de material genético exógeno. Sabe-se que o dano ao DNA, seja ele endógeno ou exógeno, pode ativar uma série de mecanismos que tentam reparar o dano na tentativa de manter o genoma na sua forma original. Assim, esses processos de reparo podem estar envolvidos na dinâmica de integração do kDNA. Igualmente, a atividade de retroelementos também está associada à transferência gênica lateral.

Ademais, nossos achados poderão resultar na identificação de marcador de prognóstico da doença cardíaca, que afeta 94,5% dos pacientes sintomáticos, propiciando-lhe oportunidade de tratamento e medidas de profilaxia que asseguram melhor qualidade de vida.

Neste contexto, a investigação terá relevância social e agregará conhecimentos que interessam à saúde do indivíduo infectado com *T. cruzi*.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1. Objetivo Geral**

Elucidar os mecanismos envolvidos no processo de transferência do kDNA para o genoma da célula hospedeira

#### **2. Objetivos específicos**

1. Quantificar as integrações de kDNA por meio das análises de PCR quantitativa para estabelecer a integração do kDNA
2. Verificar se diferentes tipos celulares são permissivos à integração do kDNA
3. Determinar se minicírculos de kDNA estão presentes no secretoma do parasita
4. Investigar se *T. cruzi* é capaz de modular a atividade de LINE-1 na célula hospedeira
5. Verificar se inibidores de retrotransposição, de controle epigenético e de vias de reparo de DNA impedem a integração do kDNA
6. Verificar se células AT5-BIVA, XP12RO, XP30RO e HEK 293 *knockdown* para os genes ATM, XP-A, XP-V e p53 respectivamente são resistentes à integração do kDNA

## IV. METODOLOGIA

### 1. Cultivo de células e parasitas

#### 1.1. Linhagens celulares

Para verificar a permissividade das células à integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma de diferentes tipos celulares foram utilizadas cinco linhagens celulares: HEK 293, J774A.1, L6, Caco 2, Jurkat.

As células *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293 (ATCC® CRL-1573™) são células hipotriplóides de rim de embrião humano obtidas de feto. A linhagem Caco 2 (ATCC® HTB-37™) é uma linhagem de células epiteliais humanas de cólon oriundas de adenocarcinoma colorretal. Ao atingir a confluência, as células Caco 2 expressam características de diferenciação enterocítica, como a proteína I de ligação ao ácido retinóico e a proteína II de ligação ao retinol. A monocamada de Caco 2 mimetiza *in vitro* a mucosa do intestino delgado. As células Jurkat, Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™) são linfócitos T, células não aderentes, obtidos de sangue periférico de *Homo sapiens*, com leucemia aguda de células T. As células L6 (ATCC® CRT – 1458™) são mioblastos isolados a partir de culturas primárias do músculo da coxa de rato *Rattus norvegicus*, mantidas para as duas primeiras passagens na presença de metil-colantreno. As células J774A.1 (ATCC® TIB-67™) são macrófagos murino obtidos de tumor reticular de ascite de *Mus musculus*.

As células AT5-BIVA são linhagens de células de ataxia-telangiectasia (AT) multada (*knockdown* para o gene ATM) permanentemente transformadas a partir de linhagens de fibroblastos AT2SF após transfecção com o plasmídeo bacteriano pSVori-, que contém sequências de SV40 (vírus vacuolante símio 40) com defeito na origem de replicação (MURNANE; FULLER; PAINTER, 1985). As linhagens XP12RO (*knockdown* para o gene XP-A), oriundas de carcinoma de ovário, e as XP30RO (*knockdown* para o gene XP-V), derivadas de pele humana, são fibroblastos transformados por SV40 com mutações XP (xeroderma pigmentoso) permanentes (CRUET-HENNEQUART *et al.*, 2006; KÖBERLE; ROGINSKAYA; WOOD, 2006).

#### 1.2. Manutenção das células

O cultivo das células HEK 293, L6 e Caco 2 foi realizado em frascos de cultura com área de crescimento de 50 cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas em meio Dulbecco Meio Mínimo Essencial (DMEM, D-7777 da Sigma-Aldrich), com 4500 mg / L de glicose, eu-



glutamina e piruvato de sódio, acrescido de bicarbonato de sódio, suplementando com 5 % de SFB, pH 7.2, em estufa a 37 °C com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>.

A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e o acompanhamento da cultura foi realizado em microscópio óptico invertido. A passagem normalmente aconteceu uma vez por semana ou sempre que houvesse formado uma monocamada de células com alta densidade, com confluência celular acima de 90%.

No presente estudo, também foram utilizadas células AT5-BIVA, XP12RO, XP30RO e HEK 293 *knockdown* para os genes ATM, XP-A, XP-V e p53, respectivamente. As linhagens *knockdown* foram gentilmente doadas pelos professores Carlos Frederico Martins Menck, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, e Nadja Cristhina de Souza Pinto, do Instituto de Química, ambos da Universidade de São Paulo - USP.

O processo de transfecção do *knockdown* para o gene p53 das células HEK 293 foi realizado com vetores plasmidiais expressando *short hairpin* RNAs (shRNA) específico para cada gene (*Hush shRNA plasmid 29-mer*, OriGene Technologies, EUA) conforme realizado por DIAS (2013). Em seguida, realizou-se a seleção das células transfectadas tratando-se a cultura com antibiótico puromicina, uma vez que o plamídeo utilizado contém sequência que codifica enzima puromicina-N-acetil transferase, regulada pela região promotora SV40 (vírus vacuolante símio 40). Essa sequência confere às células que receberam o plamídeo com o *knockdown* resistência à puromicina. Todas as linhagens *knockdown* foram mantidas em meio DMEM 5% de SFB, em estufa à 37°C, com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Os macrófagos foram mantidos em meio DMEM, 5% SFB, pH 7.2, e incubados a 37°C em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. O repique foi realizado toda vez que se observava a formação de uma monocamada com mais de 90% de confluência. Para tanto, utilizou-se haste de plástico (*cell scaper*) com lâmina de 18 mm para raspar a monocamada confluyente, seguindo-se a suspensão e homogeneização das células. Um mililitro da suspensão foi colocado em novo frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, acrescido de 10 mL de meio DMEM 5%.

As células Jurkat (linfócitos T) foram mantidos em meio RPMI 1640 (R4130, Sigma-Aldrich) HEPES modificado, pH 7,4, com L-glutamina e HEPES 25mM, acrescido de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de SBF. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, como recomenda o protocolo da ATCC. Por serem células

em suspensão, alternativamente, as culturas foram estabelecidas por centrifugação com subsequente ressuspensão em  $1 \times 10^5$ , adicionando-se meio fresco, a cada 2 ou 3 dias dependendo da densidade celular, não ultrapassando uma densidade de células de  $3 \times 10^6$ .

O acompanhamento do crescimento das culturas foi realizado por meio de observação em microscópio investido (Olympus CKX4).

## **2. Manutenção dos parasitas**

### **2.1. Manutenção das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Formas epimastigotas de *T. cruzi* das linhagens Berenice, Y e CL Brener foram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) com 5% de SFB inativado pelo calor, 100 IU/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Para o repique, foi retirado 1 mL de meio contendo parasita em suspensão ( $\sim 10^6$  de parasitas) e transferido para um novo tubo de 15 mL, contendo 4 mL de meio LIT novo. Sucedeu-se com os repiques uma vez a cada semana.

### **2.2. Obtenção e manutenção das formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi***

Para obtenção das formas tripomastigotas, foi inoculado 1 mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo aproximadamente  $10^6$  de formas epimastigota de *T. cruzi* Berenice, em cultura de células L6 previamente crescidas. Depois de 24 horas de infecção, todo o sobrenadante contido no frasco foi retirado e a monocamada de células L6 infectadas foi gentilmente lavada três vezes com PBS 1X, pH 7.4, para a retirada das formas epimastigotas presentes no sobrenadante. Após aproximadamente 15 dias da infecção, os parasitas, na forma tripomastigota, começaram a sair. Posteriormente, esses parasitas foram passados em camundongos *baby*, com até um mês de nascidos, para aumentar a virulência. Após a segunda passagem em camundongo, os parasitas recuperados do sangue periférico foram transferidos para cultura de células L6 e mantidos em cultura de células até a realização dos experimentos.

### **2.3. Obtenção das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi***

A indução de amastigogênese foi realizada conforme protocolo adaptado de TOMLINSON *et al.* (1995). O sobrenadante contendo tripomastigoras de *T. cruzi* Berenice,

Cl Brener e cepa Y de cultura de células L6 infectadas foi transferido para um tubo de 50 mL, centrifugado a 5000 rpm, por 10 minutos, para sedimentação dos parasitas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os parasitas foi ressuspense em meio DMEM sem SFB, pH 5.0, incubado, em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, por 5 horas. Após esse período, o tubo foi novamente centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, ressuspense em meio DMEM completo, pH 7.4, suplementado com 5% de SFB e incubado por 24h em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, para recuperação do parasita.

Após as 24h, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o *pellet* contendo amastigota foi lavado 2 vezes com PBS 1x para a retirada do meio. Ao final da lavagem o *pellet* foi ressuspense em 1 mL de PBS 1X e os parasitas foram contados em câmara de *Neubauer*. Os *pools* contendo 3 x 10<sup>7</sup> de amastigotas foram armazenados em freezer -80°C até a data da extração de DNA. Para a extração do DNA, foram considerados apenas aqueles *pools* em que o processo de transformação dos amastigotas obteve êxito acima de 90% do total de parasitas.

#### **2.4. Avaliação da atividade tripanocida do benznidazol (Bz)**

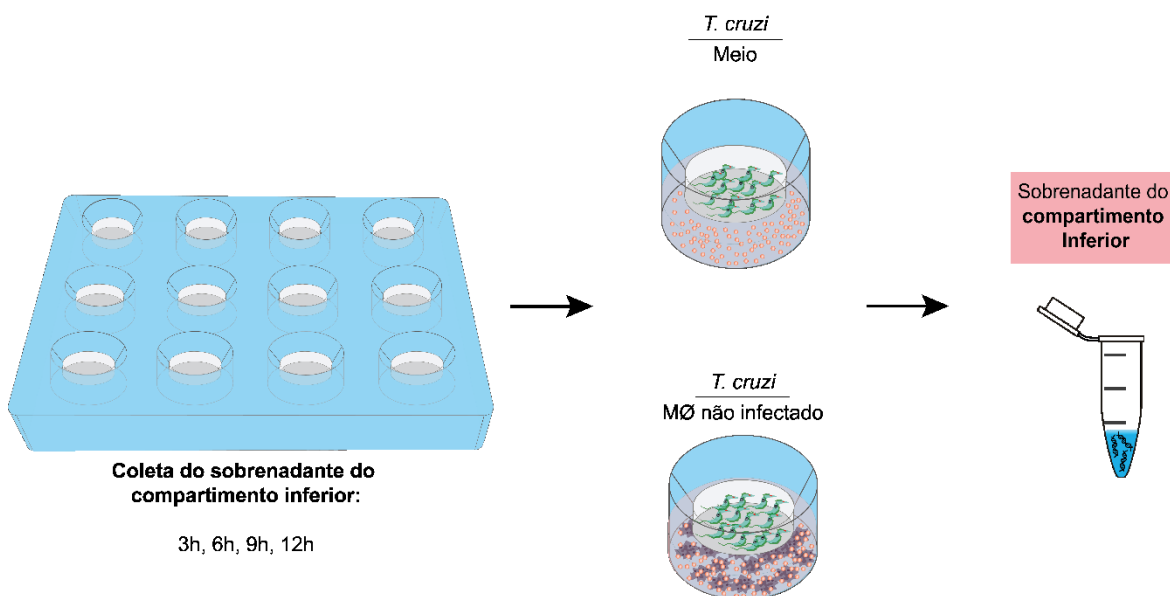
Para avaliar a atividade tripanocida e determinar a concentração de Bz a ser utilizada nos ensaios posteriores, foi testado o efeito do Bz em *T. cruzi* nas formas tripomastigotas durante 24h e 48h. Os parasitas foram plaqueados em placas de 24 poços em uma quantidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> parasitas/poço. Em seguida, foram testadas as concentrações conforme descritas na Tabela 4, partindo da concentração previamente descrita por VEGA *et al.* (2012). Após 24h e 48h do tratamento, as formas viáveis foram contadas em hemocitômetro, utilizando-se o corante azul de tripano, um corante derivado da toluidina, que colore seletivamente células mortas em azul. Dessa forma, a porcentagem da viabilidade dos parasitas foi obtida pelo cálculo da quantidade de parasitas viável (PV) vezes 100 por cento (%), dividido pela quantidade total dos parasitas (TP). (Os resultados estão dispostos na Figura S1, Anexo I).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(PV \times 100)}{TP}$$

### 3. Identificação de kDNA no secretoma de *Trypanosoma cruzi*

#### 3.1. Uso de sistemas *transwell*

Para avaliar se *T. cruzi* transfere sequências de minicírculos de kDNA através de seu secretoma, foram realizadas co-culturas em sistema *transwell* de 12 poços. O primeiro experimento avaliou a presença de minicírculos de kDNA no secretoma ao longo do tempo. Para tanto, *T. cruzi* foi incubado ou apenas com meio DMEM completo ou com macrófagos J774A.1. No grupo do macrófago, foram semeados  $2,5 \times 10^5$  de células J774A.1, no compartimento inferior de placas *transwell*. Após o semeio, a placa foi incubada por 24h em estufa nas mesmas condições antes descritas. Em seguida,  $10^6$  formas tripomastigota de *T. cruzi* Berenice foram adicionadas no compartimento superior das placas. Para o grupo com meio DMEM, no entanto, havia apenas 1 ml de meio DMEM completo no compartimento de baixo. A coleta do meio do compartimento inferior de ambos os grupos foi realizada durante 12h, em intervalos de 3h. Dessa forma, as coletas ocorreram no período de 3h, 6h, 9h e 12h após a adição de *T. cruzi* no compartimento superior (Fig. 8). O meio coletado foi conservado em solução de RNA *later* (1:1) até o momento da extração. O DNA foi extraído pelo método convencional de clorofane/clorofil descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

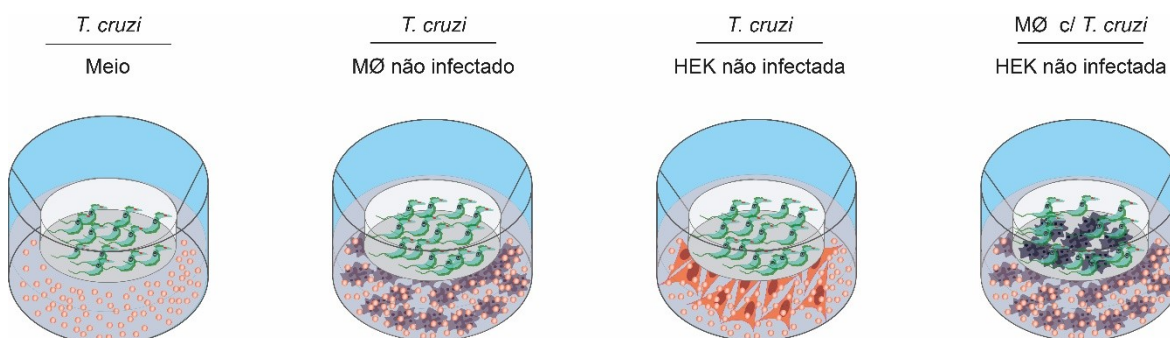


**Figura 8.** Desenho experimental para avaliação do secretoma de *Trypanosoma cruzi* ao longo do tempo. Em um sistema *transwell*, incubou-se *T. cruzi* (compartimento superior) com macrófagos não infectados ou apenas meio de cultura. Após os intervalos de tempo estabelecidos, realizava-se a coleta do sobrenadante do compartimento inferior, o qual era submetido à extração de DNA.

Em seguida, experimento similar foi realizado para se avaliar se a mudança da célula do compartimento inferior poderia alterar a liberação dos minicírculos de kDNA. Desse

modo, inicialmente foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células J774A.1 e HEK 293 no compartimento inferior de placa *transwell*. A placa foi incubada por 24h em estufa a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%. Após o período de incubação, foram adicionados no compartimento superior da *transwell*  $10^6$  tripomastigota de *T. cruzi* Berenice, respeitando-se a proporção de 1:4 (macrófagos:parasita). Após 48h da co-cultura, a parte superior foi removida e as células cultivadas no compartimento inferior foram submetidas à extração de DNA (Fig. 9).

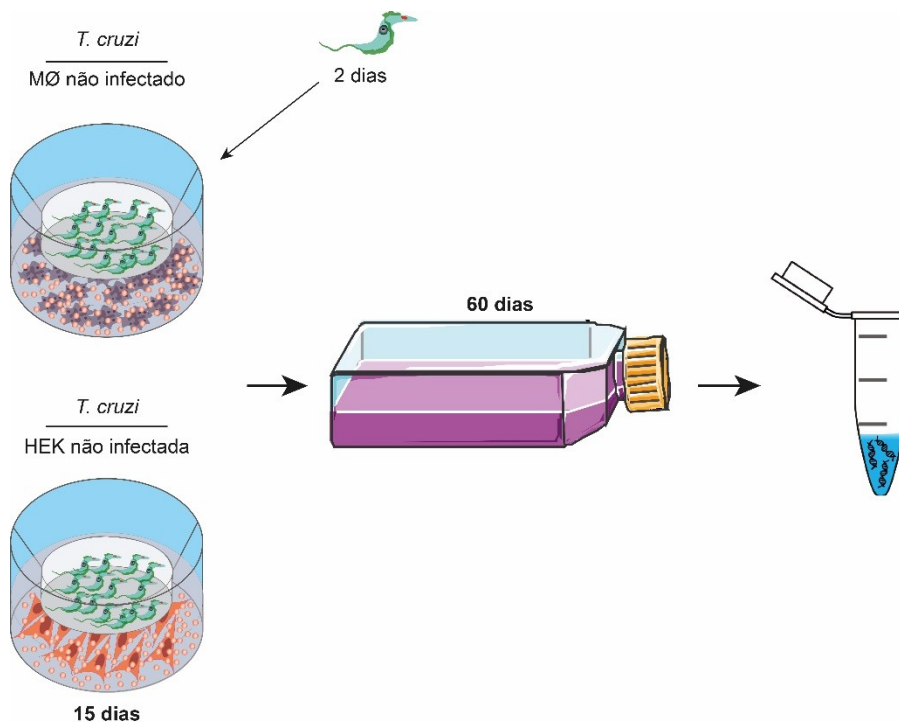
Um outro grupo foi constituído para verificar se existe diferença na liberação do kDNA a partir de secretoma liberado por células infectadas com *T. cruzi* e de apenas de *T. cruzi*. Para isso, foram inoculados  $2,5 \times 10^5$  macrófago infectados com  $10^6$  de tripomastigota de *T. cruzi* Berenice, na proporção de 1:4 na parte superior da *transwell*, e, na parte inferior,  $2,5 \times 10^5$  células J774A.1 não infectadas. Após 48h, o conteúdo do compartimento superior foi desprezado e as células da parte inferior foram submetidas à extração de DNA (Fig. 9).



**Figura 9.** Avaliação da presença de minicírculos de kDNA no secretoma de *Trypanosoma cruzi* co-cultivado com diferentes tipos celulares. Após 48h de incubação, o sobrenadante de células (compartimento inferior) co-cultivados com *T. cruzi* ou com macrófagos infectados com o parasita foi coletado e submetido à extração de DNA.

Finalmente, um último grupo foi constituído para verificar se os minicírculos de kDNA liberados no secretoma se integram no genoma da célula hospedeira. Para isso, foram semeadas  $2 \times 10^4$  células J774A.1 no compartimento inferior da placa *transwell*. Após o semeio, a placa foi incubada por 24h em estufa nas mesmas condições antes descritas, para adesão das células e a formação da monocamada. Em seguida, foram adicionadas  $10^6$  tripomastigotas de *T. cruzi* Berenice no compartimento superior das placas. Durante 15 dias no compartimento superior, foram renovados, a cada dois dias,  $10^6$  de parasitas. Após 15 dias da incubação, as células foram expandidas para frascos de cultura e mantidas até 60 dias. No tempo de 60 dias, as células foram coletadas e submetidas à extração de DNA. O DNA de

todos os grupos pois extraído pelo método de extração manual conforme sugerido por SAMBROOK e RUSSEL (2001) com adaptações (Fig. 10).



**Figura 10.** Desenho experimental para avaliar se os minicírculos de kDNA presentes no secretoma se integram no genoma da célula hospedeira. Após incubação, em placas *transwell*, de macrófagos J774A.1 com o *T. cruzi* por um período de 15 dias, as células do compartimento inferior foram coletadas e cultivadas em garrafas de cultura por 60 dias. Após este intervalo de tempo, procedeu-se com a extração de DNA.

### 3.2. Isolamento de Vesículas Extracelular (VE)

Foi realizado o isolamento de VE de *pools* de tripomastigota de *T. cruzi* Berenice pelo método de ultracentrifugação conforme descrito por MOREIRA, SERRANO e OSUNA (2019) com adaptações. Para tanto, foi transferido, para um tubo de 50mL, o sobrenadante de culturas de L6 contendo formas tripomastigotas em suspensão. Para retirar os amastigotas e restos celulares, fez-se uma centrifugação de 2000 rpm por 5 minutos. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 50mL que novamente foi centrifugado, desta vez a 5000 rpm por 15 minutos, para sedimentar os tripomastigotas no *pellet*. O *pellet* foi lavado 3 x com PBS 1x, previamente filtrado com filtro 0,22µm (Sartorius, Alemanha), a uma rotação de 5000 rpm por 3 minutos. Após a lavagem, os parasitas foram ressuspensos em meio DMEM, sem soro fetal bovino, por 3 horas, a 37°C, para permitir a secreção de vesículas.

Após 3h de incubação, os parasitas foram novamente contados, em hemocitômetro, com azul de tripan, e somente se deu prosseguimento ao experimento os *pools* em que obtivemos uma concentração  $10^8$  de parasitas viáveis. A secreção de vesículas foi interrompida com a centrifugação a 4° C, à 2500g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 17000g por 30 minutos, à 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e depois filtrado em filtro com porosidade de 0,22 $\mu$ m (Sartorius, Alemanha).

Posteriormente, as amostras foram ultracentrifugadas (Modelo Optima™ XE-100, Beckman Coulter Life Sciences, USA) a 100.000g, por 18h, a 4°C, para o isolamento de VEs. Finalmente, uma fração das amostras seguiu para visualização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e, da outra fração da amostra, extraiu-se o DNA, pelo método convencional de clorofane/clorofil descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001). Como controle, para garantir que o material genômico extraído das amostras era intravesicular, antes da extração de DNA, a amostra foi digerida com DNase

A análise da MET foi realizada através de microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 101), no Laboratório Microscopia e Microanálise (LMM) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

### **3.3. Digestão com DNase I**

Para verificar se no secretoma de *T. cruzi* o kDNA é dupla-fita e intravesicular, antes e depois da extração do DNA, as amostras provenientes do ensaio com *transwel* (Fig. 8) e de ultracentrifugação foram digeridas com a enzima DNase I. Nas amostras digeridas após a extração, uma concentração de 200 ng do DNA extraído de amostras de meio coletadas no ensaio com *transwel* foi adicionada a mix contendo 5  $\mu$ L de Tampão de Digestão de DNA, 5 $\mu$ L de DNase I Set (ZYMO RESEARCH), completando-se para o volume final de 50 $\mu$ L com água ultrapura. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos.

### **3.4. Digestão com S1 nuclease**

Para verificar se o kDNA liberado no secretoma é de fita simples, as amostras de DNA provenientes do secretoma e do isolamento de vesículas extracelulares pelo método de ultracentrifugação, após a extração de DNA, foram digeridas com enzima S1 nuclease

conforme protocolo do fabricante (Promega ®). Logo após a digestão, as amostras foram purificadas com mini-kit de extração de DNA da Invitrogen™.

#### **4. Extração e análise de ácidos nucleicos**

##### **4.1. Extração e quantificação de DNA**

Neste trabalho, a extração de DNA foi realizada pelo método convencional de clorofane/clorofil descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001), com adaptações. Após lavado, o *pellet* foi ressuscitado em 200 uL de PBS 1 x, homogeneizado em vórtex para desfazer os grumos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de extração (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, containing 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.04% proteinase-K, and 1% DTT), com 100 µg/mL de proteinase K. Essa amostra foi homogeneizada em vortex e incubada *overnight* a 37 °C em banho maria. Em seguida, 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%. Após seco, o DNA foi reidratado em solução Tampão de Eluição (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0), adicionado RNase na concentração final de 200µg/mL (10 µl para cada mL de TE) e incubado a 37°C *overnight*. O DNA total foi quantificado e estocado a -80 °C.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoVue (GE) com 3 µL da amostra. Considerou-se a extração como adequada quando a razão 260/280 variou de 1,8 a 2,0. A integridade do DNA extraído das culturas de células foi avaliada por PCR convencional específica para o gene  $\beta$ -actina (JAVADI *et al.*, 2014), com posterior visualização 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).

##### **4.2. PCR convencional (cPCR)**

As reações de amplificações do kDNA foram realizadas utilizando dois pares de iniciadores. Um amplifica regiões dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* (S36/67R) (HECHT *et al.*, 2010) e o outro amplifica regiões dos maxicírculos de kDNA do parasita (ND4/ND4R) (MESSENGER *et al.*, 2012). Os iniciadores S36 e 67R anelam especificamente nas regiões constantes dos minicírculos de kDNA e amplificam região conservada e variável dos mesmos, gerando uma banda de aproximadamente 250 pb. Os iniciadores ND4 e ND4R anelam especificamente nos maxicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 344 pb.



As reações de amplificação do DNA nuclear de *T. cruzi* foram realizadas utilizando o par de iniciadores PON 1 e 2, que amplifica regiões repetitivas do nDNA de *T. cruzi*, gerando *amplicons* de aproximadamente 250 pb (REQUENA *et al.*, 1992) (Tabela 1).

Primer	Sequência	Alvo	cPCR Tm
s36	5' GGTTCGATTGGGGTTGGTG 3'	kDNA Minicírculo	60
s67r	5' GA(A/C)(G/C)CCCCTCCCAAACC 3'	kDNA Minicírculo	60
ND4	5' ACCGGAAATGCATGTTGAAGTAA 3'	kDNA Maxicírculo	59
ND4r	5' TTTGTACGAACATGAATGATGAACT 3'	kDNA Maxicírculo	59
PON 1	5' TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT 3'	nDNA	57
PON 2	5' AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT 3'	nDNA	57

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados nas reações de PCR convencional.

Resumidamente, a condição de amplificação para cada iniciador consistiu em:

S36 e 67R		ND4 e ND4R		PON 1 e 2	
95° C -	5'	95° C -	5'	50° C -	5'
95° C -	30''	95° C -	30''	95° C -	30''
62° C -	60''	59° C -	60''	57° C -	60''
72° C -	60''	72° C -	45''	62° C -	60''
72° C -	5'	72° C -	5'	72° C -	5'
4° C -	∞	4° C -	∞	4° C -	∞

Os reagentes utilizados para as reações de cPCR foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen<sup>TM</sup>; 0,2 μM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup>); em um volume final de 25 μl, contendo 100 ng de DNA.

### 4.3. Quantificação absoluta por PCR quantitativa (qPCR)

A reação de amplificação quantitativa do kDNA se deu a partir da análise de dois pares de iniciadores para amplificação de duas regiões diferentes: minicírculos (minikDNA) e maxicírculos (maxikDNA). Bem como, a qPCR de DNA nuclear. Para cada par de *primer* utilizado, foi determinada uma curva padrão, que apresentou eficiência entre 90 e 110%, estando de acordo com as recomendações MIQE (TAYLOR *et al.*, 2019). Para todos os alvos, inicialmente, foi estabelecida a curva padrão por meio de diluições seriadas de DNA do parasita (de  $10^7$  a  $10^1$  parasitas/mL). A curva padrão do minikDNA apresentou eficiência de 92.572%,  $R^2 = 0.999$  e slope de  $-3.514$ , enquanto a de maxkDNA apresentou eficiência de 91.293%,  $R^2 = 0.997$  e slope de  $-3.355$ . Já a de nDNA apresentou eficiência de 94.078%,  $R^2 = 0.987$  e slope de  $-3.472$ . Essas curvas foram salvas e utilizadas para a quantificação de todas as reações de qPCR através do uso da equação da reta  $y = ax+b$ , onde “y” é o Ct 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 (Fig. 11).

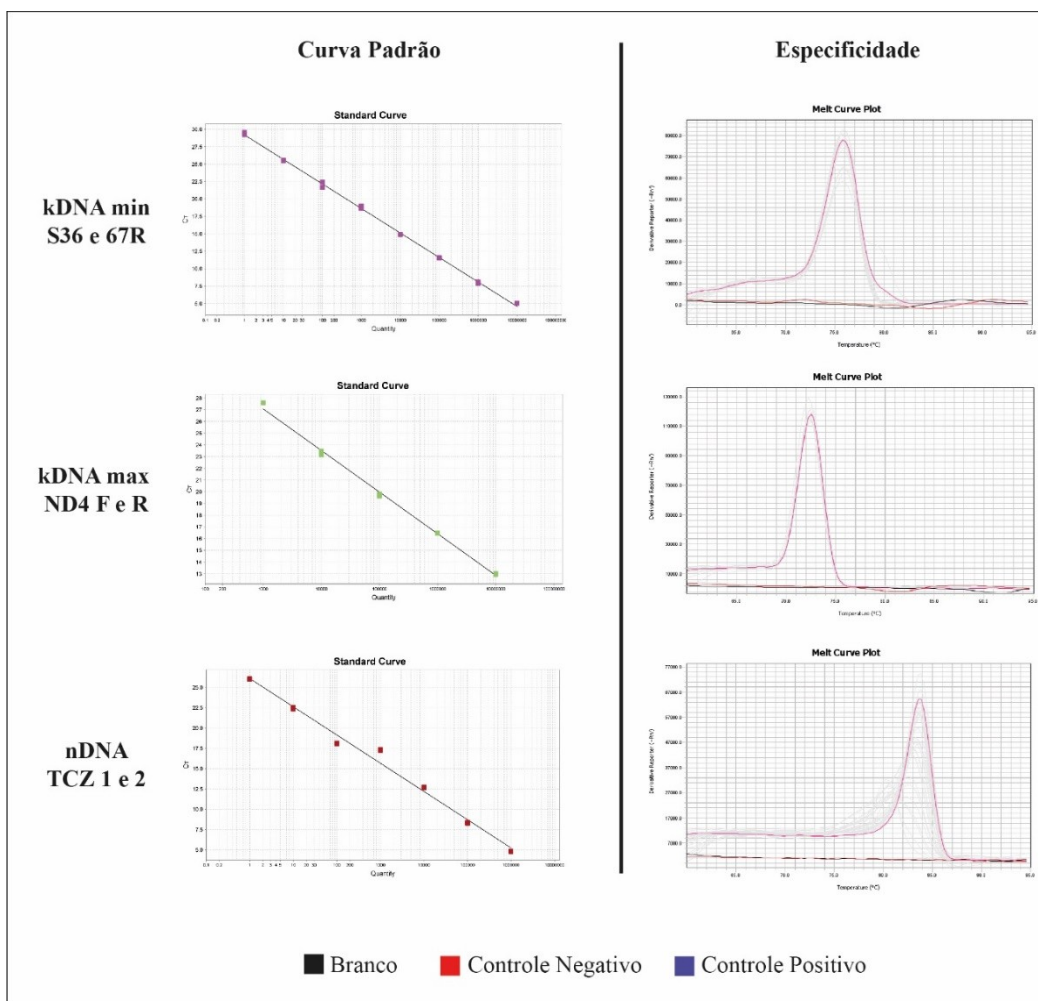
Para a quantificação dos minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores S36 e S67rev. Como molde para a qPCR foi usado 2  $\mu$ L de DNA (50ng/ $\mu$ L), 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 10  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 $\mu$ L. Para a quantificação dos maxicírculos, foram utilizados os iniciadores de ND4 e ND4R, e como molde para a qPCR foi usado 2  $\mu$ L de DNA (50ng/ $\mu$ L), 0,8  $\mu$ M de cada iniciador, 10  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20  $\mu$ L. Já para a quantificação do nDNA, foram utilizados os iniciadores de TCZ 3 e 4. Como molde para a qPCR, foi usado 2  $\mu$ L de DNA (50ng/ $\mu$ L), 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 10  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 $\mu$ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em duplicata, no QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific). As sequências dos primers utilizados estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Primer	Sequência	Alvo	qPCR T <sub>m</sub>
s36	5' GGTTCGATTGGGGTTGGTG 3'	kDNA Minicírculo	57
s67r	5' GA(A/C)(G/C)CCCCTCCCAAACC 3'	kDNA Minicírculo	57
ND4	5' ACCGGAAATGCATGTTGAAGTAA 3'	kDNA Maxicírculo	60
ND4r	5' TTTGTACGAACATGAATGATGAACT 3'	kDNA Maxicírculo	60
TCZ 3	5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3'	nDNA	62
TCZ 4	5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'	nDNA	62

A condição de amplificação para cada iniciador consistiu em:

<b>S36 e 67R</b>		<b>ND4 e ND4R</b>		<b>TCZ 3 e 4</b>	
50° C - 2'		50° C - 2'		50° C - 2'	
95° C - 10'		95° C - 10'		95° C - 10'	
95° C - 15''	} 40x	95° C - 15''	} 35x	95° C - 15''	} 40x
58° C - 60''		58° C - 45''		62° C - 45''	
72° C - 10''		72° C - 10''		72° C - 10''	
95° C - 05''		95° C - 05''		95° C - 05''	



**Figura 11.** Curva padrão e curva de *melting* dos *primers* de kDNA e nDNA. Os *primers* s36 e s67R amplificam seqüências de minicírculos de kDNA; ND4 R e F são *primers* de seqüências de maxicírculos de kDNA; TCZ 3 e 4 são seqüências de *primers* para amplificação de DNA nuclear.

#### 4.4. Eletroforese dos produtos amplificados por cPCR e qPCR

Os produtos de cPCR e de qPCR, com os diferentes iniciadores de nDNA e kDNA, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (nDNA) e 1,3% (kDNA), preparado com tampão TAE 1X (Tris acetato 90 mM pH 8,0 e EDTA 25 mM) e corado com o intercalante de DNA, brometo de etídio a 0,5 mg/mL. Além dos produtos de PCR, foi aplicado no gel o marcador de peso molecular (1 kb) Plus DNA Ladder da Thermo Fisher para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. A análise dos géis foi realizada em transluminador de luz ultravioleta. Os produtos de  $\beta$ -actina foram aplicados em gel de agarose 0,8%, nas mesmas condições dos anteriores.

#### 4.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA se deu utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega). O RNA extraído foi quantificado por meio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific) e submetido à RT-PCR para síntese de cDNA, utilizando-se o GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System (Promega). A reação de síntese do cDNA foi realizada em termociclador T100™ (Bio Rad). Após a síntese, o cDNA foi quantificado no equipamento Nanovue Plus® (GE Healthcare Life Science, UK) e diluído para 50 ng/uL para ser usado na qPCR. Cada grupo foi realizado em triplicata. Considerou-se a extração de RNA e cDNA como adequada quando a razão 260/280 variou de 1,8 a 2,0 e a razão 260/230 foi de aproximadamente a 2,0. A integridade dos transcritos de cDNA extraído das culturas de células foi avaliada por qPCR para o gene constitutivo TBP.

#### 4.6. Avaliação da expressão gênica

Para avaliar a expressão do gene LINE-1, foi realizada a qPCR utilizando o equipamento QuantStudio 5 (Thermo Scientific). A relação de genes e *primers* utilizados e suas condições estão apresentadas na Tabela 3. A análise de *Blastn* mostrou não haver reconhecimento cruzado entre as sequências dos *primers* selecionados para o hospedeiro e o parasita. Foi também determinada uma curva padrão para cada par de primer utilizado, com eficiente entre 90 e 110%, estando de acordo com as recomendações MIQE (TAYLOR *et al.*, 2019)

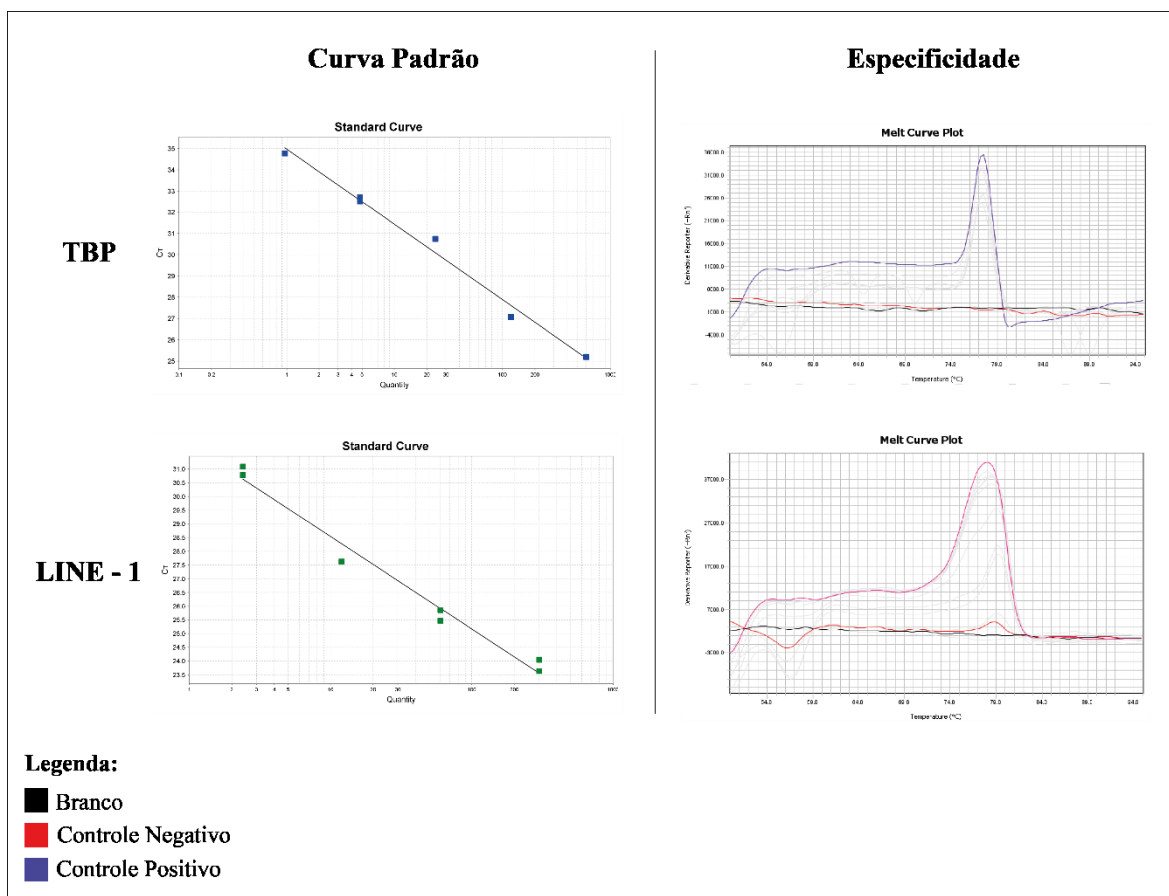
**Tabela 3.** Sequências de *primers* utilizados na reação de qPCR para avaliação da expressão gênica de LINE-1 e TBP, temperatura de anelamento (T. A.) e eficiência da curva utilizada no programa da reação.

Gene		Sequência do primer	T. A	Eficiência (%)
TBP	<i>Forward</i>	5' GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC 3'	50°C	91,724
	<i>Reverse</i>	5' TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG 3'		
LINE-1	<i>Forward</i>	5' ACACCTATTCCAAAATTGACCAC 3'	63°C	93,146
	<i>Reverse</i>	5' TTCCCTCTACACACTGCTTTGA 3'		

Para a qPCR com os iniciadores TBP e LINE-1, foi usada a seguinte padronização: 100 ng (2  $\mu$ L) do cDNA, adicionando 0,8 $\mu$ M de cada iniciador e 10  $\mu$ L de Power SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific/Fermentas, CA, USA), em um volume final de 20  $\mu$ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em duplicata, no QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific). A condição de amplificação para cada iniciador consistiu em:

<b>TBP</b>			<b>LINE-1</b>	
50° C -	2'		50° C -	2'
95° C -	10'		95° C -	10'
95° C -	15''	} 40x	95° C -	05''
50° C -	30''		63° C -	20''
72° C -	10''		72° C -	30''
95° C -	05''		95° C -	05''

A curva padrão do TBP apresentou eficiência de 91.724 %, R2 = 0.988 e slope de -3.538, enquanto a de LINE-1 apresentou eficiência de 93.146%, R2 = 0.98 e slope de -3.372 (Fig. 12). Essas curvas foram salvas e utilizadas para a quantificação de todas as reações de qPCR através do uso da equação da reta ( $y = ax+b$ , onde “y” é o Ct 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 12.** Curva padrão e curva de *melting* dos *primers* utilizados no estudo de expressão gênica de LINE-1. O TBP é o gene de referência. O LINE-1 é gene de retroelemento LINE-1 de humano;

## 4.7. Southern blot genômico

### 4.7.1. Digestão do DNA genômico com NsiI

Uma concentração de 25  $\mu\text{g}$  de DNA das amostras das diferentes linhagens de células foi acrescida a um mix contendo 10  $\mu\text{L}$  de Tampão 10x, 5  $\mu\text{L}$  de NsiI (R0127S, BioLabs  $\text{\textcircled{R}}$  Inc), completando-se para o volume final de 100  $\mu\text{L}$  com água ultrapura. Para a digestão do DNA de *T. cruzi*, foram utilizadas as concentrações de 100ng e 50ng de DNA do parasita. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 37° C *overnight*.

### 4.7.2. Eletroforese de DNA genômico digerido com enzima

O DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio. Para determinar o tamanho das bandas obtidas, foi aplicado 6  $\mu\text{L}$  de marcador 1kb ladder (Sigma-Aldrich) no gel. O procedimento de eletroforese foi realizado em câmara-fria (4°C), *overnight*, a ~50 volts.

#### **4.7.3. Transferência de DNA genômico do gel para membrana**

Após a etapa de separação eletroforética, o DNA digerido foi transferido do gel de agarose para uma membrana de nylon carregada positivamente (PALL Biodyne B) pelo método de transferência por capilaridade (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Nessa etapa, o gel foi incubado por 30 minutos em solução de depurinação (HCl 0,125M) sob leve agitação. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes com água milli-RO e incubado por 20 minutos em solução de desnaturação (NaOH 0,4M). A transferência do DNA para a membrana ocorreu por cerca de 24h.

#### **4.7.4. Protocolo de marcação de DNA com Biotina**

As membranas foram marcadas com sondas preparadas com o Pierce™ Biotin 3' End DNA Labeling Kit (kit de marcação de DNA de extremidade 3' de Biotina) da Thermo Scientific™, conforme recomendações do fabricante. As sondas correspondiam a um mix de três iniciadores dos minicírculos de kDNA: S36, S35r e S67.

#### **4.7.5. Hibridização da membrana**

As membranas contendo o DNA transferido foram inicialmente bloqueadas com solução de pré-hibridização (PEG 8000 10%, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão) por 30 minutos, a 65°C. Após esse período, adicionou-se as sondas na concentração de  $5 \times 10^5$  dpm/mL em solução de pré-hidização, as quais permaneceram em contato com a membrana *overnight*, a 48°C, sob leve agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas duas vezes por 15 minutos, a 65°C, com solução de SSC 2X/ 0,1% SDS.

#### **4.7.6. Detecção da sonda por quimioluminescência**

A sonda ligada à sequência de interesse foi produzida pelo kit de quimioluminescência para Detecção de Ácidos Nucleicos Imobilizados da *Thermo*, conforme orientações do fabricante. Após a adição dos reagentes bioluminescentes à membrana, esta foi revestida cuidadosamente com plástico filme PVC, fixada em cassete de revelação da KODAK e exposta a filme de Raio-X (KODAK T-MAT). O armazenamento do filme dentro do cassete se deu à temperatura ambiente, por um período de 5 e 30 minutos de exposição. Em seguida, o filme foi revelado em sala escura, utilizando-se os reagentes de revelação e fixação da Kodak.



## 5. Determinação da integração de kDNA

Para determinação da integração no genoma hospedeiro, inicialmente *pools* de parasitas na forma epimastigota, amastigota e tripomastigota de *T. cruzi* Berenice e *pools* de *T. cruzi* na forma amastigota de CL Brener, cepa Y e Berenice foram contados e separados na concentração de  $3 \times 10^7$  parasitas por amostra. Após a separação dos *pools*, seguiu-se à extração de DNA utilizando-se o protocolo de Extração manual segundo SAMBROOK e RUSSEL (2001) com adaptações. Finalmente, estabeleceu-se a quantidade absoluta de kDNA e nDNA de cada amostra

A quantificação absoluta (Quant. Abs.) foi obtida através de qPCR utilizando-se alvos de mini kDNA (S67R e S36) e nDNA (TCZ 1 e 2). Com essa quantificação absoluta, foi então estabelecida a razão mini kDNA/nDNA dos *pools*, e assim instituído um ponto de corte (pc), acima do qual considerou-se como integração de kDNA (WESLEY *et al.*, 2019). Dessa forma, entende-se como ponto de corte (pc) a média (X) da soma ( $\Sigma$ ) da razão minikDNA/nDNA dos *pools* de *T. cruzi*, levando-se em consideração o desvio padrão obtidos nas análises dos *pools*:

$$pc = X \Sigma \left( \frac{\text{Quant.Abs. kDNA}}{\text{Quant.Abs. nDNA}} \right)_{\text{pools de parasito}}$$

Deste modo, considerou-se como integração de minicírculos de kDNA, nas amostras, aquela cujo resultado da razão minikDNA/nDNA foi maior do que ponto de corte pré-estabelecido com os *pools* de parasito:

$$\text{Integração} = \left( \frac{\text{Quant. Abs. kDNA}}{\text{Quant. Abs. nDNA}} \right)_{\text{amostras}} > pc_{\text{pools de parasito}}$$

Entretanto, salienta-se que as amostras negativas na qPCR para os alvos de nDNA, para que fosse possível calcular a razão minikDNA/nDNA, considerou-se como quantificação mínima de nDNA dessas amostras negativas o valor 0,5 (SWEETING; SUTTON; LAMBERT, 2004).

### **5.1. Avaliação da Permissividade da integração em diferentes tipos celulares.**

Para a realização do ensaio de permissividade à integração de kDNA em diferentes tipos celulares, inicialmente foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células das linhagens HEK 293, Caco 2, L6, J774A.1, Jurkat em garrafas de culturas de  $50 \text{ cm}^2$  contendo DMEM 5 % SFB. As garrafas foram incubadas por 24 horas, a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  para adesão e formação da monocamada das células que são aderentes. Após 24h, as culturas foram infectadas com  $10^6$  de *T. cruzi* Berenice na forma tripomastigota, obedecendo uma razão de 1:4 (células: *T. cruzi*). Para cada linhagem celular, foi constituído um grupo de células infectadas e tratadas com benznidazol (Bz) e outro de células infectadas e não tratadas (ST). As culturas foram avaliadas durante 28 dias após a infecção (dpi), sendo as coletas para extração de DNA realizadas aos 3, 7, 14 e 28 dias. Após a extração de DNA, todas as amostras foram submetidas à qPCR com iniciadores para sequências de minicírculos (S67R e S36) e maxicírculos de kDNA (ND4 R e F) e nDNA (TCZ 3 e 4). A integração dos minikDNA foi avaliada de acordo com a razão minikDNA/ nDNA em todos os grupos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **5.2. Estudo da integração com inibidores das vias de reparo do DNA e de retroelementos**

Neste trabalho, também foi investigado se inibidores de vias de reparo de DNA e retrotransposição interferem na integração do kDNA no genoma hospedeiro. Para tanto, primeiramente foi realizado o teste de citotoxicidade de cada inibidor e do benznidazol. Posteriormente, realizou-se o ensaio de integração.

#### **5.2.1. Avaliação da citotoxicidade**

Para a determinação do  $\text{IC}_{50}$  (Índice de Citotoxicidade) dos inibidores nas células HEK 293 foi estabelecida como dose inicial a concentração inibitória previamente descrita na literatura. Além da concentração referenciada, foram testadas concentrações maiores e menores, conforme está demonstrado na Tabela 4.

Para avaliação da citotoxicidade, foi escolhido o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen <sup>TM</sup>, ThermoFisher Scientific, M-6494). Este teste determina a viabilidade celular em função do potencial redox. Seu princípio consiste na absorção do sal MTT pelas células viáveis, através do potencial redutor da enzima mitocondrial desidrogenase clivar os anéis de tetrazólio a um produto chamando

formazan, corantes cromogênicos artificiais. O produto acumulado dentro da célula é extraído através da adição de um solvente apropriado (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Assim, o número de células sobreviventes é proporcional à quantidade de formazan e é representado pela cor da solução. O formazan é então solubilizado e sua concentração determinada pela densidade ótica (OD) em espectrofotômetro ou leitor de microplacas (JAFARAIN; ASGHARI; GHASSAMI, 2014; RISS; MORAVEC; NILES, 2016). Neste caso, foi utilizado o leitor de microplacas Thermo Plate TP-Reader.

Para o teste, células HEK 293 previamente contadas em câmara de *Neubauer* foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $4 \times 10^4$  células/poço, com volume final de 200  $\mu$ L de meio DMEM fresco com 10% de SBF. As placas foram incubadas por 24h, para aderência celular, em estufa úmida, à 37°C, suplementada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de adesão, o meio de cultura antigo foi retirado e adicionado DMEM enriquecido com 5% de SBF contendo os inibidores nas concentrações estabelecidas (Tabela 4). Logo após o tratamento, as placas foram incubadas em estufa nas condições supracitadas por 48h. Os inibidores testados foram: Pentoxifilina (EMS), Nevirapina (Famanguinhos), Zidovudina (LAFEPE), Truvada® (Tenorfovir disoproxil furamate / emcitabine, GILEAD), Azatioprina (IMUNEN), Butirato de Sódio (Sigma), Trichostatina (Sigma), Nu 7441 (Sigma) e Ag 014699 (Sigma). De igual modo, também foi realizado o teste de citotoxicidade com o tripanocida benznidazol (LAFEPE).

Após o período de incubação com a droga, o meio com os inibidores foi retirado e adicionou-se 100  $\mu$ L de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (5mg/mL), previamente dissolvido em PBS 1x. A placa foi incubada à 37°C em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 4h. Após esse período, os cristais de formazan foram dissolvidos em solução de DMSO (Dimetilsulfóxido). A absorbância foi lida a 490 nm (WANG *et al.*, 2010), em leitora de microplaca Thermo Plate TP-Reader. Os resultados foram expressos como a porcentagem das células não coradas, de acordo com a equação (OD, densidade ótica) (MAO *et al.*, 2017):

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{grupo tratado}} - \text{OD}_{\text{grupo controle}})}{(\text{OD}_{\text{grupo controle}} - \text{OD}_{\text{branco}})} \times 100$$

Foi considerado como concentração de uso para o ensaio com os inibidores a maior concentração com potencial inibitório segundo descrito previamente na literatura que

obtiveram 80% ou mais das células viáveis. (Os resultados estão dispostos no Anexo 1, Fig. S2 e S3).

### **5.2.2. Ensaio com os inibidores**

Depois dos testes de citotoxicidade, as células HEK 293 foram submetidas aos ensaios com os inibidores durante 28 dias. Para tanto  $2,5 \times 10^5$  células foram semeadas em garrafas de cultura de 50 cm<sup>2</sup> e, após o período de adesão, ou seja, depois de 24h, iniciou-se o tratamento com os inibidores antes da infecção. Vinte e quatro horas depois do tratamento com o inibidor, foi realizada a infecção com parasitas *T. cruzi* Berenice na proporção 1:4. O tratamento com o inibidor (1, 5, 12, 19 e 26 dias) e antiparasitário (5, 12, 19 e 26 dias), bem como as coletas (3, 7, 14, 28 dias) foram realizados em datas pré-estabelecidas, de modo que todos os grupos dos inibidores foram também tratados com benznidazol para eliminá-la do parasita. Os grupos HEK tratado apenas com benznidazol e HEK sem tratamento foram utilizados como controles. O experimento foi realizado em triplicata.

**Tabela 4.** Plano de experimento para o teste de citotoxicidade do benznidazol e dos inibidores.

Droga		Sigla	Ação/Inibidor	Concentração testadas no MTT									
<b>Antiparasitário</b>	Benznidazol [ $\mu$ M]	VEGA <i>et al.</i> , 2012	Bz	Tripanocida	4096	2048	1024	512	<b>*256</b>	128	64	32	-
	Azatioprina [ $\mu$ M]	WEIGEL <i>et al.</i> , 1999	AZA	Síntese de purina	400	200	100	50	25	<b>*12,5</b>	6,25	3,125	1,56
	Butirato de Sódio [mM]	CHANG <i>et al.</i> , 2014	BS	HDAC	8,0	4,0	2,5	1,0	<b>*0,5</b>	0,25	0,125	-	-
	Trichostatina [nM]	CHANG <i>et al.</i> , 2014	TSA	HDAC	640	320	160	80	40	20	<b>*10</b>	5	-
	Pentoxifilina [mM]	WANG <i>et al.</i> , 2006	PF	Proteíno-Quinase (ATM/ATR)	96	48	24	12	6	<b>*3</b>	1,5	0,75	-
<b>Inibidor</b>	Nu 7441 [ $\mu$ M]	MCE	NU	mTOR, PI 3-K, ATM e ATR	9,6	4,8	2,4	1,2	<b>*0,6</b>	0,3	0,15	-	-
	Ag 014699 [nM]	THOMAS <i>et al.</i> , 2007	AG	PARP1	44,8	22,4	11,2	<b>*5,6</b>	2,8	1,4	0,7	-	-
	Nevirapina [ $\mu$ M]	MCE	NEV	Transcriptase reversa	19200	9600	4800	2400	1200	600	<b>*300</b>	150	75
	Zidovuldina [ $\mu$ M]	MCE	ZID	Transcriptase reversa	5760	2880	1440	720	360	180	<b>*90</b>	45	22,5
	Truvada ** [ $\mu$ M]	SARAVOLATZ; SAAG, 2006; Manual Gilead, 2019;	TRUV	Transcriptase reversa	E: 384.0 T: 205.85	E: 192.0 T: 102.9	E: 96.0 T: 51.5	E: 48.0 T: 25.73	E: 24.0 T: 12.9	E: <b>*E:</b> T: <b>T:</b> <b>6.4</b>	E: 6.0 T: 3.21	E: 3.0 T: 1.6	E: 1.5 T: 0.8

As concentrações destacadas em azul referem-se à concentração inibitória previamente descrita na literatura. As concentrações de uso neste trabalho estão marcadas com \*. Abreviaturas: HDAC, histonas desacetilases; mTOR, alvo mecanicista da rampamicina; PI3-K, Proteíno-quinase; ATM, Ataxia Telangiectasia mutada; ATR, Ataxia Telangeactasia Rad3. A concentração utilizada para o ensaio de citotoxicidade foi baseada no peso molecular do inibidor Encitabine (E) e Tenorfovir (T) encontrado na literatura. MCE (MERCK): Sigma-aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>)

### 5.3. Ensaio com células *knockdown*

Os ensaios com as células *knockdown* para os genes ATM, XP-A, XP-V e p53 foram realizados do mesmo modo que os ensaios de permissividade da integração (item 3.1) para os diferentes tipos celulares, seguindo o mesmo plano de experimento de infecção e tratamento com benznidazol. Brevemente, foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células *knockdown* para os genes ATM, XP-A, XP-V e p53 em frascos de cultura e, 24h depois, as células foram infectadas com *T. cruzi* Berenice na proporção 1:4. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

## 6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SAS (v 9.4, Instituto Inc, Cary, Carolina do Norte). Primeiramente, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos resíduos e assim ajustar a metodologia de análise. Em seguida, para os experimentos de permissividade da célula à integração, incluindo o grupo com os diferentes tipos celulares e o grupo de tratamento como os inibidores, foi realizado o teste de Mann-Whitney, levando-se em consideração a razão  $\text{minikDNA}/\text{nDNA}$  e tendo como fatores de avaliação o tipo celular, o tratamento (TTO) e o tempo. Posteriormente, então, foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças estatísticas. Finalmente, foi aplicado o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon para verificar se houve diferença estatística entre os grupos aos 28 dias, tendo como fonte de variação o tratamento. Ademais, a análise dos dados obtidos do experimento de expressão de LINE foi realizada do mesmo modo do experimento de permissividade, aplicando-se, no entanto, depois do teste de normalidade, somente o teste de Tukey, tendo como fator de variação a expressão do gene de retrolemento LINE-1, o TTO e o tempo.

Para a análise do grupo com as células *knockdown* e com o grupo dos inibidores após o teste de normalidade, aplicou-se o teste de análise não-paramétrica, Kruskal-Wallis para verificar se a relação  $\text{kDNA}/\text{nDNA}$  teve diferença estatística em pelo menos um dos grupos. Em seguida, aplicou-se o teste de Mann-Whitney para verificar onde estava a diferença. Finalmente, apenas nos grupos *knockdown* aos 28 dias aplicou-se o teste de Wilcoxon 2 a 2 para verificar as diferenças entre os grupos tendo como fonte de variação o tipo do *knockdown*.

Para construção dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism 9.2.0.

## V. RESULTADOS

### 1. Determinação da integração de minicírculos de kDNA a partir de protocolo de qPCR e linhagens de diferentes tipos celulares foram permissivas à integração do kDNA

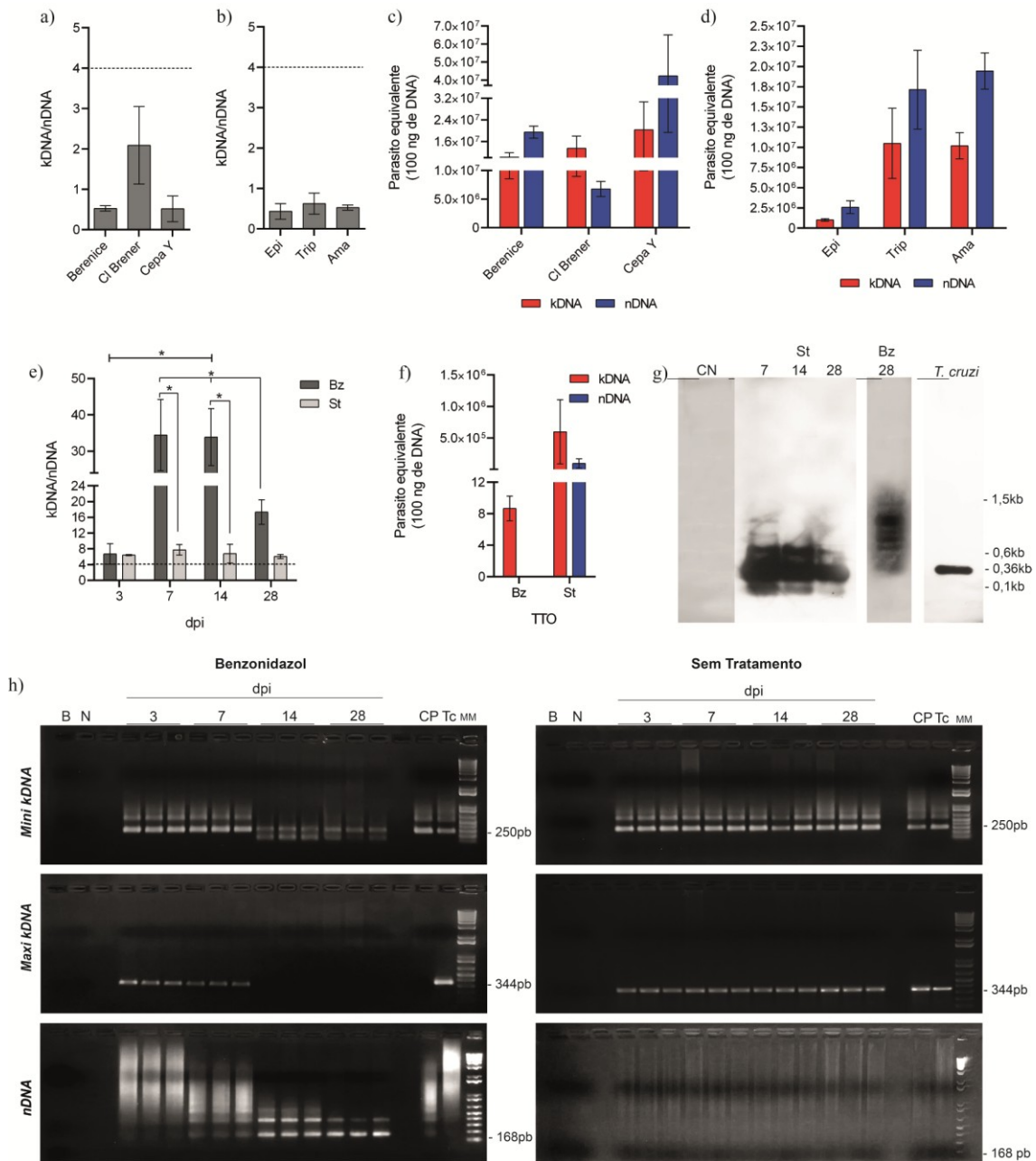
A integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* já foi documentada em macrófagos U937 e em linfócitos provenientes de humanos, roedores e aves (TEIXEIRA *et al.*, 2011a; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 1994). Visando verificar se outros tipos celulares também são permissivos à integração de kDNA, avaliamos a ocorrência desse evento em células HEK 293, J774A.1, Caco-2, Jukart e L6 infectadas com o parasita.

Para tanto, inicialmente, estabelecemos a quantificação absoluta e a razão mini kDNA/nDNA de três *pools* de amastigotas de cepas de *T. cruzi* (Fig. 13 A a D), e a partir da média da razão dos *pools*, determinamos o ponto de corte a partir do qual se observa a integração do kDNA. Para garantir maior confiabilidade quanto à ocorrência da integração do kDNA, consideramos o ponto de corte igual a 4,0, superior ao maior valor (com desvio padrão (DP)) observado. De interesse, ao compararmos a razão minikDNA/nDNA de *pools* das diferentes formas evolutivas (epimastigota, amastigota, tripomastigota) da cepa utilizada no estudo (Berenice), não observamos diferença significativa da razão tanto entre as cepas estudadas quanto entre as formas pelo teste Tukey ( $P > 0.05$ ).

Assim, em seguida, avaliamos a permissividade de cinco diferentes tipos celulares à integração. Nos macrófagos J774A.1, verificamos que, em culturas infectadas com o parasita e sem tratamento com a droga tripanocida, obtivemos a razão mini kDNA/nDNA próxima ao ponto de corte enquanto o uso do benznidazol (28dpi) evidenciou o aumento da razão minikDNA/nDNA acima do ponto de corte (média = 17,33; DP = 3,13), um forte indicativo de integração (Fig. 13E). Aos 28 dias, a qPCR revelou ausência de parasitas no grupo tratados com Bz (Fig. 13F). Vale ressaltar que no grupo das células sem tratamento, a alta parasitemia dificultou determinar a integração (Fig. 13C). Interessantemente, os resultados da eletroforese corroboraram com as análises da qPCR. Nas culturas não tratadas, notamos forte amplificação ao longo de todo o período experimental para os três marcadores utilizados. Destaca-se que as amostras apresentaram amplificação específica, com temperatura de melting ( $T_m$ ) semelhante a obtida tanto na curva padrão quanto no controle positivo (83°C).

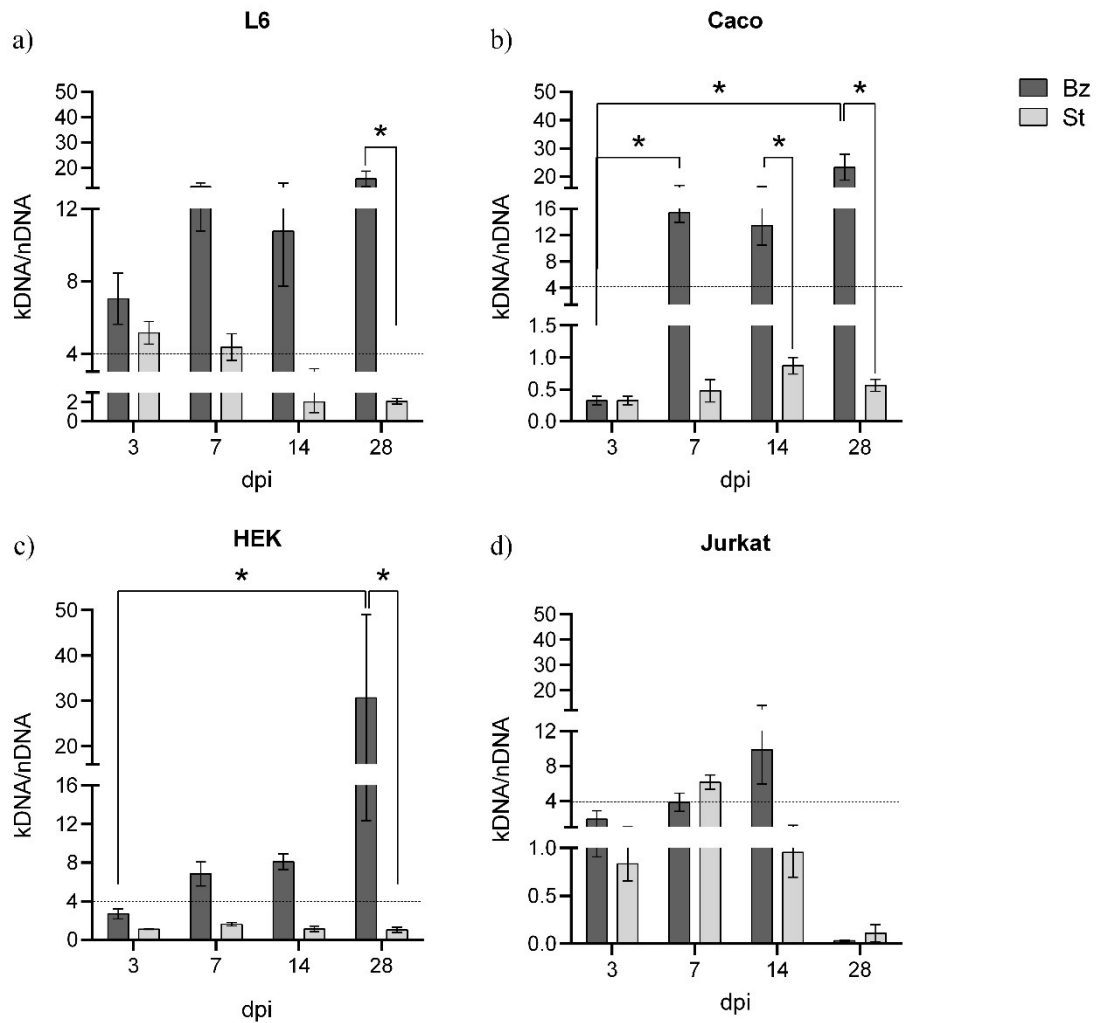


Entretanto ressalta-se que essas amostras, as quais obtiveram o Ct (*cycle threshold*) entre 15 e 22, apresentaram bandas estouradas (rastros) na análise do produto da qPCR de nDNA (Fig. 13H). Já para as culturas tratadas, observamos que, a partir do 14º dia pós-infecção, há o desaparecimento das bandas de maxikDNA e a mudança de padrão de bandas de minikDNA. Nota-se que o produto de qPCR de nDNA apresentou amplificação inespecífica a partir do 14º dia com a temperatura de melting menor (80°C) que a temperatura de melting obtida na curva padrão e no controle positivo (83°C) e que, portanto, essas amostras foram consideradas como negativas (Fig. 13H). Ademais, o *Southern blot* genômico demonstrou a presença de bandas acima de 0,36kb na amostra de 28 dias tratadas com benznidazol (Fig 13G). A análise estatística pelo teste de Tukey, levando-se em consideração os parâmetros tipo celular, tempo e tratamento mostrou haver diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 5).



**Figura 13.** Determinação da integração de minicírculos de kDNA. (a) Gráfico da razão minikDNA/nDNA de *pools* de amastigotas das cepas de *T. cruzi* Berenice, CI Brener e Y. (b) Gráfico da razão de minikDNA/nDNA de *T. cruzi* Berenice na forma epimastigota (Epi) tripomastigota (Trip) e amastigota (Ama). Ao lado, gráfico referente à quantificação absoluta de (c) *pools* de amastigota das cepas *T. cruzi* Berenice, CI Brener e Cepa Y; e de *pools* de (d) epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* Berenice. (e) Gráfico referente à razão minikDNA/nDNA de células J774A.1 infectadas com *T. cruzi* Berenice sem tratamento (St) e com tratamento (Bz) ao longo de 28 dias pós-infecção (dpi) (\* $p < 0,05$ , Teste de Tukey). (f) Quantificação absoluta de kDNA dos grupos de macrófagos infectados com *T. cruzi* Berenice tratados com Bz e sem tratamento aos 28 dpi. (g) Southern blot genômico de células J774A.1 infectadas com *T. cruzi* Berenice sem tratamento (St) aos 7, 14 e 28 dias pós-infecção e tratada com Bz aos 28 dpi. (h) Gel de eletroforese de produto de qPCR para alvos de minicírculo e maxicírculo (Maxi kDNA) de kDNA e DNA nuclear (nDNA) de macrófagos infectados com *T. cruzi* Berenice tratado com Bz (gel do grupo da esquerda) e sem tratamento (direita). B, branco; N, negativo; CP, controle positivo de células infectadas com *T. cruzi*, Tc, *T. cruzi*; MM, marcador molecular 1 kb ladder.

Padrão similar de integração foi observado para as demais linhagens celulares analisadas tanto na quantificação da razão minikDNA/nDNA quanto na análise do gel de eletroforese (Anexo 1, Fig. S5 e S6). Desse modo, as células tratadas tiveram aumento da razão minikDNA/ nDNA em relação ao grupo não tratado ao longo do período avaliado, principalmente a partir do sétimo dia após a infecção, tornando-se, no entanto, significativo somente no período de 28 dpi nas culturas tratadas com Bz (Fig. 14A - C) em relação ao grupo sem tratamento. Nas linhagens Caco 2 e HEK 293, do terceiro dia ao último dia, observou-se aumento significativo da razão minikDNA/nDNA. A evidência de integração foi observada em quase todos os grupos, obtendo-se a razão minikDNA/nDNA acima de 4, exceto nos linfócitos T (as células Jurkat) (Fig. 14D). Do mesmo modo que nos linfócitos, nos grupos sem tratamento a razão se manteve bem próxima do ponto de corte ou abaixo, sugerindo que a alta parasitemia é um fator que dificulta a observação da integração (Fig.14).

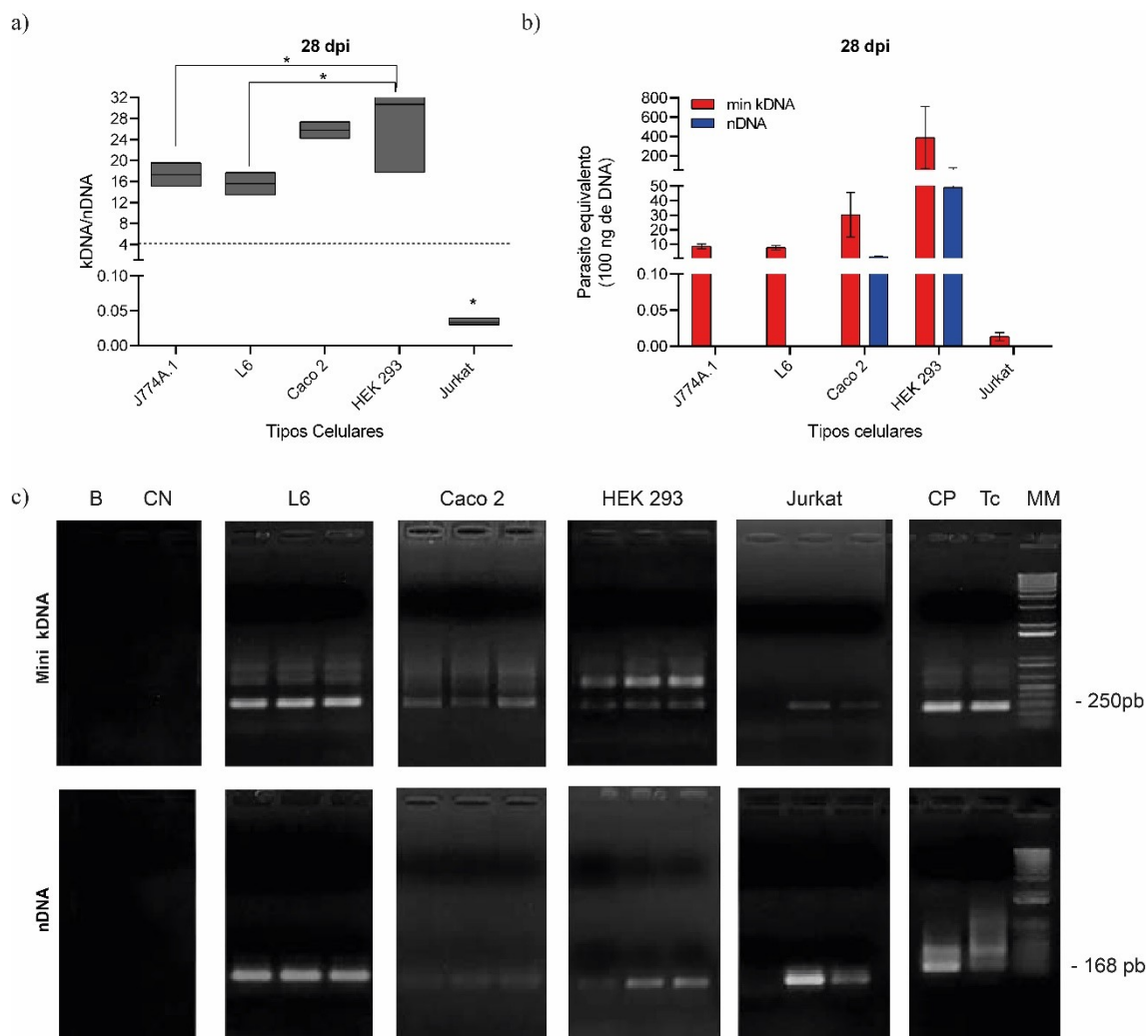


**Figura 14.** Integração de minicírculos de kDNA em diferentes tipos celulares ao longo do tempo. (a) Razão minikDNA/nDNA nas células L6. (b) Razão minikDNA/nDNA nas células Caco2. (c) Razão minikDNA/nDNA nas células HEK 293. (d) Razão minikDNA/nDNA nas células Jurkat. Bz, células tratadas com benzimidazol; St, células sem tratamento (\* $p < 0,05$ , Teste de Tukey).

Considerando o valor da razão, as células HEK 293 Bz mostraram-se mais permissivas à integração de minicírculos de kDNA (Média aos 28dpi = 30.71; desvio padrão (DP) = 18.35) em relação às outras células (Fig. 15). Essa diferença, no entanto, foi significativa apenas quando comparadas células HEK 293 com células J774, L6 e Jurkat ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 15A). Vale ressaltar que as células Jurkat não apresentaram integração em ambos os grupos (Fig. 14D), inclusive, ao avaliarmos a quantificação absoluta de minikDNA, observamos a quantificação abaixo de 0.1/Parasitas equivalentes aos 28 dias. Nas outras células, contudo, tais como na L6 (média=15.56; DP = 3.02), na Caco2 (média=23.33; DP = 4.55) e na HEK (30.71; DP = 18.35) obtivemos a quantificação absoluta de kDNA a partir de 10 parasitas equivalente (Fig.

15B). O Bz eliminou a infecção pelos parasitas nos grupos das células J774A.1, L6 e Jurkat aos 28 dias, uma vez que não foram amplificadas nessas sequências específicas de nDNA (15B).

Em concordância, a análise do gel de eletroforese revelou bandas referentes aos minikDNA em todas as células aos 28 dpi e amplificação inespecífica, seguindo o mesmo padrão de banda encontrada no grupo dos macrófagos J774A.1 (Fig. 15C).



**Figura 15.** Permissividade de diferentes linhagens celulares à integração de minicírculos de kDNA. (a) Razão minikDNA/nDNA nas células J774A.1, L6, Caco2, HEK 293 e Jurkat a 28 dpi (\* $p < 0,05$ , teste de Wilcoxon). (b) Gráfico referente à quantificação absoluta de mini kDNA e nDNA. (c) Gel de eletroforese de produto de qPCR de mini kDNA e nDNA de células infectadas com *T. cruzi* aos 28 dpi. B, branco; CN, controle negativo; CP, controle positivo; Tc, *T. cruzi*; MM, marcador molecular 1kb ladder.

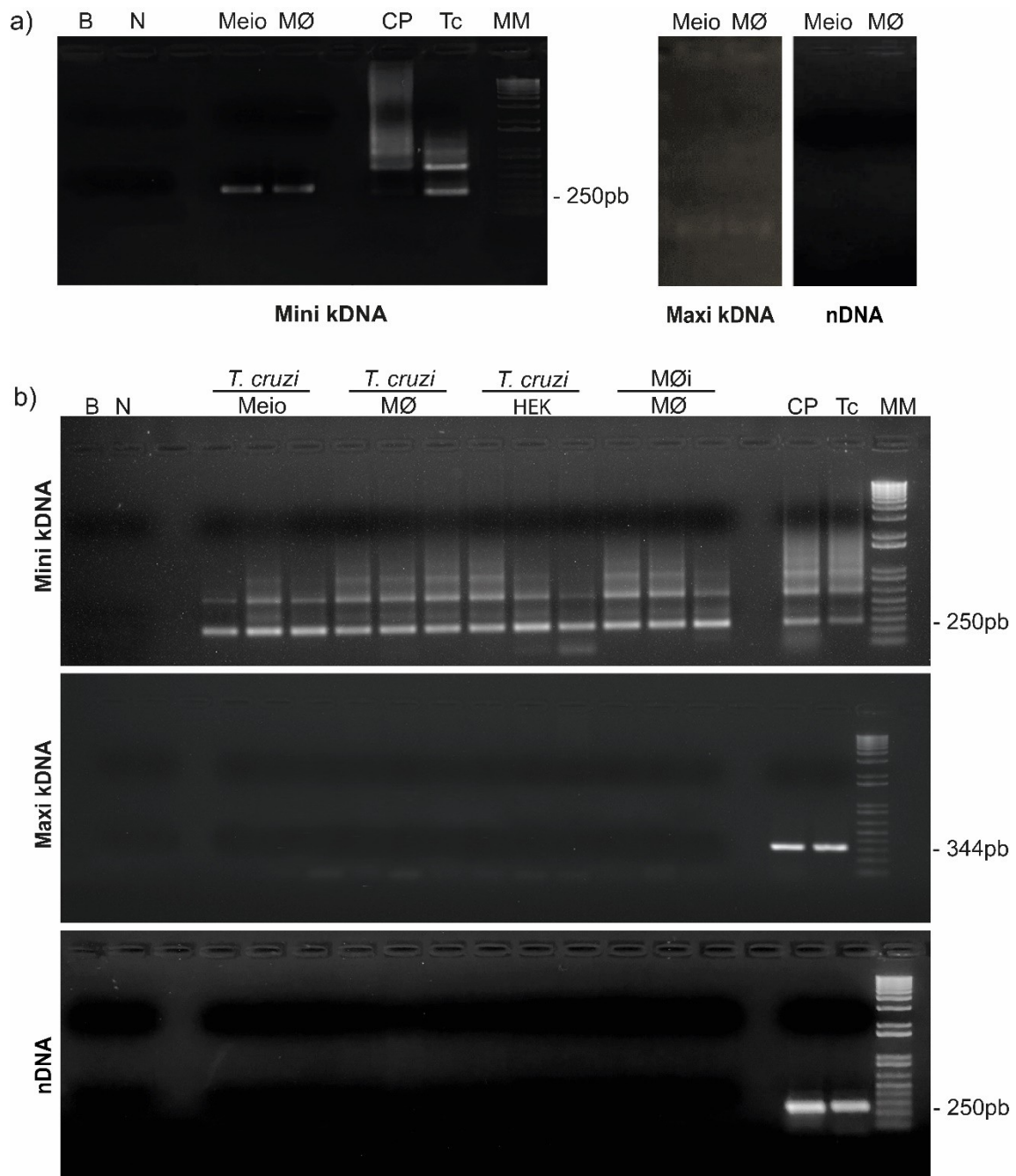
**Tabela 5.** Média da razão mini kDNA/nDNA, desvio padrão e valor de p dos tipos celulares J774A.1, HEK, Caco 2, L6 e Jurkat Bz e St.

Tipo Celular	TTO	Dia Experimental								p valor
		3		7		14		28		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
HEK	ST	1.10	0.04	1.61 <sup>D</sup>	0.19	1.12 <sup>C</sup>	0.29	1.03 <sup>D</sup>	0.29	ns
	BZ	2.69 <sup>b</sup>	0.53	6.83 <sup>CDb</sup>	1.25	8.09 <sup>BCab</sup>	0.81	30.71 <sup>Aa</sup>	6.10	<0.0001
Caco	ST	6.86 <sup>a</sup>	2.76	11.98 <sup>BCDa</sup>	2.76	0.87 <sup>Cb</sup>	0.13	0.56 <sup>Db</sup>	0.10	<0.0001
	BZ	6.86 <sup>b</sup>	2.76	17.17 <sup>Ba</sup>	3.19	13.46 <sup>Bab</sup>	3.00	23.33 <sup>Aa</sup>	4.55	<0.0001
L6	ST	5.92	1.40	5.52 <sup>CD</sup>	2.07	3.35 <sup>BC</sup>	2.40	2.11 <sup>D</sup>	0.29	ns
	BZ	7.03 <sup>b</sup>	1.40	12.39 <sup>BCab</sup>	1.61	10.74 <sup>BC</sup>	3.02	15.56 <sup>BCa</sup>	3.02	ns
J774	ST	6.38	0.14	7.73 <sup>CD</sup>	1.33	6.74 <sup>BC</sup>	2.39	6.04 <sup>CD</sup>	0.51	ns
	BZ	6.67 <sup>b</sup>	2.60	34.43 <sup>Aa</sup>	9.78	33.87 <sup>Aa</sup>	7.86	17.33 <sup>Bab</sup>	3.13	<0.0001
Jurkat	ST	0.83	0.18	6.15 <sup>CDa</sup>	0.82	0.96 <sup>Cb</sup>	0.26	0.11 <sup>Da</sup>	0.09	ns
	BZ	1.57 <sup>c</sup>	0.43	3.84 <sup>CDb</sup>	1.05	7.02 <sup>BCa</sup>	0.10	0.03 <sup>Dc</sup>	0.01	ns
p valor		ns		<0.0001		<0.0001		<0.0001		

Letras maiúsculas (A,B,C,D,E) diferentes na mesma coluna e letras minúsculas (a,b,c) diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05).

## **2. Os minicírculos de kDNA são liberados no secretoma de *T. cruzi***

Visando compreender as rotas celulares envolvidas na transferência das sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para a célula hospedeira, investigamos se esses trechos de DNA mitocondrial podem ser carregados por vesículas secretadas pelo parasita. Para tanto, cultivamos formas tripomastigotas de *T. cruzi* Berenice no compartimento superior de placas *transwell* e analisamos uma amostra contendo apenas o meio DMEM no compartimento inferior e outra contendo cultura de macrófagos não infectados, também no compartimento inferior. Em ambos os casos, foram detectadas sequências de minicírculos de kDNA, os quais foram transferidos via secretoma liberado pelo parasita. De importância, não foram amplificadas sequências de nDNA ou de maxikDNA nessas amostras (Fig. 16A). Igualmente, o kDNA foi liberado tanto no grupo contendo apenas *T. cruzi* quanto naqueles contendo os macrófagos. Igualmente, continuamos a observar a presença dos minikDNA, na ausência de maxikDNA ou nDNA, ao utilizarmos outra linhagem celular (HEK 293) no compartimento inferior (Fig. 16B).

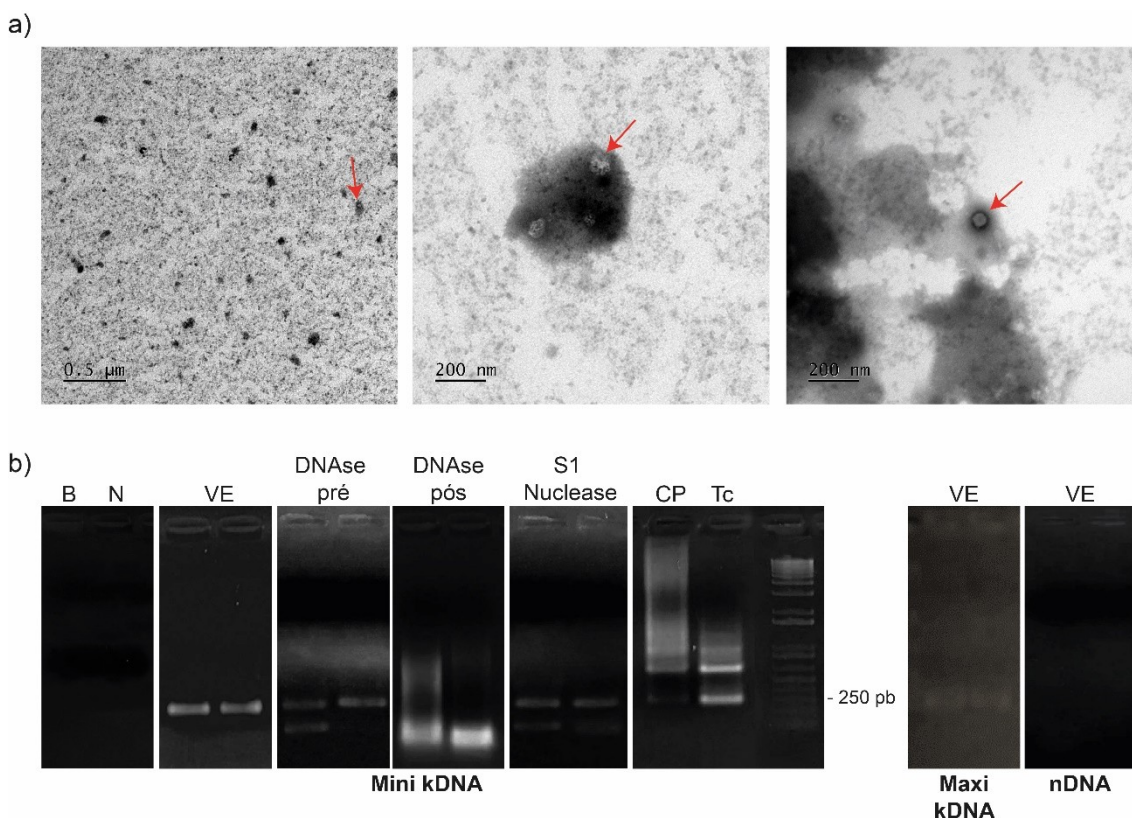


**Figura 16.** *T. cruzi* libera kDNA no secretoma. a) Produto de cPCR de secretoma de tripomastigota de *T. cruzi* incubados em placas *transwell*. b) Produto de cPCR de experimentos em *transwell* com *T. cruzi* incubados com células HEK 293, células macrófagos J774A.1 e macrófagos infectados. B, branco; N, controle negativo de células não infectadas; Meio, amostra contendo apenas meio; MØ, macrófagos não infectados; MØi, macrófagos infectados; CP, controle positivo de células infectadas; Tc, DNA de pool de *T. cruzi*; MM, marcador molecular 1kb ladder.

Para garantir que as sequências de minikDNA amplificadas estavam no interior das vesículas secretadas e não livres no meio, extraímos vesículas extracelulares a partir de protocolo de ultracentrifugação de *pools* de tripomastigota de *T. cruzi* (VETc). Através de MET foi possível observar vesículas extracelulares obtidas de *pools* de cultura de *T. cruzi* (Fig. 17A).



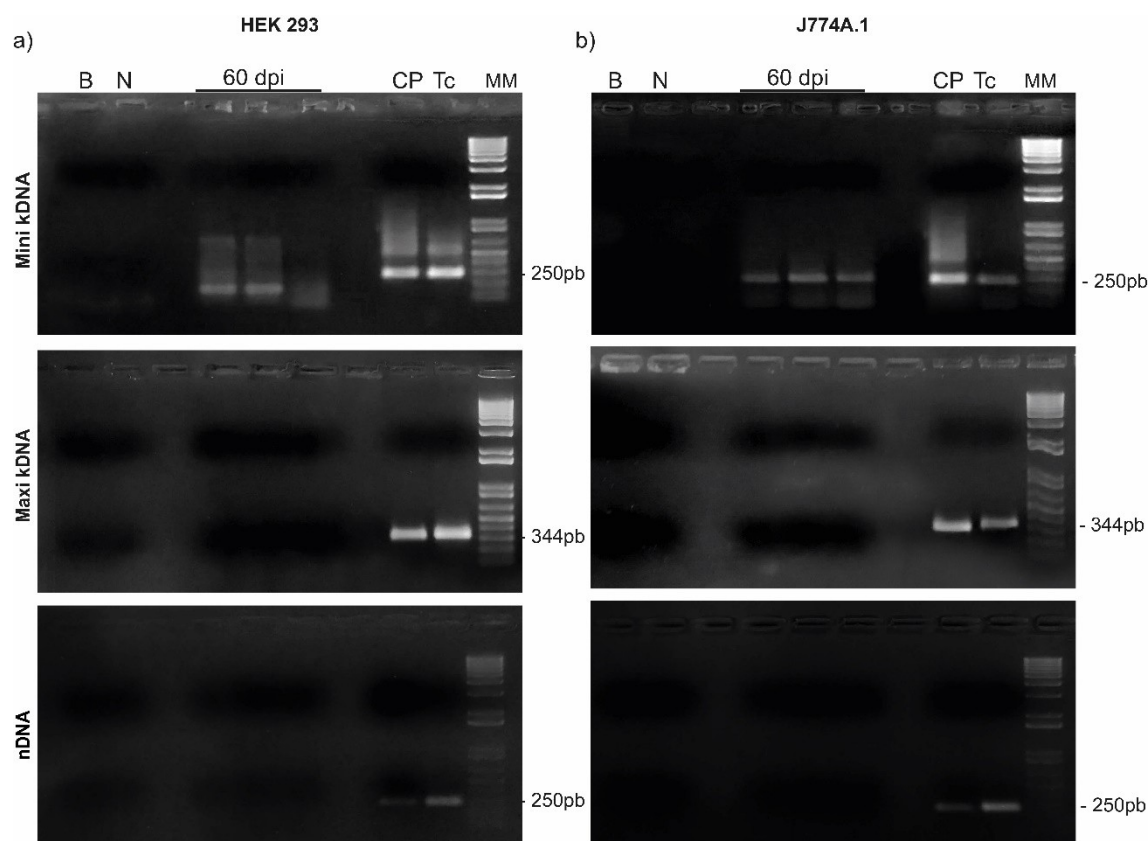
Previamente à extração do DNA, tratamos as vesículas com DNase I para assegurar que os minikDNA estariam em seu interior. Ademais, também investigamos a conformação do material genético em seu interior (se simples-fita ou dupla-fita) tratando o material extraído das vesículas com DNase I ou S1 nuclease após a extração de DNA. A eletroforese em gel do produto de cPCR revelou amplificação de regiões de minikDNA tanto nas amostras sem tratamento com enzimas de digestão de molécula de DNA de dupla-fita previamente à extração quanto após a digestão, demonstrando que as sequências de minikDNA estão dentro das vesículas. Ademais, a digestão do material genético após a extração de DNA com a DNase I inibiu a formação dos *amplicons* esperados, enquanto a digestão com S1 nuclease não comprometeu a amplificação do DNA (Fig. 17B).



**Figura 17.** Presença de minicírculos de kDNA no interior de vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma cruzi*. a) Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares de *T. cruzi* (VETc). b) Produto de cPCR de vesículas extracelulares de *pools* de tripomastigota de *T. cruzi* obtidas a partir de protocolo de ultracentrifugação. VE, extração de DNA de amostras de VETc; DNase-pré, amostras VETc tratadas com DNase I antes da extração de DNA; DNase-pós, amostras de VETc tratadas com DNase I após a extração de DNA; S1 Nuclease, amostras de VETc tratadas com S1 Nuclease após a extração de DNA.

Finalmente, com o intuito de determinar se o kDNA transferido pelas microvesículas foi efetivamente incorporado pelo genoma da célula hospedeira, as

células do compartimento inferior (HEK-293 e J744A.1) expostas ao secretoma do parasita em placas *transwell* foram expandidas e mantidas em cultura por 60 dias. Como observado, na Figura 18, apenas as sequências de minikDNA continuaram sendo amplificadas, com ausência de *amplicons* de maxikDNA e nDNA.



**Figura 18.** Minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* transferidos via secretoma são possivelmente incorporados pela célula hospedeira. a) A análise do produto de cPCR de amostras de células HEK 293 cultivadas em *transwell* após 60 dias. b) Produto de cPCR de amostras de células J774A.1 cultivadas em *transwell* após 60 dias. B, branco; N, negativo; dpi, dias pós-infecção; CP, controle positivo; Tc, DNA de *T. cruzi*; MM marcador molecular de 1kb ladder.

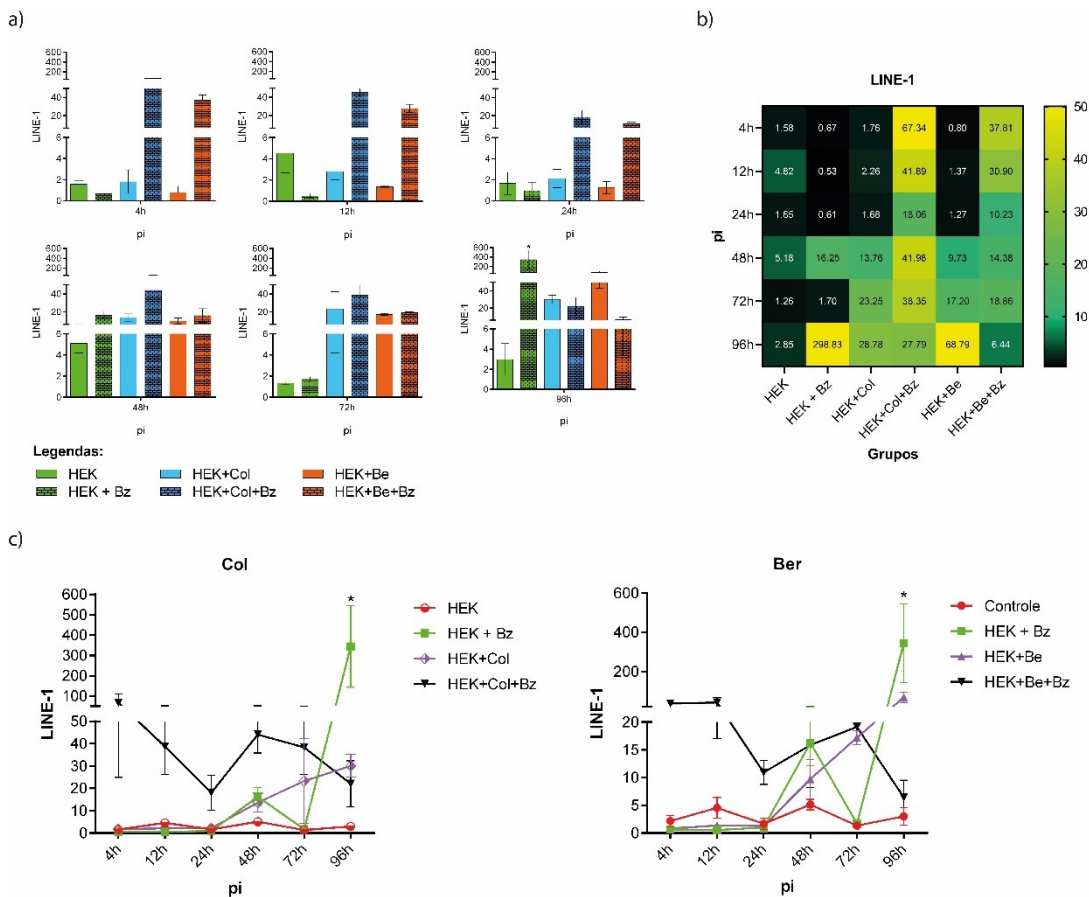
### 3. A infecção por *T. cruzi* modula a atividade de retroelementos

#### LINE-1

A integração de minicírculos de kDNA em retroelementos LINE-1 do genoma hospedeiro foi descrita e consolidada previamente na literatura (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; HECHT, *et al.* 2010; WESLEY *et al.*, 2019). Desta forma, avaliamos se a infecção por *T. cruzi* influencia a expressão desses retrotransposons, o que poderia favorecer a integração dos minikDNA.

A infecção de células HEK-293 por *T. cruzi* das cepas Berenice (Bz média 4h = 37,04; DP = 5,58) ou Colombiana (Bz média 4h = 67,33; DP = 42,49) aumentou os

níveis de mRNA de LINE-1 logo após a interação inicial e às 12h (Berenice Bz média = 42,29; DP = 25.25; Colombiana Bz média = 37,43; DP = 12.38) pós-infecção em relação aos outros grupos (Fig. 19 A e B). O tratamento com benznidazol mostrou influenciar na expressão de LINE-1 de células não infectadas 48h (média = 16,23; DP = 4.15) e 96h (média = 343,41; DP = 200.59). Pela análise de variância, o grupo não infectado e tratado teve um aumento significativo na expressão dos retroelementos em comparação aos outros grupos à 96h (média = 343.41; DP = 200.59;  $p < 0.0001$ ). Vale ressaltar que, apesar de não haver diferença significativa, foi observado, aumento na expressão de LINE-1, nos grupos infectados com *T. cruzi* Colombiana e Berenice tratados com Bz em comparação ao grupo não infectados e sem tratamento em todos os períodos analisados (Fig. 19C) (Tabela 6).



**Figura 19.** Expressão de retroelementos LINE-1 em células infectadas por *Trypanosoma cruzi*. (a) Expressão de LINE-1 em células HEK 293 infectadas com *T. cruzi* Colombiana e Berenice em horas pós-infecção (pi) com e sem tratamentos com Bz. (b) Heat Map de expressão de LINE-1 em células HEK 293 infectadas com *T. cruzi* Colombiana e Berenice. (c) Curva de expressão de LINE 1 em tempos pós-infecção. Legendas dos grupos: HEK: células não infectadas; HEK+Bz, células não infectadas, mas tratadas com benznidazol; HEK+Col: células HEK 293 infectadas com *T. cruzi* Colombiana e não tratadas; HEK+Col+Bz: células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com benznidazol. HEK+Ber: células infectadas com a cepa Berenice e não tratadas; HEK+Ber+Bz: células infectadas com Berenice e tratadas com benznidazol; pi: tempos pós-infecção. LINE-1 (eixo y): média da expressão de LINE-1 (\*= $p < 0, 05$ , teste de tukey).

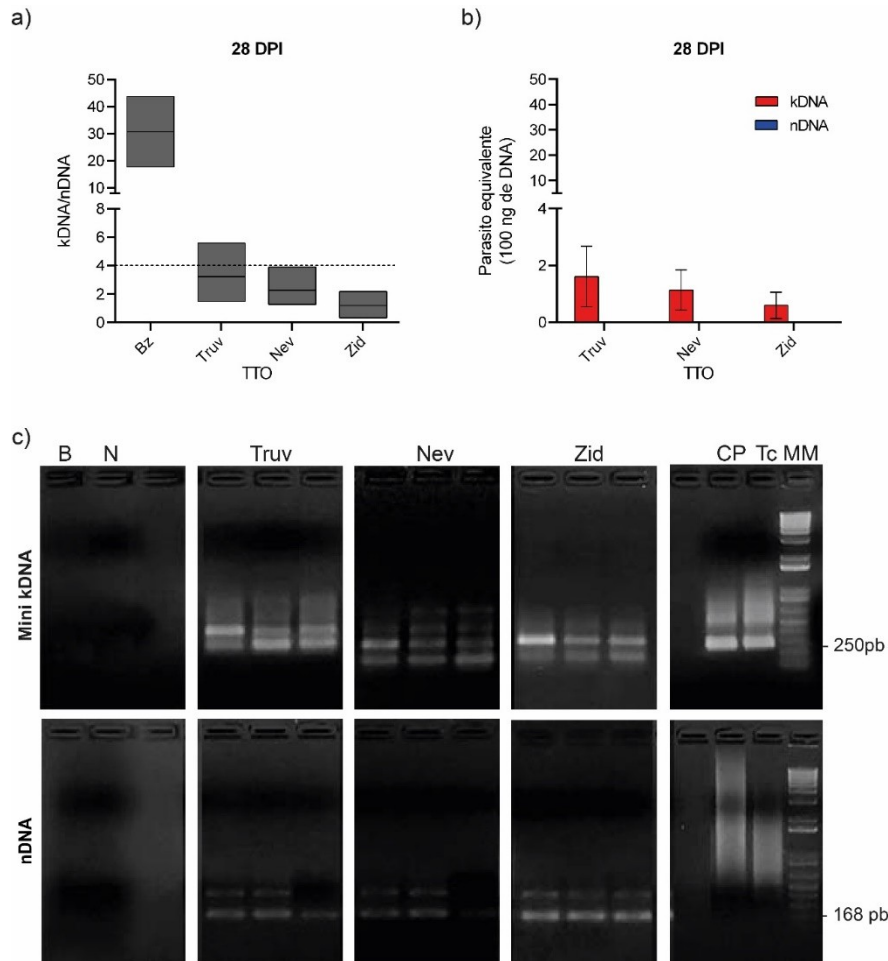
**Tabela 6.** Média da razão mini kDNA/nDNA, desvio padrão e valor de p de expressão de LINE -1 em células HEK infectadas com *T. cruzi* Colombiana e Berenice.

Infecção	TTO	Dia Experimental												Valor de p
		4h		12h		24h		48h		72h		96h		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
HEK	St	2.15	1.02	4.5	1.86	1.65	1.06	5.11	0.92	1.33	1.15	2.99	1.57	ns
	Bz	0.67	0.05	0.52	0.22	0.98	0.75	16.23	4.15	1.70	0.21	343.41*	200.59	<0.0001
	ST	1.80	1.12	2.09	1.33	2.12	0.868	3.62	4.24	23.24	19.04	30.07	5.08	ns
HEK + Colombiana	Bz	67.33	42.49	38.73	12.38	18.06	7.87	44.09	8.24	38.34	12.21	22.04	12.21	ns
HEK + Berenice	ST	0.80	0.56	1.37	0.05	1.26	0.58	9.73	3.57	17.19	1.25	68.79	25.89	ns
	Bz	37.04	5.58	42.29	25.25	10.93	2.13	15.87	7.63	11.11	0.57	6.43	3.12	ns
Valor de p		ns		ns		ns		ns		ns		<0.0001		

\*Difere dos outros grupos em relação ao tempo, tratamento (TTO) e infecção teste de Tukey (P<0.05).

#### **4. Inibidores de restrotransposição inibiram a integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi***

Sabendo que o sítio preferencial de integração dos minikDNA é o retroelemento LINE-1 (SIMÕES-BARBOSA, *et al.*, 2006; HECHT, *et al.*, 2010) e que a atividade desse retrotransposon é modulada por *T. cruzi*, foi investigado se a inibição de componentes dessa via poderia impedir a integração. Assim verificou-se que o uso dos inibidores Truvada, Nevirapina e Zidovudina impediu que os minicírculos de kDNA invadissem o genoma da célula hospedeira, de modo que se obteve aos 28 dpi a média da razão minikDNA/nDNA abaixo de 4 (Fig. 20A, Tabela 7). A quantificação absoluta de minikDNA foi inferior a 3 parasitas equivalentes/100 ng de DNA (Fig. 20B). A análise do produto da qPCR revelou bandas de mini kDNA. Nota-se que o produto de qPCR de nDNA apresentou amplificação inespecífica com a temperatura de melting menor (80°C) que a temperatura de melting obtida na curva padrão e no controle positivo (83°C) e que, portanto, essas amostras foram consideradas como negativas. (Fig 20C). (A Tabela S1, Anexo I, contém os dados de todos os tempos avaliados).



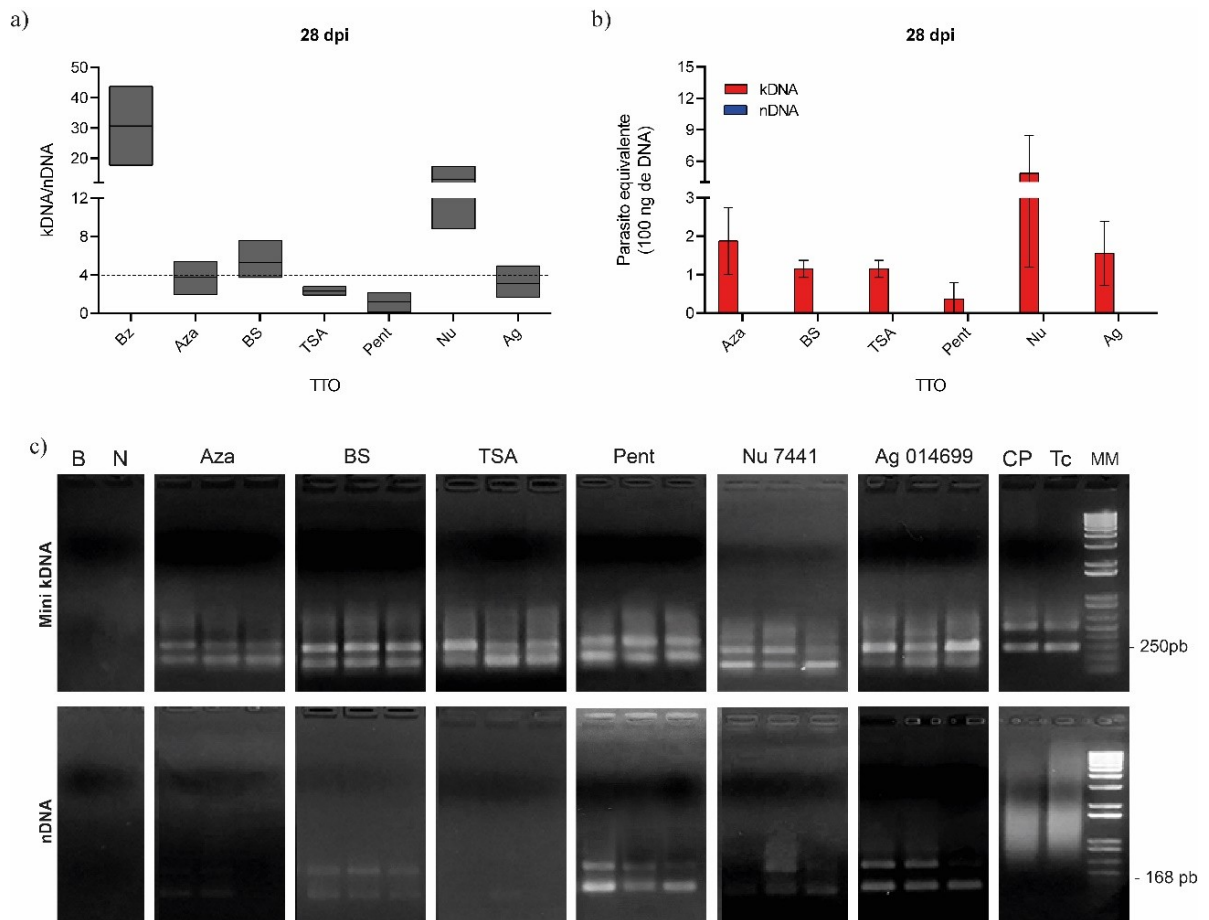
**Figura 20.** Inibição da integração do kDNA por inibidores de retrotransposição. (a) Razão minikDNA/nDNA em culturas de células HEK-293 infectadas com o *Trypanosoma cruzi* e tratadas com Bz e drogas inibidoras de retrotransposição após 28 dias de infecção. (b) Quantidade absoluta de minikDNA e nDNA em células tratadas com benznidazol e tratadas com iTR após 28 dias de infecção. (c) Análise de produto de PCR de kDNA e nDNA dos grupos tratados com iTR. iTR, inibidores de Transcriptase Reversa; TTO: Tratamento; Bz: benznidazol Truv: Truvada; Nev: Nevirapina; Zid: Zidovuldina. MM, marcador molecular de 1kb ladder.

## 5. Inibidores de vias de reparo de DNA, controle epigenético e síntese de inibiram a integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*

Além da participação de retroelementos, a literatura também sugere que a entrada de sequências de minikDNA no genoma hospedeiro possa ocorrer por intermédio de vias de reparo de DNA (HECHT *et al.*, 2010). Inibidores para as vias reparo por Excisão de Base, Recombinação Homóloga, Recombinação não-homóloga (Ag 014699, Nu 7441 e Pentoxifilina, respectivamente) foram avaliados nas culturas infectadas com o parasita e submetidas à droga tripanocida. Igualmente, utilizou-se inibidores envolvidos no controle epigenético (inibidores de HDAC) e inibidor de síntese de purina (Butirato de Sódio, Trichostatina e Azatiopina, respectivamente) nessa investigação.



Todos os inibidores utilizados neste trabalho, com exceção da Nu 7441 (média= 9,65) e do BS (média: 5,30), impediram a inserção do kDNA no genoma da célula (Média da razão: Aza: 3,75; TSA: 2,3; Pent: 1,2; Ag: 3,10) (Fig. 21A, Tabela 7). Vale apontar que foram detectadas quantidades mínimas de nDNA do parasita, com valores abaixo do menor ponto de nossa curva padrão, mas que puderam ser visualizadas no gel de agarose (Fig 21B e C). (O painel completo de todos os tempos avaliados se encontra no Anexo 1, Fig. S7 e S8 e Tabela S1)



**Figura 21.** Inibidores de vias de reparo de DNA, síntese de purina e HDAC inibiram a Integração de mini kDNA. (a) Razão minikDNA/nDNA nas células HEK 293 tratadas com inibidores de vias de reparo de DNA, síntese de purina e de HDAC. (b) Quantificação absoluta de kDNA e nDNA ( $p > 0,5$ ). (c) Gel de eletroforese de produto de qPCR de minikDNA e nDNA de células infectadas com *T. cruzi* aos 28 dias após a infecção e tratadas com inibidores. Bz, benzonidazol; Aza, azatioprina; BS, butirato de sódio; TSA, trichostatina; Pent, pentoxifilina; Nu, Nu 7441; Ag, Ag 014699; Truv, Truvada; Nev, nevirapina; Zid, zidovudina; B, branco; CN, controle negativo, CP, controle positivo, Tc, *T. cruzi*; MM, marcador molecular de 1kb ladder.

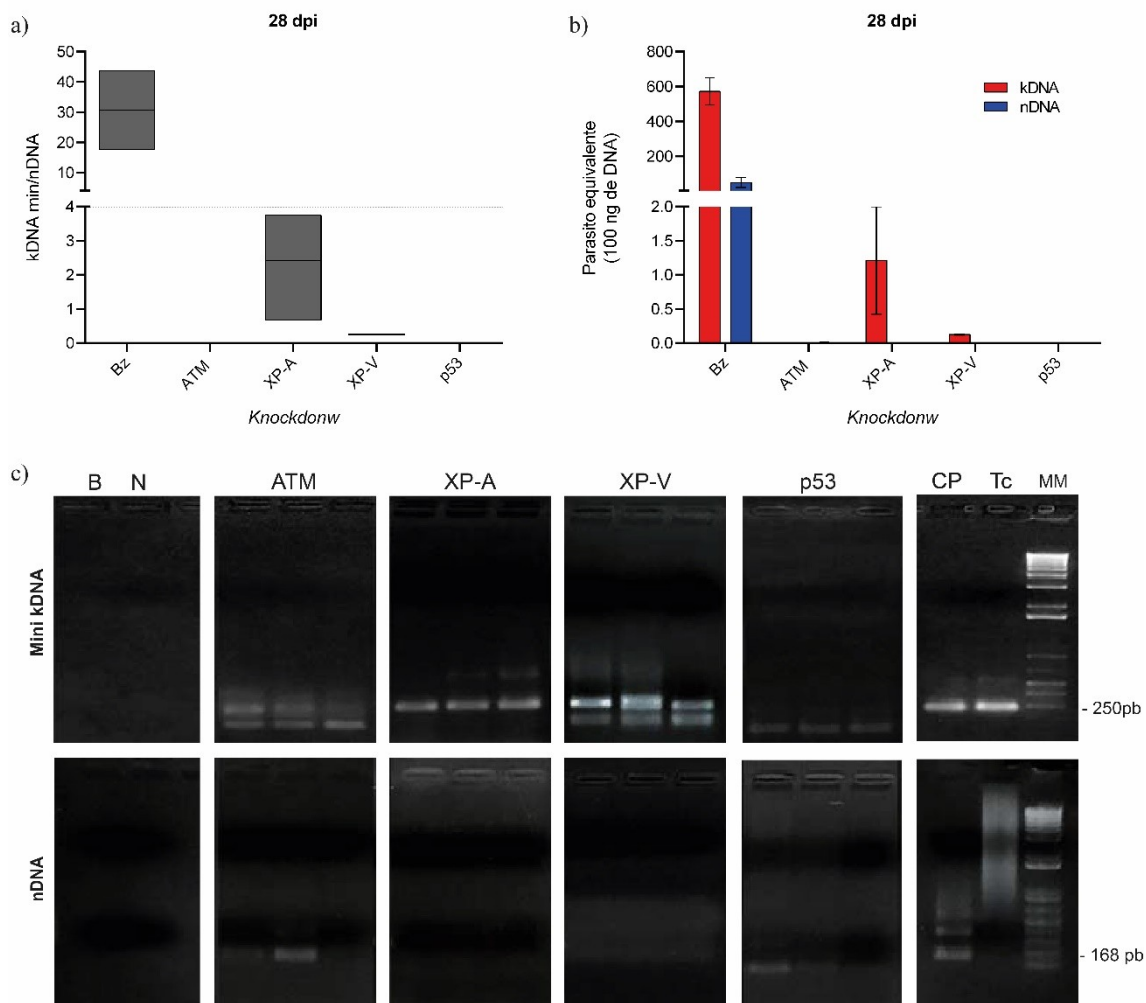
**Tabela 7.** Média da razão mini kDNA/nDNA, desvio padrão e valor de p de células tratadas com inibidores aos 28 dias.

Tipo Celular	TTO	Dia Experimental		p valor
		28		
		Média	DP	
HEK	St	1.03 <sup>a</sup>	0.29	< 0.0001
	Bz	30.71 <sup>a</sup>	18.35	
	Aza	3.75	1.72	
	BS	5.30	2.02	
	TSA	2.30	0.44	
	Pent	1.20	1.03	
	Nu	13.06	6.03	
	Ag	3.10	1.67	
	Truv	3.22	2.13	
	Nev	2.28	1.42	
	Zid	1.20	0.93	
p valor		ns		

<sup>a</sup>Diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Aza, Azatioprina; BS, Butirato de Sódio; TSA, Trichostatina; Pent, Pentoxifilina; Nu, Nu 7441; Ag, Ag 014699; Truv, Truvada; Nev, Nevirapina; Zid, Zidovudina; TTO, tratamento; Bz, grupo tratado com benznidazol, St, grupo sem tratamento; DP, desvio padrão.

A integração de minikDNA também foi avaliada em células *knockdown* para os genes ATM, XPA, XPV e p53 (Fig. 22, Tabela 8). A expressão reduzida de XPA (Média=2.42; DP=1.57) e XPV (Média = 0.25; DP= 0.02) influenciou na integração dos minikDNA no genoma, impedido que esse fenômeno ocorresse (Fig. 22A). Igualmente, o *knockdown* dos genes ATM e p53 resultou em ausência de integração de minikDNA aos 28 dias pós-infecção. Destaca-se, entretanto, que quantidades mínimas de minikDNA do parasita foram detectadas nos grupos de células *knockdown* para os genes ATM e p53 (Fig. 22B). Contudo, mesmo com a baixa quantificação, a análise de eletroforese do produto de qPCR evidenciou no gel de agarose *amplicons* de tamanho específico de sequências de minikDNA (~250pb) (Fig. 22C).





**Figura 22.** A integração do minikDNA não ocorreu em células *knockdown* para genes envolvidos nas vias de reparo do DNA e gene p53. (a) Razão minikDNA/nDNA em células *knockdown* para os genes ATM, XPA, XPV e p53 aos 28 dpi ( $p < 0,5$ ). (b) Quantificação absoluta de células *knockdown* aos 28 dpi. (c) Gel de eletroforese de produto de qPCR de mini kDNA e nDNA de células infectadas com *T. cruzi* aos 28 dias após a infecção. Bz, células tratadas com benznidazol; St, células sem tratamento; B, branco; CN, controle negativo, CP, controle positivo, Tc, *T. cruzi*; MM, marcador molecular de 1kb ladder.

**Tabela 8.** Média da razão mini kDNA/nDNA, desvio padrão e valor de p das células *knockdown* aos 28 dpi.

Tipo Celular	TTO	Dia Experimental		p valor
		28		
		Média	DP	
HEK	ST	1.21	0.31	ns
	BZ	30.71	18.35	
ATM	BZ	0	0	
XP-A	BZ	2.42	1.57	
XP-V	BZ	0.25	0.02	
p53	BZ	0	0	
p valor		ns		

Teste de variação Kuskal-Wallis e análise Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

## VI. DISCUSSÃO

A DC é a principal doença parasitária do Ocidente, trazendo importantes impactos socioeconômicos para as regiões onde ela ocorre (LIDANI *et al.*, 2019). Infelizmente, sua fisiopatologia ainda é amplamente desconhecida, seu tratamento necessita de aprimoramento e não há cura na fase crônica da doença (ECHAVARRÍA, *et al.*, 2021). Ainda hoje, milhares de pessoas correm o risco de infecção e muitas mortes ocorrem por ano. O desenvolvimento da patogênese é distinto de pessoa para pessoa e o gatilho para o desenvolvimento da DC severa é considerado um enigma (BONNEY *et al.*, 2019).

Para explicar as lesões produzidas pela infecção por *T. cruzi*, diferentes teorias têm sido criadas, relacionando a lesão tecidual à persistência do parasita ou a eventos de autoimunidade (TEIXEIRA *et al.*, 2011b; BONNEY e ENGMAN, 2015). A dificuldade em separar a causa e o efeito no contexto das manifestações clínicas decorre de informações contraditórias: “Por que uma porcentagem dos indivíduos desenvolve a síndrome austera mesmo na ausência dos parasitas?” Esta pergunta abriu margem para a investigação da autoimunidade e, a partir dela, um leque de investigações envolvendo inclusive a evolução das espécies, por trocas gênicas, passou a fazer parte do estudo da DC. Dessa forma, há mais de 110 anos, a DC é palco de estudos; no entanto, ainda são necessárias maiores investigações que elucidem os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas.

O foco deste trabalho foi compreender melhor os eventos de troca genética entre *T. cruzi* e a célula hospedeira, avaliando as possíveis vias e os mecanismos envolvidos em tal processo. Nossos dados confirmam a transferência lateral do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* para seus hospedeiros mamíferos, conforme descrito em estudos prévios (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999; NITZ *et al.*, 2004; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; HECHT *et al.*, 2010; TEXEIRA *et al.*, 2011a; TEXEIRA *et al.*, 2011b; GUIMARO *et al.*, 2014; WESLEY *et al.*, 2019). Indo além das abordagens qualitativas anteriores para demonstrar integração, aqui fornecemos uma visão quantitativa do processo. A quantificação foi possibilitada pelo desenvolvimento de um protocolo de qPCR que permitiu medir as relações minikDNA / nDNA em diferentes cepas de *T. cruzi*.

De interesse, ambas as quantidades de nDNA e kDNA podem variar entre as cepas de *T. cruzi* e até mesmo dentro da mesma linhagem (ALVES, ALMEIDA, KRÜGER, 1994; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; CALLEJAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Essa variabilidade pode afetar os estudos que realizam a quantificação absoluta da carga do

parasita, independentemente de o alvo da amplificação ser nDNA ou kDNA. Para minimizar os possíveis efeitos das diferenças genômicas entre cepas, definimos nosso limite de integração de kDNA com base em três cepas de *T. cruzi* (Berenice, CL Brener e Colombiana); em seguida, usamos a cepa Berenice, com razões kDNA / nDNA na extremidade inferior do espectro, para nossos experimentos de integração de kDNA. De importância, os dados da qPCR foram confirmados pelo *Southern blot* genômico.

## 1. Diferentes tipos celulares foram permissivos à integração do kDNA

O protozoário *T. cruzi* possui uma capacidade extraordinária de infectar e se multiplicar em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema fagocitário, sendo normalmente as primeiras células a captarem os patógenos dentro do organismo vivo (VAN OVERTVELT *et al.*, 1999; ARAÚJO-JORGE, 1989; ARAÚJO-JORGE; BARBOSA; MEIRELLES, 1992), sendo os macrófagos e as células musculares os principais alvos do parasita logo após a sua invasão (ARAÚJO-JORGE; BARBOSA; MEIRELLES, 1992).

Por essa razão, os estudos de transferência gênica lateral entre *T. cruzi* e o hospedeiro, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sempre se concentraram em buscar as marcas de integração em macrófagos e tecido cardíaco de diferentes organismos (TEIXEIRA *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1999; NITZ *et al.*, 2004; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2011a). Desta forma, a permissividade de outras linhagens celulares à integração do kDNA ainda era algo desconhecido até então.

Assim, a suscetibilidade de diferentes tipos celulares à integração do kDNA foi demonstrada pela primeira vez no presente estudo, sugerindo que esse fenômeno parece ser algo usual e recorrente. A esse respeito, WESLEY *et al.* (2019) associaram a transferência gênica lateral do kDNA não apenas à patofisiologia da doença de Chagas, mas também a um processo natural do parasita, o qual poderia trazer vantagens evolutivas para ele. Essa hipótese adquire maior credibilidade ao se analisar os resultados de GACHET-CASTRO *et al.* (2021) que demonstraram que *T. cruzi* sequestra a proteína U2AF35 do núcleo da célula infectada para favorecer a continuidade do seu ciclo de vida no hospedeiro. Tal proteína é essencial para o processamento de mRNAs maduros, impactando diretamente suas funções.

Ainda sobre a transferência lateral de material genético, esta já foi demonstrada em outras relações simbióticas e parasitárias. Por exemplo, análises evolutivas indicam que várias glicosilases de DNA de *Entamoeba histolytica* foram adquiridas por transferência lateral de genes, tendo sido herdadas de diferentes eucariotos (TRASVIÑA-ARENAS *et al.*,

2019). HOTOPP *et al.* (2007) identificaram ocorrências de transferência de DNA de *Wolbachia* para genomas hospedeiros, ainda que não se saiba se ela pode representar uma inovação evolutiva. No sentido inverso, considera-se que a albumina de *Schistosoma mansoni*, uma molécula importante para neutralizar o ataque oxidativo do sistema imune, foi adquirida por transferência horizontal do hospedeiro mamífero (DEMARCO *et al.*, 2007)

A integração do kDNA foi observada em todas as linhagens testadas, exceto para as células Jurkat. Possíveis explicações para tal achado passam desde particularidades protocolares dessa (categoria) de célula (não aderente) até à sua capacidade citotóxica, visto que os linfócitos T CD 8+ são reconhecidos como importantes elementos no controle da replicação do parasita durante a fase aguda (BRENER; GAZZINELLI, 1997; TARLETON, 2015). Nosso resultado se contrapõe à hipótese levantada anteriormente de que mutações somáticas nos linfócitos T seriam os principais desencadeadores do fenômeno de autoimunidade e a subsequente destruição maciça poderia levar a um segundo sinal de autoimunidade através de citocinas, monócitos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos e células estromais, as quais poderiam infiltrar o coração inflamado (TEXEIRA *et al.*, 2011b; GUIMARO *et al.*, 2014). Destaca-se que os linfócitos utilizados neste estudos são células importadas de rato, oriundas de leucemia/linfoma, altamente multadas, capazes de produzir interleucina-2. Dessa forma, presume-se assim que a grande quantidade de mutações nestas células pode ter impedido a integração dos minikDNA. Entretanto para afirmar essa suposição são necessários novos experimentos visando esclarecer melhor esta questão.

Interessantemente, o uso da droga tripanocida facilitou a identificação do processo de integração, seja a partir da visualização do gel de eletroforese ou a partir da determinação da razão minikDNA/nDNA. Possivelmente, a eliminação do parasita excluiu fatores de interferência que advinham do parasita vivo. Nossos resultados corroboram com achados pioneiros obtidos por TEIXEIRA *et al.* (1991) sobre investigação da transferência lateral de kDNA, quando observaram que linhagens celulares de macrófagos tratados apresentavam kDNA de *T. cruzi* nos cromossomos 3, 6 e 11 da célula hospedeira (TEIXEIRA *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1994).

Em relação à razão minikDNA/nDNA, observamos aumento desta relação ao compararmos o período inicial (3 dias) ao final (28 dias) nas linhagens de HEK-293 e Caco-2. Isso é um indicativo de dinamicidade do genoma celular, demonstrando um possível acúmulo de kDNA ao longo do tempo. Igualmente, WESLEY *et al.* (2019) observaram um aumento gradual na razão kDNA/nDNA em macrófagos. Segundo os autores, esse fenômeno

acumulativo de integração do kDNA varia dependendo do tecido avaliado e da cepa utilizada e pode estar relacionado à associação do kDNA a elementos móveis do genoma hospedeiro (WESLEY *et al.*, 2019).

Para confirmar os resultados obtidos por qPCR, realizamos o *Southern blot* genômico, pelo qual conseguiu-se identificar a integração na linhagem J774 A.1, corroborando com resultados publicados anteriormente (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999; NITZ *et al.*, 2004; HECHT *et al.*, 2010; GUIMARO *et al.*, 2014). No experimento, identificamos bandas de peso molecular maior (~1.5kb) que o tamanho esperado (0.36 kb) nos macrófagos infectados com *T. cruzi* e tratados com Bz. Curiosamente nesse grupo, foi verificada a ausência da banda do tamanho esperado para *T. cruzi*, confirmando a ausência da infecção. Já nos macrófagos não tratados, observamos, nos períodos de 7, 14 e 28 dpi, banda de peso molecular equivalente ao perfil de banda para *T. cruzi*, indicando que o parasita estava presente.

## **2. Vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma cruzi* carregam minicírculos de kDNA**

Uma possível via para transferência lateral de DNA se dá por meio de vesículas extracelulares. Sabe-se que tais vesículas são essenciais para a interação parasita-hospedeiro, pois elas carregam uma série de moléculas, como proteínas, lipídeos, metabólitos e ácidos nucleicos (DNA, RNA e RNA não codificante (ncRNA), incluindo miRNA, lncRNA, tRNA, rRNA, snoRNA e scaRNA) (OFIR-BIRIN; REGEV-RUDZKI. 2019; WU *et al.*, 2019; CARRERA-BRAVO; KOH; TAN, 2021). Em nosso estudo, identificamos a presença de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, na ausência de maxicírculos de kDNA ou DNA nuclear, no secretoma deste protozoário, representando uma possível via de liberação dos minicírculos para a célula hospedeira. Igualmente, SISQUELLA *et al.* (2017) demonstraram que o *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, ao adentrar os glóbulos vermelhos, pode secretar vesículas extracelulares contendo pequenos RNAs e DNA genômico do parasita, ativando diferentes vias da célula hospedeira.

O protocolo de ultracentrifugação permitiu determinar que os minicírculos de kDNA se encontravam no interior de microvesículas, estruturas compostas por uma bicamada lipídica derivadas das células (MALKIN; BRATMAN, 2020). No caso de *T. cruzi*, costuma-se observar grande quantidade de vesículas emergindo a partir da base do flagelo, próximo ao cinetoplasto (PERDOMO; BONHIVERS; ROBINSON, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2018;

HALLIDAY *et al.*, 2021), fator que poderia favorecer a incorporação de minicírculos que se desprenderam da rede de kDNA. Ademais, o uso das enzimas DNase I e S1 nuclease demonstraram que os minicírculos se encontram efetivamente no interior das vesículas e que ele está na conformação de DNA dupla-fita, indicando que essas moléculas, ao passarem pelo processo de replicação, devem ter sido perdidas antes de retornar para a rede de kDNA. De fato, dados recentes revelam que o DNA de dupla-fita é a forma mais abundante de DNA tanto no meio extravesicular quanto no meio intravesicular (LIU *et al.*, 2022; LÁZARO-IBÁÑEZ *et al.*, 2019).

Aliás, verificou-se que os minikDNA liberados no secretoma são possivelmente incorporados no genoma da célula hospedeira (Figura 18), pois mesmo mantendo essas sem contato com o parasita, observou-se bandas de minikDNA. Vale ressaltar que essas amostras foram mantidas em sistemas *transwell* durante 15 dias em contato com o parasitos, depois desse período as células foram mantidas e garrafas de culturas de células sem contato com o parasita durante 45 dias até que se completasse 60 dias de experimento. Ademais, ressalta-se que foram realizadas trocas periódicas de meio e repique. Esse processo de manutenção das culturas ao longo do tempo elimina as vesículas do parasita presente livremente no meio. Outro fator relevante é que células possuem DNases capaz de degradar DNA livre no citoplasma, e uma vez incorporadas as VEs na membrana celular elas liberam os minikDNA no citoplasmas da célula que podem ser incorporados no genoma ou digeridos por enzimas capazes de degradar DNA (KAWANE; MOTANI; NAGATA, 2014; SANTA *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que as VEs são estruturas estáveis e, por esse motivo, cumprem bem o seu papel de transportar informação genética para outras células. Essa participação das VEs como transporte já foi descrita em várias doenças, atuando principalmente na comunicação intercelular e possibilitando a regulação da resposta imune, o transporte de moléculas que pode ativar diferentes vias e ainda como biomarcadores para o diagnóstico de câncer (ROBBINS; MORELLI, 2014, KORMELINK *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2021; IBÁÑEZ *et al.*, 2020). Esse potencial indutor de trocas gênicas das vesículas nas interações celulares tem sido intensamente investigado. Sabe-se, por exemplo, que moléculas de DNA de VEs podem ativar ou causar a regulação positiva de várias proteínas intracelulares, como STAT 3, causando translocação para o núcleo e superexpressão de oncogenes que conduzem um fenótipo pró-tumorigênico na célula receptora (MALKIN; BRATMAN, 2020). A origem do DNA carregado pelas VEs é multifatorial (nuclear, mitocondrial etc.). Cada vez novos estudos surgem evidenciando o papel das vesículas como

veículos de moléculas oriundas da mitocôndria, inclusive DNA mitocondrial e as modulações que a entrega dessas moléculas pode promover na célula/organismos receptora (LAZO *et al.*, 2020). De fato, evidências apontam que a transferência de componentes mitocondriais tem sido implicada no câncer de mama resistente a terapia hormonal (SANSONE *et al.*, 2017). Esses intercâmbios intercelulares por intermédio de VEs com *T. cruzi* também não é diferente e acredita-se que essa interação parece potencializar a infecção pelo parasita (LOVO-MARTINS *et al.*, 2018). Dessa forma, postulamos que as vesículas podem ser um meio pelo qual sequências de minicírculos de kDNA são liberadas e incorporados pela célula ao seu genoma. Interessantemente estas sequencias permaneceram no genoma das células, sendo possível detectá-lo meses após o contato inicial com as VEs.

### **3. Retroelementos LINE-1 são modulados por *Trypanosoma cruzi***

Ademais, já foi demonstrado que fatores presentes nas VEs podem atuar sobre a atividade de retroelementos LINE-1 (RAI *et al.*, 2017; KAWAMURA *et al.*, 2019). Visto que a entrada do kDNA no genoma hospedeiro ocorre preferencialmente em retroelementos LINE-1 (HECHT *et al.*, 2010), esta seria uma via que poderia estar sendo potencialmente afetada. Para investigar tal hipótese, avaliamos a expressão desse retrotransposon em células infectadas, tratadas ou não com benznidazol. Interessantemente, foi observado que há um aumento da expressão de LINE-1 ainda no início da infecção (4h), a qual se acentua 72h pós-infecção. Tal fenômeno poderia favorecer a entrada do kDNA no genoma via maquinaria de retrotransposição. Vale ressaltar que a infecção por *T. cruzi* não seria o primeiro relato de patógeno a interferir em tais elementos transponíveis. Por exemplo, a regulação positiva do retrotransposon também foi observada em organóides intestinais humanos infectados (marcelle: quasis organoides) com SARS-CoV-2 (YIN *et al.*, 2021). Igualmente, a infecção por vírus da hepatite C causa um aumento significativo dos níveis endógenos de proteína ORF1 codificada em LINE-1 (SCHÖBEL *et al.*, 2021). Sabe-se que a regulação positiva de retrotransposons pode levar ao aumento da instabilidade genômica e o surgimento de patologias, como o câncer e doenças autoimunes (ZHANG; ZHANG; YU, 2020; MUSTELIN; UKADIKE, 2020; GORBUNOVA *et al.*, 2021).

Ainda para avaliar a participação do retroelemento LINE-1 no processo de integração do kDNA, utilizamos três inibidores distintos de retrotransposição: zidovudina, truvada e nevirapina. Nossa descoberta de que todas essas drogas são capazes de bloquear a integração de minicírculos de kDNA no genoma da célula hospedeira indica que a maquinaria

de retrotransposição deve desempenhar um papel fundamental e contribuir para a disseminação de sequências de minicírculos por todo o genoma, como sugerido em estudos anteriores (NITZ *et al.*, 2004; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006; HECHT *et al.*, 2010; GUIMARO *et al.*, 2014; WESLEY *et al.*, 2019). Interessantemente, transposons circulares, chamados *Helitrons*, se colocam com outros retroelementos e podem transportar uma variedade de trechos de DNA do hospedeiro, produzindo mudanças em íntrons, éxons e sequências regulatórias (THOMAS *et al.*, 2014; BABII *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2019). Ademais, a inserção de sequências de DNA nuclear de origem mitocondrial (numt) ocorre frequentemente em regiões ricas em retroelementos, sugerindo que a maquinaria de retrotransposição está envolvida na transferência de genes mitocondriais para o núcleo (TSUJI *et al.*, 2012; PUERTAS; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2020).

Desse modo, imagina-se que a integração de kDNA mediada por retrotransposons LINE-1 implicaria no uso pelo DNA exógeno da maquinaria da célula hospedeira para alcançar o núcleo e integrar-se ao genoma da célula hospedeira. Entretanto, a rota tomada pelos minicírculos de kDNA de sua liberação pelo parasita através do citoplasma da célula hospedeira e no núcleo (para finalmente alcançar os locais de integração nos cromossomos) requer mais estudos.

#### **4. Vias de reparo de DNA e de controle epigenético estão envolvidas na integração**

Relatos recentes associam a mobilização de retroelementos com reparo de DSB (HEDGES; DEININGER, 2007; MEERS; KESKIN; STORICI, 2016; MITA *et al.*, 2020) bem como já foi demonstrado que retrotransposons, DNA genômico, mRNA presentes em exossomos são inseridos de maneira não intencional nos sítios de DSB pelo sistema CRISPR-Cas9 (ONO *et al.*, 2019). Esses achados corroboram com nossos resultados, visto que a inibição de tais vias impediu a integração e o acúmulo de kDNA.

A azatioprina é um análogo sintético da purina, tendo papel reconhecido no tratamento de diferentes tipos de câncer e doenças autoimunes (MALTZMAN; KORETZKY, 2003; MCWILLIAM; KHAN, 2020). Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas sabe-se que ela pode inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas, e também interferir no metabolismo celular e inibir a mitose (BROEN; VAN LAA, 2020; SCHULTHEISS *et al.*, 2022). Como consequência de tais mecanismos, observamos que essa droga foi capaz de inibir a integração dos minicírculos de kDNA.



Atuando em vias de reparo de DNA, outras três drogas também foram avaliadas para se verificar suas capacidades de impedir a integração dos minicírculos de kDNA: pentoxifilina, NU 7441 e Ag 014699. A pentoxifilina é uma metilxantina normalmente utilizada para tratar distúrbios relacionados à microcirculação e para reduzir a anóxia tumoral (LEE *et al.*, 1992; MOSTAFA-HEDEA *et al.*, 2022). Entretanto, novas propriedades vêm sendo atribuídas a essa droga, a qual parece encurtar o reparo em G2 ao promover a entrada precoce na mitose. Ademais, este fármaco inibe a recombinação homóloga ao atuar sobre ATM e ATR, que facilitam o reparo na fase G2 (BÖHM; ROOS; SERAFIN; 2003). Outro achado interessante é que já foi demonstrado que a pentoxifilina efetivamente suprime o reparo de DSB por recombinação homóloga, apesar de não aumentar a apoptose das células (THERON *et al.*, 2000).

NU 7441 é um potente e seletivo inibidor de DNA-PK, atuando em uma variedade de quinases, incluindo mTOR, PI 3-K, ATM e ATR. De interesse, a subunidade catalítica de proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) é um fator distinto na via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) envolvida no reparo de DSB (DONG *et al.*, 2018). Além disso, as PI 3-K, ATM e ATR estão envolvidas nos mecanismos de *checkpoint*, fosforilando vários alvos que contribuem para a resposta geral ao dano ao DNA, e, portanto, sua inibição simultânea pode impedir a fosforilação de diferentes proteínas que são essenciais para a DDR (SMITH *et al.*, 2010). A inibição, por exemplo, da fosforilação, pela ATM, DNA-PK ou ATR, da histona H2AX, pode impedir o recrutamento de outras proteínas que estão envolvidas no processo de remodelação da cromatina (HAKEM, 2008). Interessantemente a NU 7441 foi a única droga incapaz de inibir a integração, possivelmente pela redundância inibitória de proteínas responsáveis pelo *checkpoint* e reparo de DSB.

Ag 014699 é um inibidor de PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1), uma importante enzima capaz de detectar os danos ao DNA e induzir seu reparo por diferentes vias (CURTIN; SZABO, 2020; EISEMANN; PASCAL, 2019). Além disso, PARP pode modular a inflamação através da interação com NFκB e regular a expressão de moléculas sinalizadoras inflamatórias. Assim, a expressão de PARP pode ter um papel duplo: ao mesmo tempo em que PARP é necessário para reparar lesões de DNA induzidas por estresse oxidativo, sua expressão pode levar ao aumento da inflamação via regulação positiva da sinalização de NFκB (SWINDALL; STANLEY; YANG, 2013). Interessantemente, o gene PARP-1 foi um dos sítios de integração encontrado no trabalho de HECHT *et al.* (2010).

Uma das drogas que atuam no controle epigenético (inibidores de histonas desacetilases HDAC (Tricostatina) utilizadas neste trabalho também impediu a integração do kDNA. As HDAC pertencem a uma vasta família de enzimas com papéis essenciais em inúmeros processos biológicos, atuando principalmente na inibição da transcrição (ROPERO; ESTELLER, 2007; RAJENDRAN *et al.*, 2011; BASSETT; BARNETT, 2014) e contribuindo para o reparo do DNA por reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo de incompatibilidade (MMR), junção de extremidade não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HR) e reparo de ligações cruzadas entre fitas (ICL) (ROOS; KRUMM, 2016). Considera-se que a informação genética deve ser protegida para preservar o bom funcionamento da célula. Como o DNA de eucarioto é ligado por proteínas histonas, estas têm a função de protegê-lo. Assim, as mudanças pós traducionais contidas pelas histonas servem para regular a cromatina de maneira bastante dinâmica, incluindo o reparo do DNA (GONG; MILLER, 2013). Desta forma, a inibição de tais proteínas pode causar um desequilíbrio geral nas células e ajudar a impedir a integração do kDNA. É importante ressaltar, no entanto, que a maioria dos organismos desenvolveu mecanismos de redundância para garantir o funcionamento das vias de replicação/reparo do DNA, críticas para a sobrevivência celular (HAKEM, 2008; SILVA; MCCULLOCH; CANO, 2022). Por exemplo, células defeituosas para reparo de DNA de junção de extremidades não homólogas podem usar um mecanismo ancestral alternativo de reparo de DSB mediado por retrotransposição independente de endonuclease (MORRISH *et al.*, 2002; SEN *et al.*, 2007; KOPERA, *et al.*, 2011). Desta forma, o uso de um único inibidor pode ser suficiente para inibir por completo a integração dos minicírculos de kDNA.

Verificamos também que a expressão reduzida das proteínas ATM, XP-A, XP-V e p53 preveniram a integração. Em situações celulares normais, as proteínas ATM e p53 podem exercer importantes papéis no mecanismo de *checkpoint* 1 e 2, levando à morte celular como ação preventiva à proliferação descontrolada de células mutadas. No que concerne às vias de reparo ao dano no DNA, a ATM faz uma triagem no DNA, reconhecendo quebra da dupla fita, e ativando a cascata de proteínas na via HR, fosforilando as regiões de quebra de dupla fita para ativação de DNA nucleases, proteínas BRCA1 e 2, atuantes na correção do dano (SHIBATA; JEGGO, 2021). A p53 protege o genoma orquestrando uma variedade de resposta ao DDR: ela interrompe o ciclo celular, para que os mecanismos de reparo restaurem a estabilidade do genoma (WILLIAMS; SCHUMACHER, 2016). A proteína XP-A está envolvida no reconhecimento inicial do dano de ativando a via NER, enquanto a XP-V atua

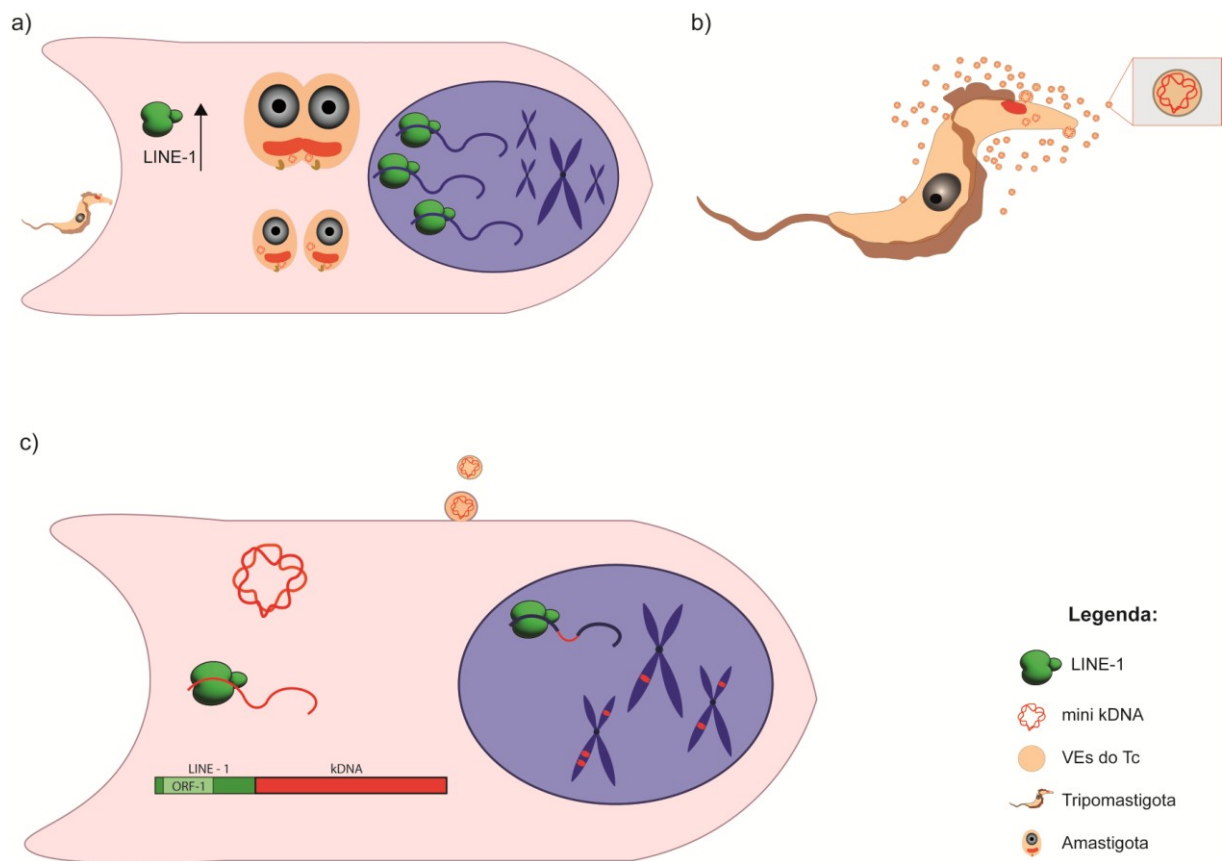
no reparo pós-replicação do DNA danificado, fazendo assim um pente-fino, de tal modo que garanta efetivamente a correção completa do DNA (LEUNG *et al.*, 2022).

Assim, nossos resultados indicam que a integração do kDNA parece depender de que a maquinaria de reparo de DNA esteja funcionando corretamente para que o evento aconteça. Pois a inibição de uma via por vez não inviabilizou a integração. Desse modo, postulamos que a integridade das vias BER, NER, HR, NHEJ possa ter alguma relação com a permissividade à integração dos minicírculos de kDNA, talvez por essas vias influenciarem a atividade dos retroelementos. Por exemplo, sabe-se que alterações na via de BRCA1 restringe a retrotransposição de LINE-1 em células humanas (MITA *et al.*, 2020), bem como retrotransposons podem ser regulados por p53 durante a recombinação homóloga (DENG *et al.*, 2019). Por outro lado, a inibição concomitante de mais de uma molécula envolvidas no DDR em diferentes vias, tais como as proteínas sinalizadoras dos mecanismos de *checkpoint* chk1 e 2, ATR e ATM, bem como DNA-PK, também responsáveis principalmente pelos processos de fosforilação permitiu a integração do kDNA. Assim, como segunda hipótese, postula-se também que o silenciamento simultâneo de várias proteínas impedindo o processo de fosforilação pode ajudar a integração das sequências de minicírculos de kDNA. Contudo, para tal afirmação são necessários novos estudos que investiguem com mais profundidade a integração do kDNA envolvendo os processos de fosforilação de proteínas dos pontos de verificação do DNA.

## **5. Proposta de integração do kDNA no genoma hospedeiro**

Diante do exposto, propõe-se 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; LUKEŠ *et al.*, 2002, ENGLUND, 2014). Durante esse mecanismo de replicação, poderia ocorrer a perda de alguns minicírculos livres, os quais poderiam ser encaminhados para a célula hospedeira por meio das VEs de *T. cruzi*. Uma vez dentro da célula, o kDNA se utilizaria da maquinaria de retroelementos LINE-1 para alcançar o núcleo e se inserir no genoma. No entanto, o trajeto percorrido pelo kDNA, desde a liberação dos minicírculos pelas VEs nas células até invadir o núcleo, atravessando o citoplasma da célula hospedeira e encontrando o sítio de integração no cromossomo ainda requer estudo mais

detalhado. De acordo com nossos achados e com os dados da literatura, propõe-se o seguinte modelo de integração: inicialmente, a proteína da ORF1 (ORF1p), que tem afinidade por RNA e DNA e atua como uma chaperona (MARTIN, 2010; NAUFER *et al.*, 2015), 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 de transcriptase reversa (Fig. 23). Para tanto, é necessário que as vias reparo do DNA (BER, NER, HR, NHEJ) e do controle epigenético estejam funcionando adequadamente. Destaca-se que o modelo proposto é hipotético, sendo necessários novos estudos a fim de elucidar melhor os mecanismos de inserção dos minicírculos no genoma hospedeiro.



**Figura 23.** Modelo de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro. a) A infecção por *T. cruzi* aumenta a expressão de LINE-1 nos estágios iniciais da infecção. O parasita se diferencia para amastigota e se divide dentro da célula. Nesse processo de divisão, 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 são replicados na presença de uma série de proteínas, como DNA primases e polimerases. b) Alguns desses minicírculos livres dentro do parasita são envolvidos por VEs e encaminhados para a célula do hospedeiro. c) A proteína ORF1 (ORF1p), de retroelementos LINE-1, atua como uma chaperona, liga-se ao kDNA e o transporta 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 de transcriptase reversa.

## VII. CONCLUSÃO

Nosso estudo está entre os primeiros a usar uma abordagem quantitativa e dinâmica para a avaliação de alterações genômicas associadas à interação parasita-hospedeiro. Assim, como conclusão, verificamos que:

- O protocolo de qPCR que projetamos para investigar a integração do kDNA no genoma do hospedeiro fornece uma base para o desenvolvimento de marcadores prognósticos aprimorados e inovadores para a doença de Chagas crônica.
- Demonstramos também a presença de mini kDNA no interior de microvesículas, sugerindo um possível meio de transporte do DNA mitocondrial de *T. cruzi* para o núcleo da célula hospedeira.
- A modulação da expressão de retroelementos LINE-1 foi observada, reforçando a importância desses retrotransposons no evento de integração do kDNA.
- Foi observado que diferentes tipos celulares foram permissivos à integração.
- O uso de inibidores de vias de reparo do DNA, controle epigenético e de síntese de purinas impediram a integração. Assim reforçamos que as essas vias podem ter participação positiva na integração dos minikDNA. Em contra partida o inibidor de proteína quinase dependente de DNA não inibiu a integração.

Nossos achados sugerem que a combinação de drogas tripanocidas com drogas antirretrovirais ou azatioprina (e talvez reparo de DSB ou inibidores de HDAC) visaria tratar simultaneamente a persistência do parasita e a integração do kDNA no genoma do hospedeiro; ensaios específicos ainda são necessários para testar os possíveis efeitos dessa abordagem multimedicamentosa na progressão clínica para a fase crônica da doença de Chagas severa.

## VIII. REFERÊNCIAS

- A KATZ, Laura. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data.. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 52, n. 5, p. 1893-1900, 1 set. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-5-1893>.
- A PÉREZ-MOLINA, Jose *et al.* Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1347-1356, nov. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00243-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00243-1).
- A PÉREZ-MOLINA, José; MOLINA, Israel. Chagas disease cardiomyopathy treatment remains a challenge – Authors' reply. **The Lancet**, [s.l.], v. 391, n. 10136, p.2209-2210, jun. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30776-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30776-1).
- A PÉREZ-MOLINA, José; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, [S.L.], v. 391, n. 10115, p. 82-94, jan. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31612-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31612-4).
- ALDASORO, E *et al.* What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic chagas disease treatment. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 73, n. 4, p. 1060-1067, 16 jan. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx516>.
- ALEXANDER, Jessica L.; ORR-WEAVER, Terry L.. Replication fork instability and the consequences of fork collisions from rereplication. **Genes & Development**, [S.L.], v. 30, n. 20, p. 2241-2252, 15 out. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.288142.116>.
- ALHMOUD, Jehad F. *et al.* DNA Damage/Repair Management in Cancers. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 1050, 23 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12041050>.
- ALVES, Ada M. B.; ALMEIDA, Darcy F.; KRÜGER, Wanda M. A.. Changes in *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA Minicircles Induced by Environmental Conditions and Subcloning. **The Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 415-419, jul. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06099.x>.
- ARAÚJO, Perla F *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 437-446, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160538>.
- ARAÚJO-JORGE, Tania C. de. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 441-462, dez. 1989. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761989000400001>.
- ARAÚJO-JORGE, Tania C. de; BARBOSA, Helene S.; MEIRELLES, Maria Nazareth L.. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 87, n. 5, p. 43-56, 1992. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761992000900006>.

ARROYO, Rossana *et al.* *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-24, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/946787>.

AUBREY, Brandon J *et al.* Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 104-113, maio 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>.

AUCAMP, Janine *et al.* The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. **Biological Reviews**, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 1649-1683, 14 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12413>.

BABII, A *et al.* Helitrons and Retrotransposons Are Co-localized in *Bos taurus* Genomes. **Current Genomics**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 278-286, 20 abr. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389202918666161108143909>.

BAÑUELOS-SANCHEZ *et al.* Synthesis and Characterization of Specific Reverse Transcriptase Inhibitors for Mammalian LINE-1 Retrotransposons. **Cell Chemical Biology**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 1095-1109, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.04.010>.

BASSETT, Shalome; BARNETT, Matthew. The Role of Dietary Histone Deacetylases (HDACs) Inhibitors in Health and Disease. **Nutrients**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 4273-4301, 15 out. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6104273>.

BECK, Christine R. *et al.* LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. **Annual Review Of Genomics And Human Genetics**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 187-215, 22 set. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141802>.

BERN, Caryn *et al.* Chagas Disease in the United States: a public health approach. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 1-42, 18 dez. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00023-19>.

BLACKFORD, Andrew N.; JACKSON, Stephen P.. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 66, n. 6, p. 801-817, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.

BOHM, Lothar. Inhibition of homologous recombination repair with Pentoxifylline targets G2 cells generated by radiotherapy and induces major enhancements of the toxicity of cisplatin and melphalan given after irradiation. **Radiation Oncology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-8, 3 maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1748-717x-1-12>.

BÖHM, Lothar; ROOS, Wynand Paul; SERAFIN, Antonio Mendes. Inhibition of DNA repair by Pentoxifylline and related methylxanthine derivatives. **Toxicology**, [S.L.], v. 193, n. 1-2, p. 153-160, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00294-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00294-4).

BONA, Elidiana de *et al.* Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy?. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-8, 6 ago. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>.

- BONNEY, K. M. *et al.* Cardiac damage induced by immunization with heat-killed *Trypanosoma cruzi* is not antibody mediated. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 1-10, 13 dez. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12008>.
- BONNEY, Kevin M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 421-447, 24 jan. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>.
- BONNEY, Kevin M.; ENGMAN, David M.. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 185, n. 6, p. 1537-1547, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>.
- BRENER, Zigman; GAZZINELLI, Ricardo T.. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. **International Archives Of Allergy And Immunology**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000237653>.
- BROEN, Jasper C. A.; VAN LAAR, Jacob M. Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 167-178, 13 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0374-8>.
- BUDDEN, Timothy; BOWDEN, Nikola. The Role of Altered Nucleotide Excision Repair and UVB-Induced DNA Damage in Melanomagenesis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1132-1151, 9 jan. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14011132>.
- BURROWS, Natalie *et al.* Phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) and PI3K-related kinase (PIKK) activity contributes to radioresistance in thyroid carcinomas. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 39, p. 63106-63123, 4 ago. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11056>.
- CAI, Jin *et al.* Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. **Journal Of Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 227-238, 11 abr. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjt011>.
- CALDAS, Ivo S.; SANTOS, Elda G.; NOVAES, Rômulo D.. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 28 ago. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2019.1650915>.
- CALLEJAS-HERNÁNDEZ, Francisco *et al.* The Complete Mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: maxicircles and minicircles. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-11, 29 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.672448>.
- CARRERA-BRAVO, Claudia; KOH, Eileen Y.; TAN, Kevin S.W.. The roles of parasite-derived extracellular vesicles in disease and host-parasite communication. **Parasitology International**, [S.L.], v. 83, p. 102373, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2021.102373>.



CARUSILLO, Antonio; MUSSOLINO, Claudio. DNA Damage: from threat to treatment. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1665, 10 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9071665>.

CAVALCANTI, Danielle Pereira; SOUZA, Wanderley de. The Kinetoplast of Trypanosomatids: from early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, [S.L.], v. 2018, p. 1-10, 19 jun. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9603051>.

CECCO, Marco de; ITO, Takahiro; PETRASHEN, Anna P.; ELIAS, Amy E.; SKVIR, Nicholas J.; CRISCIONE, Steven W.; CALIGIANA, Alberto; BROCCULI, Greta; ADNEY, Emily M.; BOEKE, Jef D.. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. **Nature**, [S.L.], v. 566, n. 7742, p. 73-78, fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>.

CHAGAS, C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 47, n. 1, p. 159-218, 1909.

CHANG, Pamela V *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via Histone deacetylase inhibition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 3 jan. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1322269111>.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel?. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 15, p. 98-103, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>.

CHOUDHURI, Subhadip; GARG, Nisha Jain. PARP1-cGAS-NF- $\kappa$ B pathway of proinflammatory macrophage activation by extracellular vesicles released during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1-27, 21 abr. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008474>.

CHUONG, Edward B.; ELDE, Nels C.; FESCHOTTE, Cédric. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 71-86, 21 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.139>.

CISZEWSKI, Wojciech M *et al.* DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. **Breast Cancer Research And Treatment**, [S.L.], v. 143, n. 1, p. 47-55, 29 nov. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-013-2785-6>.

CRISTOVÃO-SILVA, Ana Catarina; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly; HERNANDES, Marcelo Zaldini; PEREIRA, Valéria Rêgo Alves. Chagas disease: immunology of the disease at a glance. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S.L.], v. 62, p. 15-22, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>

CRUET-HENNEQUART, Séverine *et al.* UV-induced RPA phosphorylation is increased in the absence of DNA polymerase  $\eta$  and requires DNA-PK. **Dna Repair**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 491-504, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.01.008>.

CUNHA-NETO, E *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 98, n. 8, p. 1709-1712, 15 out. 1996. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci118969>.

CURTIN, Nicola J.; SZABO, Csaba. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 711-736, 3 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0076-6>.

DAS, Kalyan; MARTINEZ, Sergio e; BAUMAN, Joseph D; ARNOLD, Eddy. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 253-259, 22 jan. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2223>

DEMARCO, Ricardo; MATHIESON, William; DILLON, Gary P.; WILSON, R. Alan. Schistosome albumin is of host, not parasite, origin. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 1201-1208, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.004>.

DENG, Bing *et al.* An LTR retrotransposon-derived lnc RNA interacts with RNF 169 to promote homologous recombination. **Embo Reports**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 1-18, 5 set. 2019. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201847650>.

DIAS, Gustavo Carvalho. **Geração de linhagens HEK 293 knockdown para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 alfa e estudo do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo provocado por azul de metileno**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

DONG, Jun *et al.* Inactivation of DNA-PK by knockdown DNA-PKcs or NU7441 impairs non-homologous end-joining of radiation-induced double strand break repair. **Oncology Reports**, [S.L.], p. 912-920, 16 jan. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2018.6217>.

DONG, Jun *et al.* Inhibiting DNA-PKcs in a non-homologous end-joining pathway in response to DNA double-strand breaks. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 14, p. 22662-22673, 7 fev. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.15153>.

DNDi's - Drugs For Neglected Diseases Initiative. **Chagas disease: Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease**. 2022. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/#>. Acesso em: 20 mar. 2022

ECHAVARRÍA, Natalia Giraldo *et al.* Chagas Disease: chronic chagas cardiomyopathy. **Current Problems In Cardiology**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 100507, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>.

EISEMANN, Travis; PASCAL, John M.. Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 19-33, 21 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03366-0>.

ENGLUND, Paul T.. A Passion for Parasites. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 289, n. 49, p. 33712-33729, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.x114.620666>.

FASSIHI, Hiva. Spotlight on ‘xeroderma pigmentosum’. **Photochem. Photobiol. Sci.**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 78-84, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c2pp25267h>.

GACHET-CASTRO, Camila *et al.* Modulation of the Host Nuclear Compartment by *Trypanosoma cruzi* Uncovers Effects on Host Transcription and Splicing Machinery. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-16, 19 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.718028>.

GILEAD SCIENCES. **Truvada**: emcitabina + furamato de tenofovir desoproxila. Emcitabina + Furamato de Tenofovir Desoproxila. 2019. Disponível em: [https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/other/truvada\\_bula-ao-paciente.pdf?la=en&hash=ED0440E5CD58B029F21CF28FEB45D4A4](https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/other/truvada_bula-ao-paciente.pdf?la=en&hash=ED0440E5CD58B029F21CF28FEB45D4A4). Acesso em: 2 fev. 2020.

GONÇALVES, Camila Silva *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-14, 6 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>.

GONG, Fade; MILLER, Kyle M.. Mammalian DNA repair: hats and hdacs make their mark through histone acetylation. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 750, n. 1-2, p. 23-30, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.002>.

GORBUNOVA, Vera *et al.* The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. **Nature**, [S.L.], v. 596, n. 7870, p. 43-53, 4 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03542-y>.

GOSPODINOV, Anastas *et al.* The Inhibitor of Histone Deacetylases Sodium Butyrate Enhances the Cytotoxicity of Mitomycin C. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 2116-2126, 1 out. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-12-0193>.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars In Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 164-169, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semmp.2019.04.008>.

GUIMARO, Maria C *et al.* Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 1-21, 18 dez. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003384>.

HAKEM, Razqallah. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 589-605, 20 fev. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.15>.

HALLIDAY, Clare *et al.* Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 317-329, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2020.11.005>

HAN, Guangjie *et al.* Characterization of a novel Helitron family in insect genomes: insights into classification, evolution and horizontal transfer. **Mobile Dna**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-15, 31 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13100-019-0165-4>.

HECHT, Mariana M *et al.* Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1-15, 12 fev. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009181>.

HEDGES, D.J.; DEININGER, P.L.. Inviting instability: transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 616, n. 1-2, p. 46-59, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.021>.

HOTOPP, Julie C *et al.* Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. **Science**, [S.L.], v. 317, n. 5845, p. 1753-1756, 21 set. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1142490>.

HUANG, Ruixue; ZHOU, Ping-Kun. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-35, 9 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00648-7>.

HUSNIK, Filip; MCCUTCHEON, John P. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 67-79, 27 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.137>.

IBÁÑEZ, Francesc *et al.* Circulating MicroRNAs in Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers of Alcohol-Induced Neuroinflammation in Adolescence: gender differences. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 6730, 14 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186730>.

JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, [S.L.], v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 22 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>

JAFARAIN, Abbas; ASGHARI, Gholamreza; GHASSAMI, Erfaneh. Evaluation of cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. callus and leaf extracts on Hela cells. **Advanced Biomedical Research**, Isfahan, v. 194, n. 3, p.1-6, set. 2014.

JAVADI, Alireza *et al.* Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples. **Tanaffos**. 2014;13(4):41-7.

JIANG, Xuan *et al.* PARP inhibitors in ovarian cancer: sensitivity prediction and resistance mechanisms. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 2303-2313, 22 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.14133>.

KARRAN, P.. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. **British Medical Bulletin**, [S.L.], v. 79-80, n. 1, p. 153-170, 1 jun. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldl020>.

KAWAMURA, Yumi *et al.* Extracellular vesicles mediate the horizontal transfer of an active LINE-1 retrotransposon. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1643214, 23 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1080/20013078.2019.1643214>.

KAWANE, K.; MOTANI, K.; NAGATA, S.. DNA Degradation and Its Defects. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1-14, 1 jun. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a016394>.

KIERSZENBAUM, Felipe. Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 210-223, abr. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.12.2.210>.

KIERSZENBAUM, Felipe. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 513-516, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.013>.

KITSOU, C *et al.* Exogenous retroelement integration in sperm and embryos affects preimplantation development. **Reproduction**, [S.L.], p. 185-193, set. 2016. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-15-0174>.

KLINGBEIL, Michele M.; ENGLUND, Paul T.. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 13, p. 4333-4334, 22 mar. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401400101>.

KÖBERLE, Beate; ROGINSKAYA, Vera; WOOD, Richard D.. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. **Dna Repair**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 641-648, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.12.001>.

KOPERA, Huiria C. *et al.* Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 51, p. 20345-20350, 22 set. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1100275108>.

KORMELINK, Tom Groot *et al.* The role of extracellular vesicles when innate meets adaptive. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 439-452, 3 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-018-0681-1>.

KRATZ, Jadel Müller. Drug discovery for chagas disease: a viewpoint. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 198, p. 105107, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>.

- LAGES-SILVA, Eliane *et al.* Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II Strains from Patients with Different Clinical Forms of Chagas' Disease in Brazil. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 2167-2171, jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02124-05>.
- LÁZARO-IBÁÑEZ, Elisa *et al.* DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1656993, 27 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1080/20013078.2019.1656993>.
- LAZO, Stephanie *et al.* Mitochondrial DNA in extracellular vesicles declines with age. **Aging Cell**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-15, 23 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ace1.13283>.
- LEE, Intae; KIM, Jae H.; LEVITT, Seymour H.; SONG, Chang W.. Increases in tumor response by pentoxifylline alone or in combination with nicotinamide. **International Journal Of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 425-429, jan. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90846-a](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(92)90846-a).
- LEUNG, Alexander Kc; BARANKIN, Benjamin; LAM, Joseph M; LEONG, Kin Fon; HON, Kam Lun. Xeroderma pigmentosum: an updated review. **Drugs In Context**, [S.L.], v. 11, p. 1-17, 25 abr. 2022. BioExcel. <http://dx.doi.org/10.7573/dic.2022-2-5>.
- LEWIS, Michael D. *et al.* Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 1285-1300, maio 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12297>.
- LEWIS, Michael D.; KELLY, John M.. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 32, n. 11, p. 899-911, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.08.009>.
- LIDANI, Kárita C. F. *et al.* The Complement System: a prey of trypanosoma cruzi. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, p. 1-14, 20 abr. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.
- LIDANI, Kárita Cláudia Freitas *et al.* Chagas Disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers In Public Health**, [S.L.], v. 7, p. 1-13, 2 jul. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.
- LIN, Xuan; FARIDI, Nurul; CASOLA, Claudio. An Ancient Trans-Kingdom Horizontal Transfer of *Penelope*-like Retroelements from Arthropods to Conifers. **Genome Biology And Evolution**, [S.L.], p. 1252-1266, 31 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evw076>.
- LIU, Beiyu *et al.* Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 363-369, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.008>.
- LIU, Haisheng *et al.* Analysis of extracellular vesicle DNA at the single-vesicle level by nano-flow cytometry. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1-17, abr. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jev2.12206>.

LOVO-MARTINS, Maria Isabel *et al.* Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-16, 27 abr. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00896>.

LUKEL, Julius *et al.* Kinetoplast DNA Network: evolution of an improbable structure. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 495-502, ago. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.1.4.495-502.2002>.

MACHADO, Fabiana S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 753-770, 18 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>.

MALKIN, Ethan Z.; BRATMAN, Scott V.. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1-13, jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-02803-4>.

MALTZMAN, Jonathan S.; KORETZKY, Gary A.. Azathioprine: old drug, new actions. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 111, n. 8, p. 1122-1124, 15 abr. 2003. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200318384>.

MAO, Xiaorong *et al.* Inhibitors of PARP-1 exert inhibitory effects on the biological characteristics of hepatocellular carcinoma cells in vitro. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 208-214, jan. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.6568>.

MARCON, Gláucia Barbosa *et al.* *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic brazilian patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 85-91, fev. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000100014>.

MARTIN, Sandra L.. Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. **Rna Biology**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 706-711, nov. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.6.13766>.

MARTINEZ, Felipe *et al.* Chagas Disease and Heart Failure: an expanding issue worldwide. **European Cardiology Review**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 82-88, 11 jul. 2019. Radcliffe Group Ltd. <http://dx.doi.org/10.15420/ecr.2018.30.2>.

MARTINEZ, Santiago J.; ROMANO, Patricia S.; ENGMAN, David M.. Precision Health for Chagas Disease: integrating parasite and host factors to predict outcome of infection and response to therapy. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 8 maio 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00210>.

MASŁOWSKA, Katarzyna H.; MAKIELA-DZBENSKA, Karolina; FIJALKOWSKA, Iwona J.. The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 368-384, 7 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/em.22267>.

MCWILLIAM, Matthew; KHAN, Usman. Azathioprine and the neurologist. **Practical Neurology**, [S.L.], p. 1-7, 23 ago. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/practneurol-2018-002161>.

MEC SIGMA-ALDRICH (MERCK). **Nevirapine**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/phr1757>. Acesso em: 2 mar. 2020.

MEC SIGMA-ALDRICH (MERCK). **Nu 7441**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/sml1416>. Acesso em: 02 fev. 2020.

MEC SIGMA-ALDRICH (MERCK). **Zidovudine**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/z1900000>. Acesso em: 02 mar. 2020.

MEDSTRAND, Patrik; LAGEMAAT, Louie N. Van de; MAGER, Dixie L.. Retroelement Distributions in the Human Genome: variations associated with age and proximity to genes. **Genome Research**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1483-1495, 1 out. 2002. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.388902>.

MEERS, Chance; KESKIN, Havva; STORICI, Francesca. DNA repair by RNA: templated, or not templated, that is the question. **Dna Repair**, [S.L.], v. 44, p. 17-21, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.002>.

MEJIA, Ana Maria *et al.* Benznidazole-Resistance in *Trypanosoma cruzi* Is a Readily Acquired Trait That Can Arise Independently in a Single Population. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 206, n. 2, p. 220-228, 2 maio 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis331>.

MENCK, Carlos Fm; MUNFORD, Veridiana. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging?. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 220-233, 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572014000200008>.

MESSENGER, Louisa A. *et al.* Multiple Mitochondrial Introgression Events and Heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Maxicircle MLST and Next Generation Sequencing. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1584, 10 abr. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001584>.

MIKHED, Yuliya *et al.* Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. **Redox Biology**, [S.L.], v. 5, p. 275-289, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.008>.

MILLER, D. A. *et al.* Tolerance of benznidazole in a United States Chagas Disease Clinic. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 60, n. 8, p. 1237-1240, 18 jan. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ005>.

MITA, Paolo *et al.* BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 179-191, fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-020-0374-z>.

MOREIRA, Lissette Retana; SERRANO, Fernando Rodríguez; OSUNA, Antonio. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes:



induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 1-26, 21 fev. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>.

MORRISH, Tammy A. *et al.* DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 159-165, 13 maio 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng898>.

MOSTAFA-HEDEAB, Gomaa *et al.* A raising dawn of Pentoxifylline in management of inflammatory disorders in Covid-19. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 799-809, 29 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-022-00993-1>.

MURNANE, John P.; FULLER, Lloyd F.; PAINTER, Robert B.. Establishment and characterization of a permanent pSV ori--transformed ataxia-telangiectasia cell line. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 158, n. 1, p. 119-126, maio 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90437-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(85)90437-9).

MUSTELIN, Tomas; UKADIKE, Kennedy C.. How Retroviruses and Retrotransposons in Our Genome May Contribute to Autoimmunity in Rheumatological Conditions. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-21, 13 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.593891>

NAGAJYOTHI, Fnu *et al.* High Fat Diet Modulates *Trypanosoma cruzi* Infection Associated Myocarditis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1-14, 2 out. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003118>.

NAGAJYOTHI, Fnu *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 634-643, 24 fev. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x>.

NAUFER, M. Nabuan *et al.* L1 retrotransposition requires rapid ORF1p oligomerization, a novel coiled coil-dependent property conserved despite extensive remodeling. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 281-293, 15 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1342>.

NITZ, Nadjar *et al.* [RETRACTED] Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. **Cell**, [S.L.], v. 118, n. 2, p. 175-186, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.001>.

OFIR-BIRIN, Yifat; REGEV-RUDZKI, Neta. Extracellular vesicles in parasite survival. **Science**, [s.l.], v. 363, n. 6429, p.817-818, 21 fev. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aau4666>.

ONO, Ryuichi *et al.* Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. **Communications Biology**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-8, 8 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-019-0300-2>.

PATEL, Parth; ZULFIQAR, Hassam. Reverse Transcriptase Inhibitors. [Updated 2022 May 8]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551504/>. Acesso em: 02 de fev. 2022.

PERDOMO, Doranda; BONHIVERS, Mélanie; ROBINSON, Derrick. The Trypanosome Flagellar Pocket Collar and Its Ring Forming Protein—TbBILBO1. **Cells**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 9, 2 mar. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells5010009>.

PÉREZ, José Luis García; ALARCÓN-RIQUELME, Marta E.. The TREX1 Dinosaur Bites the Brain through the LINE. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 287-288, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.010>.

PÉREZ-MAZLIAH, Damián; WARD, Alexander I.; LEWIS, Michael D.. Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 1-16, 24 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12786>.

PERKHOFER, Lukas *et al.* DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives. **Gut**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 606-617, 27 ago. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319984>.

PERONE D. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TcrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody. **Parasitology**. 2003 Jun;126(Pt 6):577-83. PMID: 12866796.

PORTUGEZ, Shir; MARTIN, William F.; HAZKANI-COVO, Einat. Mosaic mitochondrial-plastid insertions into the nuclear genome show evidence of both non-homologous end joining and homologous recombination. **Bmc Evolutionary Biology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-10, 3 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-018-1279-x>.

PUERTAS, María J.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Mónica. Insertions of mitochondrial DNA into the nucleus—effects and role in cell evolution. **Genome**, [S.L.], v. 63, n. 8, p. 365-374, ago. 2020. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/gen-2019-0151>

PULZOVÁ, Lucia Borszéková; WARD, Thomas A.; CHOVANEC, Miroslav. XPA: DNA repair protein of significant clinical importance. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 2182, 22 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21062182>.

RAGU, Sandrine; MATOS-RODRIGUES, Gabriel; LOPEZ, Bernard S.. Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. **Genes**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 409, 9 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11040409>.

RAI, Sudhir Kumar *et al.* Host factors that promote retrotransposon integration are similar in distantly related eukaryotes. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 1006775, 12 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006775>.

RAJENDRAN, Praveen *et al.* Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. **Clinical Epigenetics**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-23, 26 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1868-7083-3-4>.

RAMÍREZ-TOLOZA, Galia; FERREIRA, Arturo. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: the specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, p. 1-13, 1 set. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>.

RAMOS, Thiago Cesar Prata; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, Edna; SCHENKMAN, Sergio. Three-dimensional reconstruction of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and organelle distribution along the cell division cycle. **Cytometry Part A**, [S.L.], v. 79, n. 7, p. 538-544, 12 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21077>.

REQUENA, Jose M. *et al.* Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 271-280, abr. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90077-w](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(92)90077-w).

REQUENA-MÉNDEZ, Ana *et al.* Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 0003540, 13 fev. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>.

RIBEIRO, Marcelle *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 162, p. 1-6, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.017>.

RIOS, Adriano *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 3-8, jan. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170025>.

RISS, Terry L; A MORAVEC, Richard; NILES, Andrew L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, Bethesda, p.1-25, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 27 fev. 2022.

ROBBINS, Paul D.; MORELLI, Adrian E.. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 195-208, 25 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3622>.

RODELES, Luz M *et al.* Combined analysis of cross-reacting antibodies anti-β1AR and anti-B13 in advanced stages of Chagas heart disease. **Tropical Medicine & International Health**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 1545-1551, 24 out. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12791>.

ROOS, Wynand Paul; KRUMM, Andrea. The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, p. 10017-10030, 13 out. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw922>.

ROPERO, Santiago; ESTELLER, Manel. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Molecular Oncology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 19-25, 7 mar. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.001>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 3<sup>a</sup> ed. 2001.

SANSONE, Pasquale *et al.* Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 114, n. 43, p. 9066-9075, 11 out. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1704862114>.

SANTA, Pauline *et al.* The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-25, 26 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.629922>.

SANTOS-BUCH, Charles A.; TEIXEIRA, Antonio R. L.. THE IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 140, n. 1, p. 38-53, 1 jul. 1974. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.140.1.38>.

SARAVOLATZ, Louis D.; SAAG, Michael S.. Emtricitabine, a New Antiretroviral Agent with Activity against HIV and Hepatitis B Virus. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 126-131, 1 jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/498348>.

SCHÖBEL, Anja *et al.* Hepatitis C virus infection restricts human LINE-1 retrotransposition in hepatoma cells. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 1-38, 19 abr. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009496>.

SCHULTHEIß, Christoph *et al.* B cells in autoimmune hepatitis: bystanders or central players? **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], p. 1-17, 29 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-022-00937-5>.

SCIAMANNA, Ilaria; LUCA, Chiara de; SPADAFORA, Corrado. The Reverse Transcriptase Encoded by LINE-1 Retrotransposons in the Genesis, Progression, and Therapy of Cancer. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 4, p. 1-10, 11 fev. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2016.00006>

SEN, Shurjo K. *et al.* Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 35, n. 11, p. 3741-3751, 21 maio 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm317>.

SHIBATA, Atsushi; JEGGO, Penny A.. ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. **Genes**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 1370, 31 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes12091370>.

SIEBER, Karsten B.; BROMLEY, Robin E.; HOTOPP, Julie C. Dunning. Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 358, n. 2, p. 421-426, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.009>.

SILBERSTEIN, Erica *et al.* A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1-21, 19 abr. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195879>.

SILVA, Marcelo S. da; MCCULLOCH, Richard; CANO, Maria Isabel N.. Editorial: nuclear genome stability. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 10, p. 1-5, 10 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.875749>.

SMITH, Joanne; THO, Lye Mun; XU, Naihan; GILLESPIE, David A.. The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. **Advances In Cancer Research**, [S.L.], p. 73-112, 2010. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-380888-2.00003-0>.

SIMÕES-BARBOSA, Augusto *et al.* Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 101, n. 8, p. 833-843, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762006000800003>.

SIMÕES-BARBOSA, Augusto *et al.* Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 249-252, set. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761999000700041>.

SISQUELLA, Xavier *et al.* Malaria parasite DNA-harboured vesicles activate cytosolic immune sensors. **Nature Communications**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-15, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02083-1>.

SLADE, Dea. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, [S.L.], v. 34, n. 5-6, p. 360-394, 6 fev. 2020. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.334516.119>.

SMITH, Joanne *et al.* The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. **Advances In Cancer Research**, [S.L.], p. 73-112, 2010. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-380888-2.00003-0>.

SOUICY, Shannon M.; HUANG, Jinling; GOGARTEN, Johann Peter. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 472-482, 17 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3962>.

SWINDALL, Amanda; STANLEY, Jennifer; YANG, Eddy. PARP-1: friend or foe of DNA damage and repair in tumorigenesis?. **Cancers**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 943-958, 26 jul. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers5030943>.

TANOWITZ, Herbert B *et al.* Adipose Tissue: a safe haven for parasites?. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 276-284, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.008>.

TARLETON, Rick L.. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 233-238, 29 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>.

TAYLOR, Sean C *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 761-774, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>.

TEIXEIRA, Antonio R. *et al.* Pathogenesis of Chagas' Disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 592-630, jul. 2011b. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00063-10>.

TEIXEIRA, Antonio R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: chagas-like heart disease in the absence of parasitism. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 1-18, 29 mar. 2011a. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001000>.

TEIXEIRA, Antonio R.L *et al.* Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 305, n. 2, p. 197-209, mar. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90240-2](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(94)90240-2).

TEIXEIRA, Antonio R.L. *et al.* Inserção de DNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de célula hospedeira de mamífero por meio de infecção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 55-58, mar. 1991. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86821991000100010>.

TEIXEIRA, Santuza M. *et al.* Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 1-17, 20 jan. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572012005000008>.

THERON, T. *et al.* The role of G2-block abrogation, DNA double-strand break repair and apoptosis in the radiosensitization of melanoma and squamous cell carcinoma cell lines by pentoxifylline. **International Journal Of Radiation Biology**, [S.L.], v. 76, n. 9, p. 1197-1208, jan. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09553000050134438>.

THOMAS, Charles A *et al.* Modeling of TREX1-Dependent Autoimmune Disease using Human Stem Cells Highlights L1 Accumulation as a Source of Neuroinflammation. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 319-331, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.009>.

THOMAS, Huw D *et al.* Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 945-956, 1 mar. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0552>.

THOMAS, Jainy *et al.* Transposons Catalyze Genomic Innovation in a Mammalian Lineage. **Genome Biology And Evolution**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 2595-2610, 14 set. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu204>.

THOMAS, Jainy; PRITHAM, Ellen J.. Helitrons , the Eukaryotic Rolling-circle Transposable Elements. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 1-32, 2 jul. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0049-2014>.

TOMLINSON, S *et al.* The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, [S.L.], v. 110, n. 5, p. 547-554, jun. 1995. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182000065264>.

TORRECILHAS, Ana Claudia *et al.* Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: host cell communication. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-16, 14 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.602502>.

TRASVIÑA-ARENAS, Carlos H *et al.* Evolution of Base Excision Repair in *Entamoeba histolytica* is shaped by gene loss, gene duplication, and lateral gene transfer. **DNA Repair**, [S.L.], v. 76, p. 76-88, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.02.009>.

TROCHINE, Andrea *et al.* *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benznidazole. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 140, p. 33-38, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.013>.

TSUJI, Junko; FRITH, Martin C.; TOMII, Kentaro; HORTON, Paul. Mammalian NUMT insertion is non-random. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 40, n. 18, p. 9073-9088, 3 jul. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks424>.

TURNELL, Andrew S.; GRAND, Roger J.. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 93, n. 10, p. 2076-2097, 1 out. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.044412-0>.

USACH, Iris; MELIS, Virginia; PERIS, José-Esteban. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability. **Journal Of The International Aids Society**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 18567, jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.7448/ias.16.1.18567>.

VACANI-MARTINS, Natalia *et al.* The Liver and the Hepatic Immune Response in *Trypanosoma cruzi* Infection, a Historical and Updated View. **Pathogens**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1074, 25 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10091074>.

VALADARES, Marize Campos; CASTRO, Núbia Cristiana de; CUNHA, Luiz Carlos da. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao dna de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 631-638, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322007000400017>.

VAN ETTEN, Julia; BHATTACHARYA, Debashish. Horizontal Gene Transfer in Eukaryotes: not if, but how much?. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 915-925, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.006>.

VAN OVERTVELT, Laurence *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: inhibition of cytokines, hla-dr, and costimulatory molecules. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 67, n. 8, p. 4033-4040, ago. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.67.8.4033-4040.1999>.

VAN VOORHIS, W C *et al.* FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. **Journal Of**

**Experimental Medicine**, [S.L.], v. 178, n. 2, p. 681-694, 1 ago. 1993. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.2.681>.

VEGA, María Celeste *et al.* Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 58, p. 214-227, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.009>.

WANG, Binhui *et al.* In Vitro Study of Thrombin on Tubule Formation and Regulators of Angiogenesis. **Clinical And Applied Thrombosis/Hemostasis**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 674-678, 8 mar. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1076029609354332>.

WANG, Dong *et al.* Transcription of Nuclear Organellar DNA in a Model Plant System. **Genome Biology And Evolution**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1327-1334, 27 maio 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu111>.

WANG, Manni; CHEN, Siyuan; AO, Danyi. Targeting DNA repair pathway in cancer: mechanisms and clinical application. **Medcomm**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 654-691, dez. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mco2.103>.

WANG, Zai *et al.* Single-stranded oligonucleotide-mediated gene repair in mammalian cells has a mechanism distinct from homologous recombination repair. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 350, n. 3, p. 568-573, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.078>.

WEIGEL, Guenter *et al.* Azathioprine and 6-Mercaptopurine Alter the Nucleotide Balance in Endothelial Cells. **Thrombosis Research**, [S.L.], v. 94, n. 2, p. 87-94, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848\(98\)00199-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848(98)00199-6).

WEN, J *et al.* Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 10, n. 10-11, p. 1201-1209, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.06.013>.

WESLEY, Moisés *et al.* Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-16, 21 ago. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01856>.

WILKINSON, Shane R. *et al.* Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 16, p. 2072-2084, 1 ago. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156802611796575894>.

WILLIAMS, Ashley B.; SCHUMACHER, Björn. P53 in the DNA-Damage-Repair Process. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1-15, 5 abr. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease** (American trypanosomiasis). <[http:// https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](http://https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1) >. Acesso em 04 de maio de 2022.



WU, Zhenyu *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-16, 15 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.03066>.

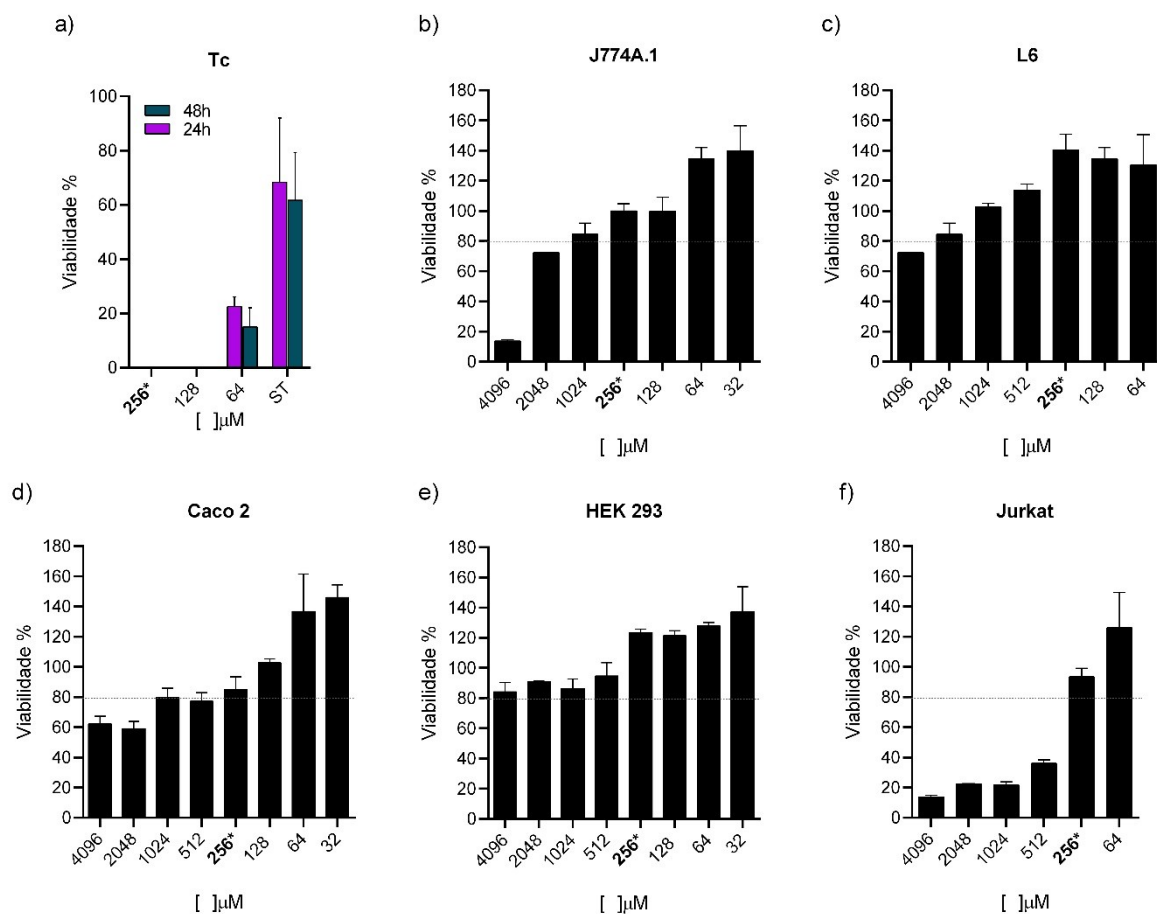
YÁÑEZ-MÓ, María *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 27066, 1 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.

YIN, Ying *et al.* Exogenous Coronavirus Interacts With Endogenous Retrotransposon in Human Cells. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-11, 25 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.609160>.

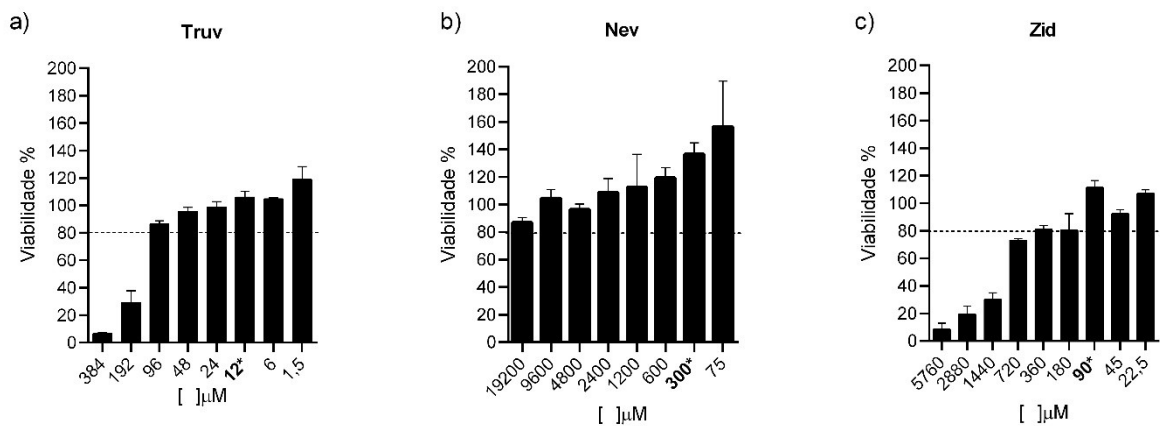
YU, W. *et al.* Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 466-477, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>.

ZHANG, Xiao; ZHANG, Rui; YU, Jinpu. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 8, p. 1-10, 7 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00657>.

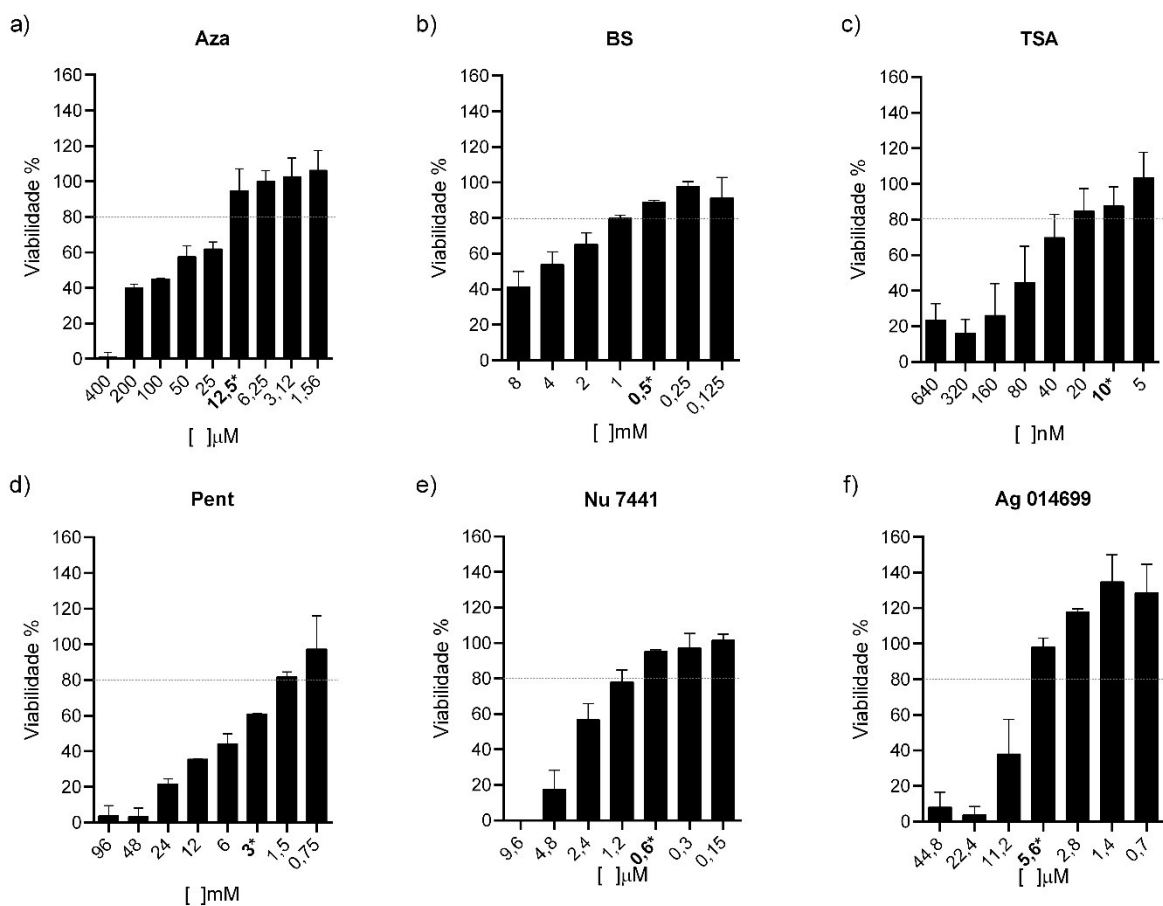
## ANEXO I



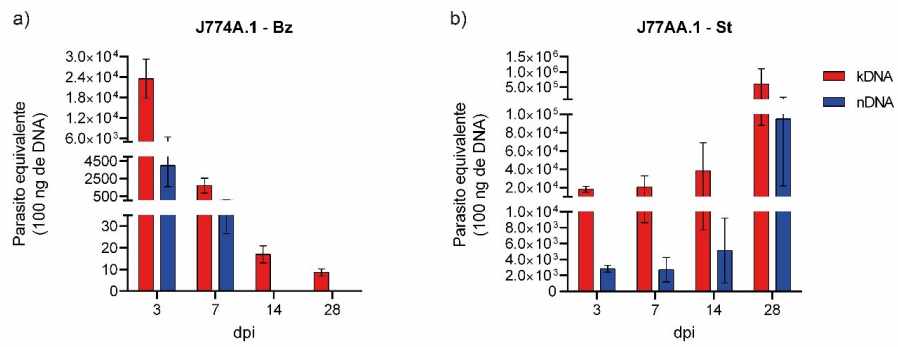
**Figura S1. Atividade tripanocida do Bz sobre o *T. cruzi* e teste de toxicidade do Bz sobre as células.** (a) Atividade do Bz sobre o parasita. O Bz eliminou o parasita completamente a partir de 128  $\mu$ M. (b) Toxicidade do Bz sobre macrófagos J774. (c) Toxicidade do Bz sobre células L6. (d) Toxicidade do Bz sobre células Caco 2. (e) Toxicidade do Bz sobre células HEK 293. (f) Toxicidade do Bz sobre células Jurkat. \*Concentração escolhida.



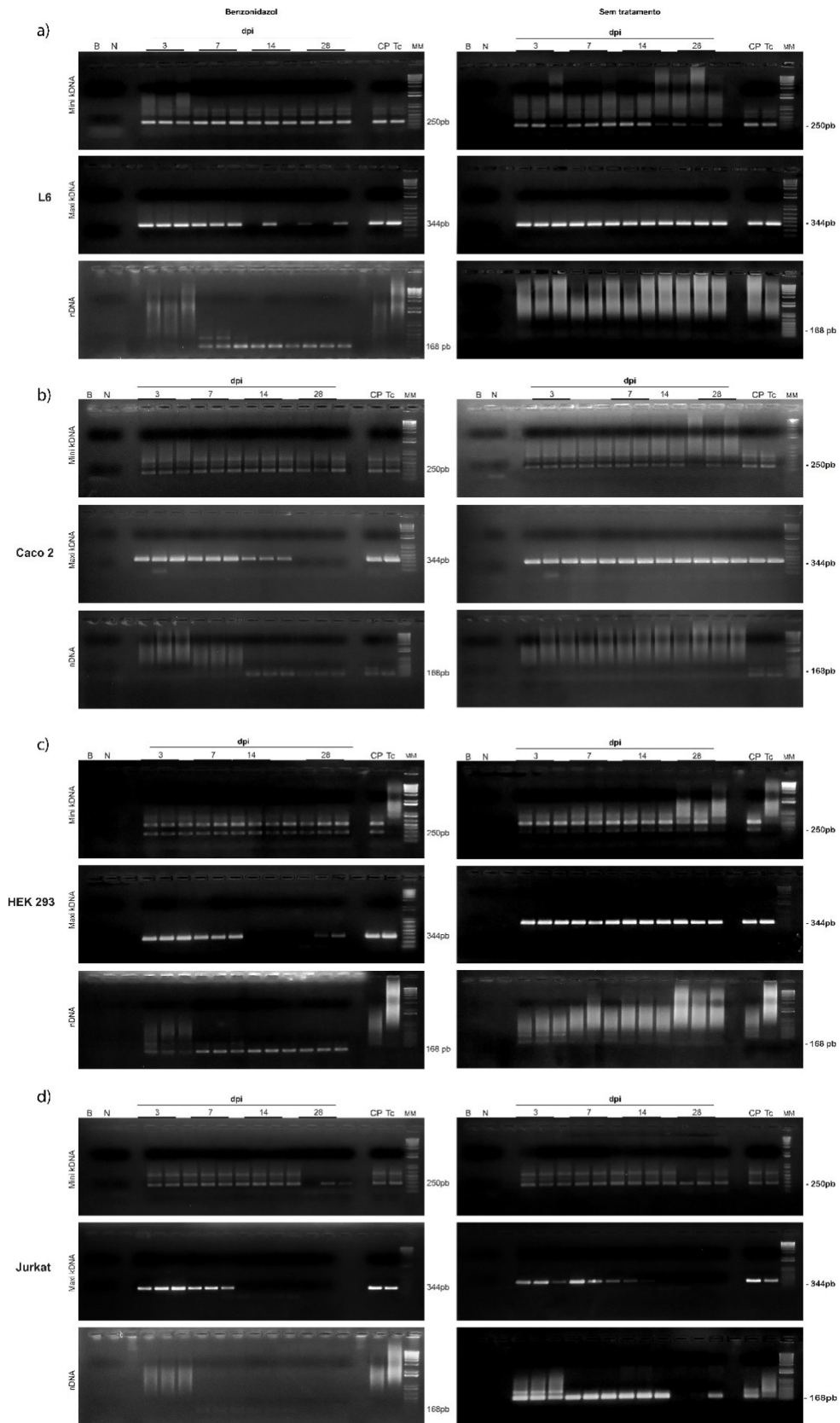
**Figura S2. Toxicidade do iTR sobre células HEK 293 (a) Truvada. (b) Nevirapina. (c) Zidovudina. \*Concentração escolhida.**



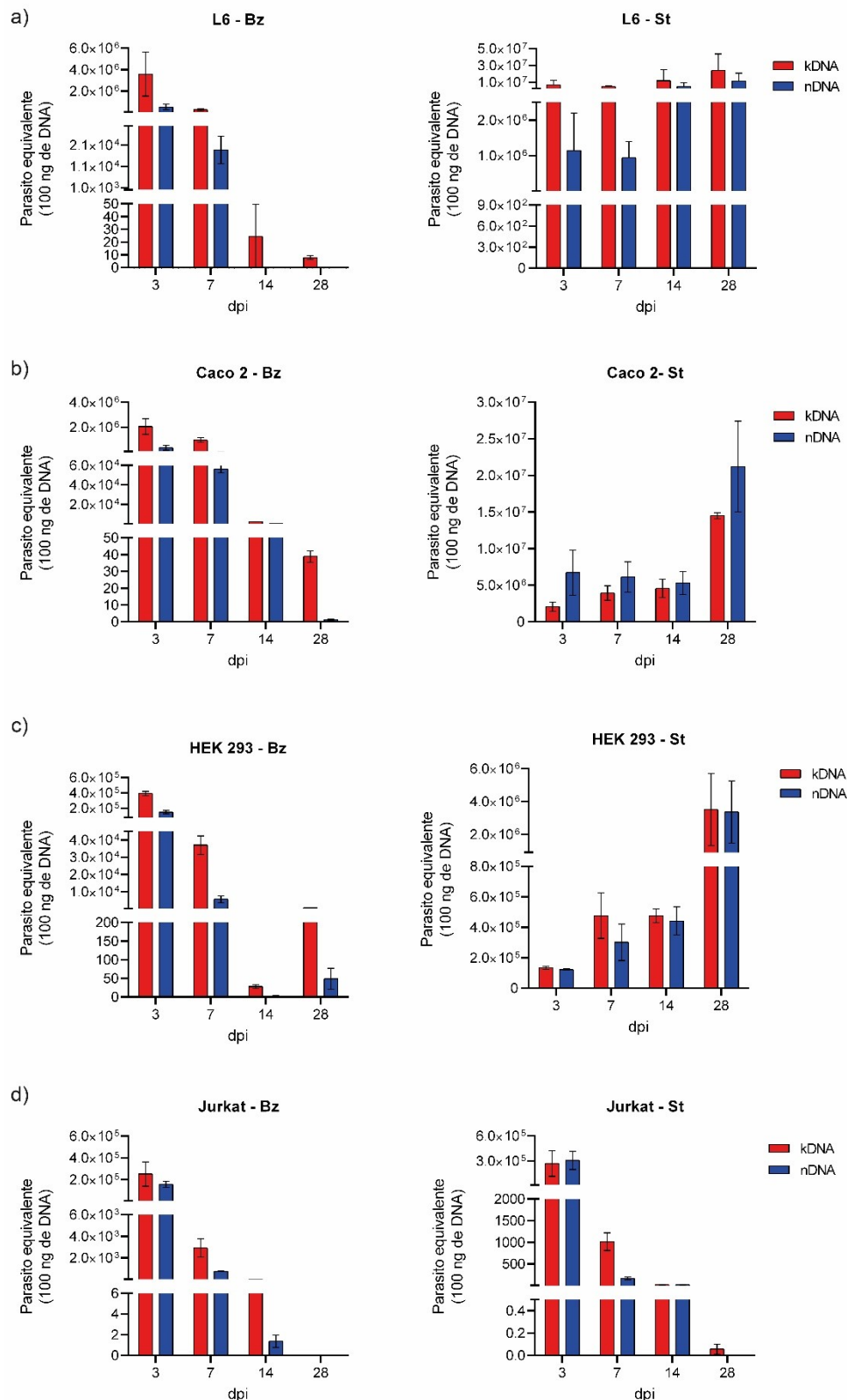
**Figura S3. Toxicidade dos inibidores de síntese de purina, vias de reparo do DNA e HDAC sobre as células HEK 293 (a) Azatioprina. (b) Butirado de Sódio; (c) Trichostatina; (d) Pentoxifilina; (e) Nu 7441 e (f) Ag 014699. \*Concentração escolhida.**



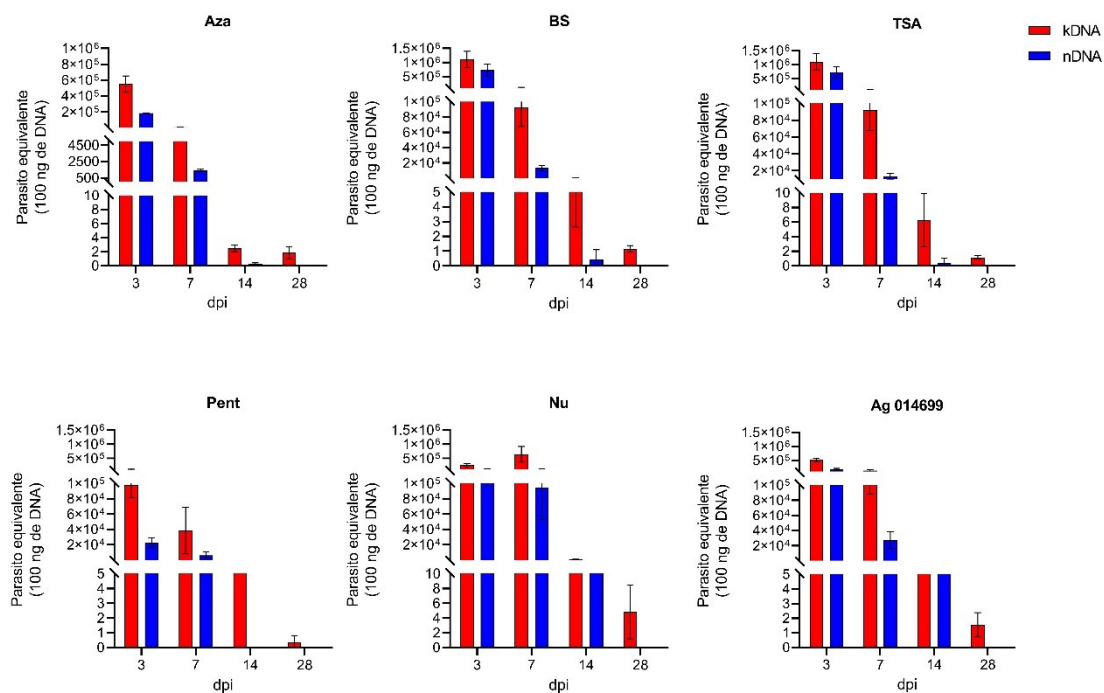
**Figura S4. Quantificação absoluta de kDNA e nDNA de macrófagos J774A.1.** (a) J774 infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com Bz durante 28 dias após infecção. (b) J774A.1 infectadas com *T. cruzi* Berenice sem tratamento durante 28 dias após infecção.



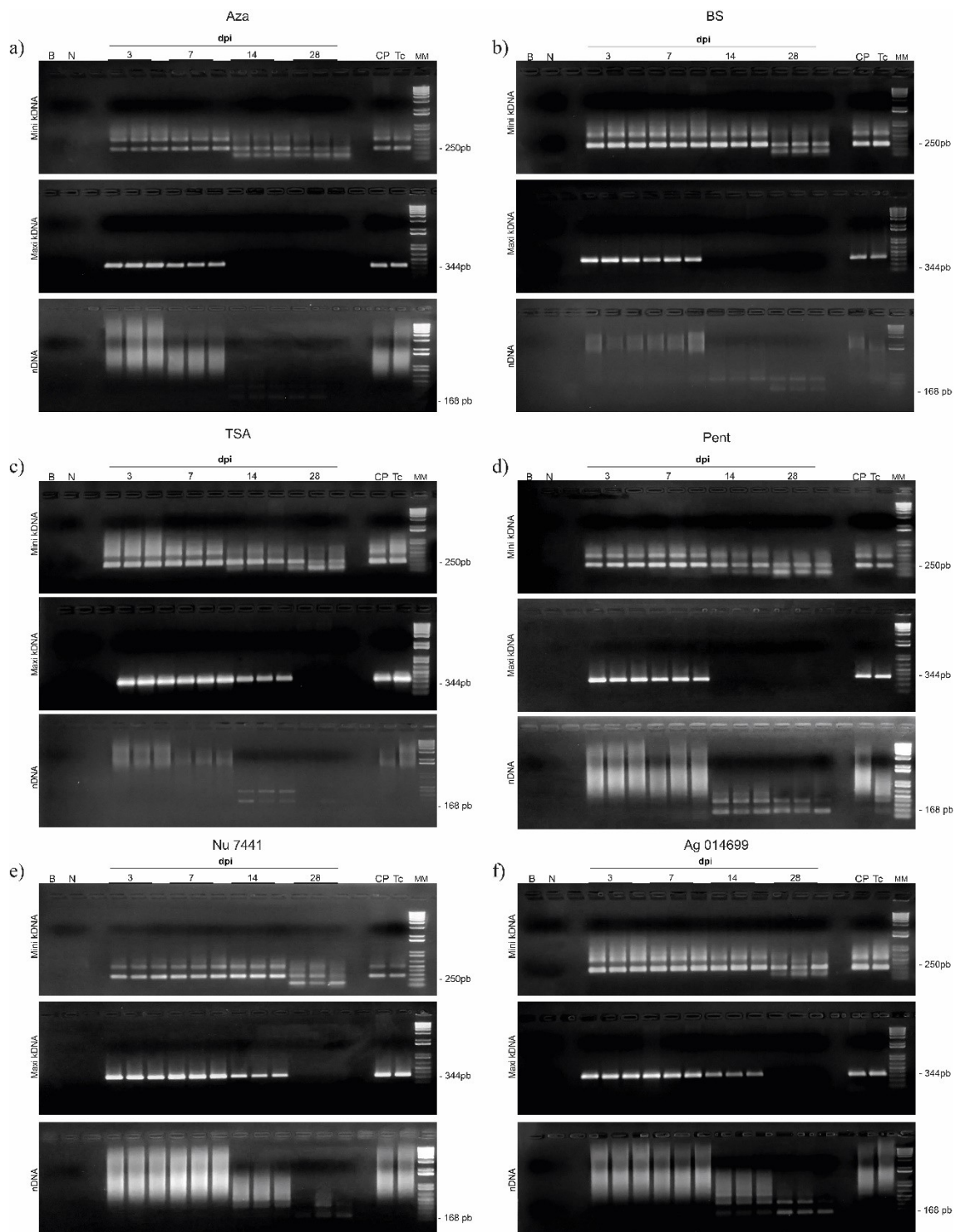
**Figura S5. Eletroforese em gel de agarose do produto PCR das células L6, Caco 2, HEK 293 e Jurkat. (a)** L6 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (b) Caco 2 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (c) HEK 293 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (d) Linfócitos T infectados com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). Abreviação: Bz, benzimidazol; St, Sem tratamento.



**Figura S6.** Quantificação absoluta de minikDNA e nDNA das células L6, Caco 2, HEK 293 e Jurkat.. (a) Caco 2 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (b) L6 infectados com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (c) HEK 293 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). (d) Linfócitos T infectados com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz (à esquerda) e St (à direita). c Abreviação: Bz, benznidazol; St, Sem tratamento.

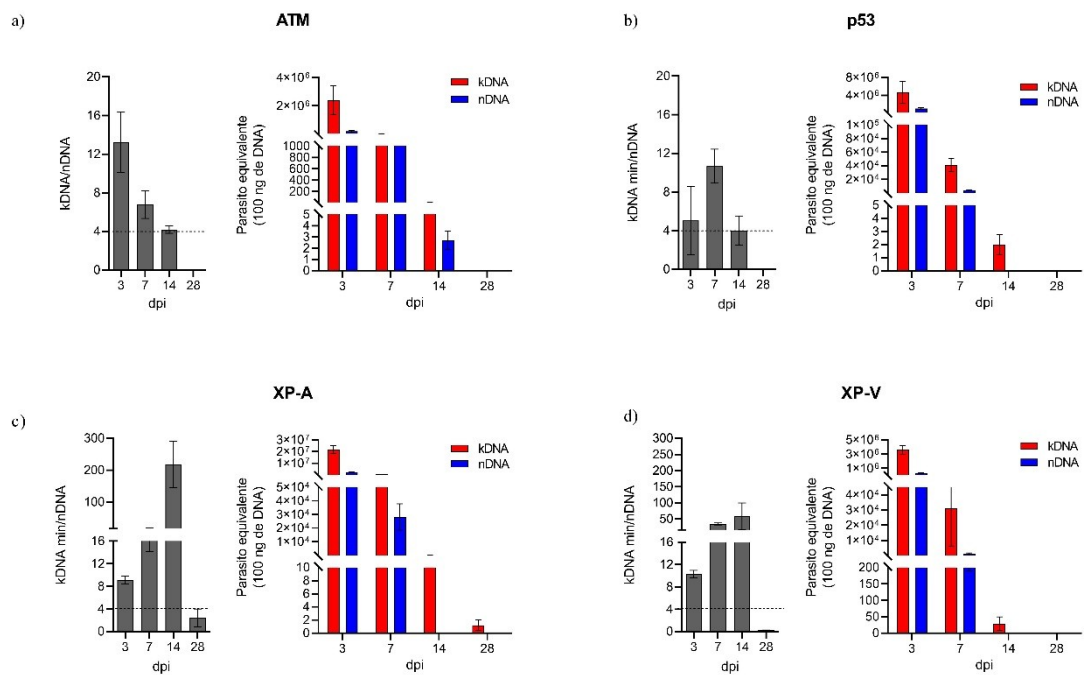


**Figura S7.** Quantificação absoluta de kDNA e nDNA células HEK 293 infectadas e tratadas com Bz e com inibidores de vias de reparo de DNA, inibidores de HDAC e inibidor de sítios de purinas. Azatioprina (Aza); Butirato de Sódio (BS); Trichostatina (TSA); Pentoxifilina (Pent); Nu 7441 (Nu); Ag 014699.

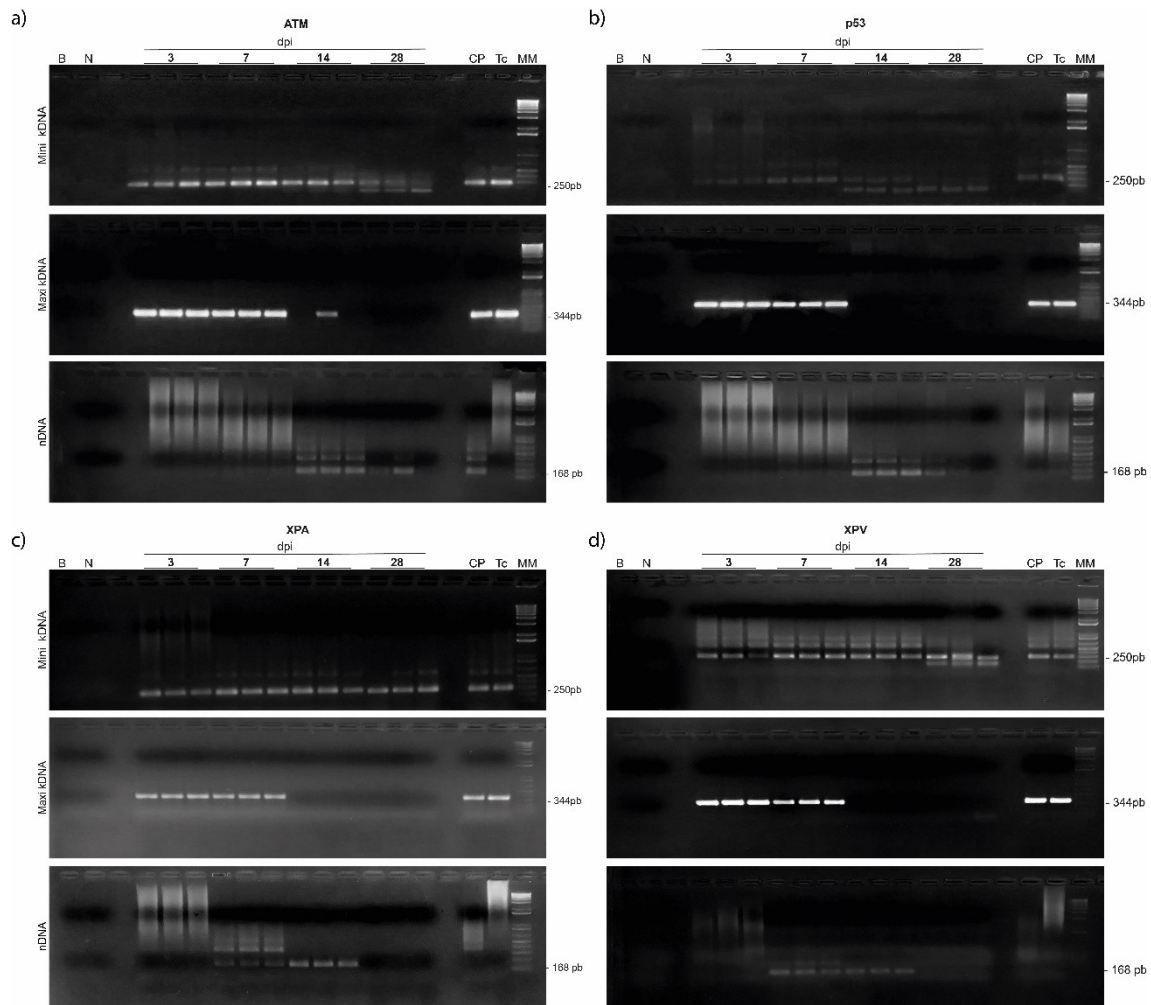


**Figura S8.** Eletroforese em gel de agarose do produto PCR de células HEK 293 infectadas e tratadas com Bz e com inibidores de vias de reparo de DNA, inibidores de HDAC e inibidores de sítios de purinas. (a) Células tratadas com Azatioprina (Aza); (b) Células tratadas com Butirato de Sódio (BS); (c) Células tratadas com Trichostatina (TSA); (d) Células tratadas com Pentoxifilina (Pent); (e) Células tratadas com Nu 7441; (f) Células tratadas com Ag 014699.





**Figura S9.** Razão mini kDNA/nDNA e quantificação absoluta de mini kDNA e nDNA de células *knockdown* tratadas com benznidazol.



**Figura S10. Eletroforese em gel de agarose do produto PCR de células *knockdown*.** (a) Células *knockdown* para o gene ATM infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz. (b) Células *knockdown* para o gene p53 infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz. (c) Células *knockdown* para o gene XPA infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz. (d) Células *knockdown* para o gene XPV infectadas com *T. cruzi* Berenice tratadas com Bz

**Tabela S1.** Média da razão mini kDNA/nDNA, desvio padrão e valor de P das células HEK 293, infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com inibidores.

Tipo Celular	TTO	Dia Experimental								P valor
		3		7		14		28		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
HEK	St	1.10	0.04	1.61	0.19	1.12	0.29	1.03 <sup>a</sup>	0.29	ns
	Bz	2.69 <sup>1</sup>	0.53	6.83 <sup>2</sup>	1.25	8.09 <sup>3</sup>	0.81	30.71 <sup>123a</sup>	18.35	<0.0001
	Aza	2.98	0.47	5.39	6.74	13.48	1.14	3.75	1.72	ns
	BS	2.25	0.52	4.05	0.79	17.17	0.30	5.30	2.02	ns
	TSA	1.52	0.08	6.89	1.38	11.32	5.21	2.30	0.44	ns
	Pent	4.52	1.03	6.16	1.11	26.76	4.02	1.20	1.03	ns
	Nu	2.34	0.34	5.33	1.73	5.91	1.41	13.06	6.03	ns
	Ag	3.02	0.60	4.82	0.55	5.69	0.77	3.10	1.67	ns
	Truv	2.41	1.27	4.67	0.82	153.6*	87.28	3.22	2.13	<0.0001
	Nev	1.29	0.16	4.43	0.68	23.16	1.39	2.28	1.42	ns
Zid	4.48	0.39	4.19	1.07	3.11	0.59	1.20	0.93		
p valor		ns		ns		<0.0001		ns		

\* Difere pelo teste de Tukey ( $p < 0.0001$ ) das demais amostras comparando tanto as amostras na coluna 14 dpi, levando em consideração os diferentes grupos de TTO, quanto as amostras da linha, levando em consideração tempo dentro do mesmo TTO. <sup>a</sup> Diferem entre si ( $p < 0.0001$ ). Números (1, 2, 3) diferem entre si considerando o tempo pós-infecção. Aza, Azatioprina; BS, Butirato de Sódio; TSA, Trichostatina; Pent, pentoxifilina; Nu, Nu 7441; Ag, Ag 014699; Truv, Truvada; Nev, Nevirapina; Zid, Zidovudina; TTO, tratamento; Bz, grupo tratado com benznidazol, St, grupo sem tratamento; DP, desvio padrão. Teste de Tukey.

