



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



Herança de sequencias de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi*

Aluno: CARLOS FERNANDO DA ROCHA PIMENTEL

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO RAIMUNDO LIMA CRUZ TEIXEIRA

Co-orientadora: Prof. Dr^a NADJAR NITZ LOCIKS DE ARAUJO

BRASILIA-DF

2012

Carlos Fernando da Rocha Pimentel

**Herança de sequencias de minicírculos de kDNA
integradas no genoma de células germinativas com
persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi***

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

BRASILIA, JULHO DE 2012

Trabalho de dissertação de Mestrado realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq/ FAP DF

DEDICATORIA

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”

Francesco Alberoni

A Deus, pela sua presença constante ao meu lado e a tudo que me proporcionou desde o momento em que fui concebido.

Aos meus queridos pais, que sempre acreditaram em meu potencial, pela presença constante em minha vida e pelo amor que dedicam a mim.

Ao meu amado filho Luis Gustavo, o qual trouxe muito mais brilho e alegria a minha vida.

A toda minha família, pelo apoio, carinho, amizade e união.

AGRADECIMENTOS

“O quão feliz é uma pessoa depende da profundidade de sua gratidão.”

John Miller

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Teixeira, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela confiança e pelos ensinamentos embasados na sua vasta experiência.

À minha co-orientadora Prof. Dr^a, Nadjar Nitz, pela ajuda imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

À Mariana Hetch, que teve uma participação significativa para o desenvolvimento deste estudo.

À Perla Fabíola de Araújo pelas dicas e conselhos durante a realização dos experimentos.

Aos amigos, Ciro, Alessandro e Marol pela ajuda de grande importância na realização de meus últimos experimentos.

Aos amigos feitos e colegas, Ester, Luciana, Manuela, Ciro, Marol, Alessandro, Adriano, Rafael, Bruno, Osmar, Aninha, Fernanda, Ronaldo, Carol, Perla, Rose, Adriana, Liliane e Tamires pela amizade e carinho.

A todos os estagiários que passaram pelo laboratório, em especial, Jaqueline e Marcelle, pelas inúmeras caixas de ponteiras preenchidas.

Aos funcionários do LMPDC: Miguel, Eliete, Seu Geraldo e Cássia pela cumplicidade e carinho.

Aos meus pais que deram todo o suporte para que eu pudesse realizar este trabalho com tranquilidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da doença de Chagas no Brasil.....	15
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no homem e em mamíferos..	20
Figura 3. O DNA mitocondrial.....	21
Figura 4. Estrutura do minicírculo.....	22
Figura 5. Estrutura dos elementos transponíveis	27
Figura 6. Regiões de obtenção dos <i>primers</i> utilizados na <i>tp</i> TAIL-PCR.....	41
Figura 7. <i>Southern Blot</i> dos produtos da PCR de nDNA	48
Figura 8. <i>Southern Blot</i> dos produtos da PCR de kDNA	49
Figura 9. Heredograma da família A	51
Figura 10. Heredograma da família B	52
Figura 11. Heredograma da família C	53
Figura 12. Heredograma da família D	54
Figura 13. <i>Southern blot</i> dos produtos da <i>tp</i> TAIL-PCR	56
Figura 14. Evento de integração de minicírculo de kDNA do <i>T. cruzi</i> no genoma de um paciente chagásico.....	58
Figura 15. Evento de integração de minicírculo de kDNA do <i>T. cruzi</i> no sítio preferencial do cromossomo X.....	60
Figura 16. Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA do <i>T. cruzi</i> no genoma dos pacientes analisados.....	61
Figura 17. integração de minicírculo de kdna no genoma do paciente 101, clone FH-255.....	62
Figura 18. Formação de ORF quimérica putativa no clone FH-102 proveniente do paciente 1669.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR	37
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de <i>tpTAIL</i> PCR	39
Tabela 3. Identificação das infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por PCR usando <i>primers</i> específicos para nDNA e kDNA nas cinco famílias do estudo.	46
Tabela 4. Identificação das infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> com PCR usando primers específicos para nDNA e kDNA em casos suspeitos e doença de Chagas aguda, mas não agrupados em famílias.	47
Tabela 5. Amplificação do nDNA e do kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> na amostragem do estudo.....	50
Tabela 6. Rendimento das <i>tpTAIL'S</i> PCR.....	57
Tabela 7. Distribuição das integrações de sequências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos cromossomos de células haploides de adultos	59
Tabela Suplementar 1. Integrações de minicírculos de kDNA no genoma de células do sêmen de indivíduos chagásicos.....	84
Tabela Suplementar 2. Formação de novas ORF's quimericas putativas decorrentes da integração de minicírculos de kDNA no genoma de células do sêmen de indivíduos chagásicos.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
³² P	Isótopo radioativo fósforo-32
A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSBs	<i>Conserved Sequence Blocks</i>
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	Di-tiltreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ERV	<i>Endogenous retrovirus</i>
G	Guanina
g	Grama
gRNA	RNA guia
kDNA	DNA do cinetoplasto
LINE	<i>Long Interspersed (nuclear) Element</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nDNA	DNA de origem nuclear
ng	Nanograma
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PB	Pares de base
PBS	Tampão fostato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RefSeq	<i>Reference sequence</i>
RNA	Ácido ribonucleico
S	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Tampão salino citrato de sódio
SSPE	Tampão salino sulfato de sódio – EDTA
TAIL-PCR	<i>Thermal Asymmetric InterLaced PCR</i>
TGL	Transferência gênica lateral
TGV	Transferência gênica vertical
<i>TpTAIL-PCR</i>	<i>targeting primer Thermal Asymmetric InterLaced-PCR</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade internacional
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v/v	Volume/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
μ g	Micrograma

INDICE

I. INTRODUÇÃO	15
1. A DOENÇA DE CHAGAS.....	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2 VIAS DE TRANSMISSÃO	16
1.3 DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA	17
1.4 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	19
1.4.1 O DNA DO CINETOPLASTO	20
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	22
1.6 DIAGNÓSTICO	23
1.7 PATOGÊNESE.....	25
2. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	25
2.1 CARACTERÍSTICAS DOS RETROTRANSPÓSONS	27
3. TRANSFERÊNCIA DE DNA E EVOLUÇÃO.	29
3.1 TRANSFERÊNCIA LATERAL DE DNA.....	30
4. INTEGRAÇÃO DO κDNA DE <i>T. CRUZI</i> NO GENOMA DO HOSPEDEIRO.	31
II. OBJETIVOS.....	33
III. MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRAGEM DO ESTUDO	33
2. EXTRAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS GERMINATIVAS.....	35

2.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>T. CRUZI</i>	35
2.2 EXTRAÇÃO DE κDNA	36
3. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	36
4. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR).....	37
5. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES FLANQUEADORAS DO κDNA DE <i>T. CRUZI</i> INTEGRADO NO GENOMA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS.....	38
6. SOUTHERN BLOT DOS PRODUTOS DE PCR.....	42
6.1 MARCAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS.....	43
6.2 PURIFICAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS.....	43
6.3 PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO.....	44
7. CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO EM <i>E. COLI</i> COMPETENTE.....	44
7.1 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR.....	44
7.2 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES	44
7.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i>	44
7.4 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES DE <i>E. COLI</i>	45
7.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	45
8. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES E ANÁLISE EM BANCO DE DADOS	45
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
1. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA.....	46
2. ESTUDO DAS FAMÍLIAS	50

3. IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE MINICÍRCULOS DE κDNA INTEGRADAS NO GENOMA DE CÉLULAS GERMINATIVAS	55
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS QUE FLANQUEARAM AS INTEGRAÇÕES DE κ DNA NO GENOMA HUMANO.....	60
4. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE NOVAS ORF'S (FASES DE LEITURA ABERTA)	62
V. CONCLUSÕES.....	65
VI. PERSPECTIVAS.....	66
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO I.....	81
ANEXO II.....	82
ANEXO III.....	83
ANEXO IV	84
ANEXO V	94
ANEXO VI	100

RESUMO

Este estudo é parte de linha de pesquisa do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que visa ao mapeamento das integrações de sequências de minicírculos de DNA mitocondrial (kDNA) de *Trypanosoma cruzi* em famílias de residentes em diferentes ecossistemas brasileiros. Nesta dissertação foram analisados sêmens de 53 adultos de dois municípios do Estado do Pará. O trabalho foi conduzido para identificar e caracterizar os sítios de integração das mutações de kDNA em células do sêmem e determinar a presença do DNA nuclear (nDNA) do *T. cruzi* em adultos na idade reprodutiva. Foram analisadas amostras de DNA do sêmen de 53 homens. Os testes PCR mostraram que em 44 amostras (83%) havia nDNA. Em mais quatro amostras (48/53) os testes PCR revelaram amplicons de kDNA parasita. Estes quatro últimos sugerem que as sequências de minicírculos poderiam estar integradas ao genoma de pessoas sem a infecção ativa pelo *T. cruzi*. Então, a técnica *tp*TAIL-PCR foi usada para caracterizar as mutações de kDNA nos cromossomos das células analisadas. Foram encontradas 142 mutações no genoma de 38 indivíduos (72%) do estudo. Essas mutações foram localizadas (56,6%) em LINE-1 dispersos nos genomas. Ademais, verificou-se que 32,5% dessas mutações achavam-se no *locus* AL7313741.4 de LINE-1, no cromossomo X. Apenas nove eventos de integração de kDNA ocorreram em regiões codificadoras do genoma. Entre essas, encontram-se mutações em genes de quinases, receptor olfatório e em outros sítios não determinados. Em 24 casos (16,8%) o kDNA ligado ao LINE-1 estava acompanhado de fragmento de sequência de DNA retroviral, sugerindo recombinação e “hitchhiking”. De grande interesse, os resultados sugerem a possibilidade de transmissão da infecção por 83% dos homens que tem o nDNA do *T. cruzi* no sêmen e, assim, a reprodução sexuada pode contribuir para transferência e herança das mutações de kDNA nas progênies das famílias do estudo.

SUMMARY

This study stems from a research line that has been carried on the Chagas Disease Multidisciplinary Research Laboratory at the Faculty of Medicine, University of Brasilia, which aims at the mapping of the integrations of the mitochondrial minicircle sequences (kDNA) from *Trypanosoma cruzi* in members of families living in different Brazilian ecosystems. Herein, we analysed samples of semen from 53 men from two counties at the State of Pará, Brazil. The research was conducted aiming at the identification and characterization of kDNA mutation hotspots in semen cells, so as to determine the rate of presence of the parasite nuclear DNA (nDNA) in adults at reproductive age. A total of 53 semen samples DNA were analysed. The PCR exams showed nDNA in 44 samples (83%), and further four samples (48/53) yielded kDNA amplicons. These results suggest that sequences of kDNA minicircles can integrate into the human genome in the absence of an active *T. cruzi* infection. Then, we used the *tpTAIL*-PCR technique to characterize the kDNA mutations on chromosomes of analyzed cells. A minimum of 142 mutations were disclosed in the genome of 38 family members (72%). These mutations were localized in LINE-1 (56.6%) disperse all through the genome. However, it was observed that 32.5% of such mutations were present in the *locus* AL7313741.4 of LINE-1, a chromosome X. Nine mutation events were found in coding regions of the genome. Among these, there were mutations in protein-kinase, and in the olfactory genes, and, also in undetermined sites. Further 24 mutations (16.8%) showed the kDNA covalently linked to LINE-1, and these chimeras were attached to fragments of retroviral DNA sequences, thus suggesting recombination and hitchhiking. Of great interest, the results suggest the possibility of transmission of the infections from 83% of men showing the DNA from *T. cruzi* in the semen, and, therefore, sexual reproduction may contribute to lateral transfer and inheritance of kDNA mutations in the progeny of the study families.

I. INTRODUÇÃO

1. A doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas foi descoberta a pouco mais de um século pelo Dr. Carlos Chagas, no curso de uma expedição médica para combater a Malária no norte de Minas Gerais. Naquela ocasião, enquanto atendia os casos clínicos num vagão de trem, onde fazia exames de sangue com um microscópio monocular com espelho para refletir a luz solar, Dr. Carlos Chagas descreveu o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o inseto transmissor, e as características clínicas de uma nova doença (Chagas, 1909). Ele também descobriu e publicou o ciclo de vida do agente etiológico, os hospedeiros vertebrados e invertebrados, a epizootia resultante da infecção de mamíferos pelo *T. cruzi*, e as diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica (revisto em Teixeira e cols, 2006).

1.1 Epidemiologia

A doença de Chagas é considerada a maior endemia transmitida por vetores nos países do ocidente (revisto em Teixeira e cols. 2006, Hotez e cols, 2008). Esta enfermidade produz cardiopatia em adultos nos países da America Latina (Moncayo, 2003) onde se constitui em ameaça constante para cerca de um quarto da população. Estima-se que 28 milhões de pessoas está sob-risco de contrair a infecção, onde insetos vetores e hospedeiros mamíferos participam do ciclo de transmissão (WHO, 2007). A alta morbidade da doença é encontrada em 30% dos pacientes crônicos que desenvolvem cardiopatia e/ou formas digestivas caracterizadas por dilatações no esôfago e/ou cólon (Brener, 1987, Rassi e cols, 2012).

Além do agravo imposto à saúde das pessoas, geralmente em idade produtiva, a enfermidade segue uma evolução crônica com diferentes perfis de morbidade nas formas cardíaca e digestiva, e provoca elevado ônus econômico devido a gastos com internação, licença saúde, absenteísmo e óbitos. Nos países onde grassa a endemia, o investimento é muito inferior ao pesado ônus

econômico, pois limita ou até anula a força de trabalho dos acometidos pela doença (Araujo, 2008).

1.2 Vias de transmissão

A principal via de transmissão do *T. cruzi* para o homem é o inseto hematófago da subfamília Triatominae (Moncayo, 2003). O controle dessa via de transmissão vetorial é dificultado pela existência de mais de 140 espécies de triatomíneos, 40 das quais podem transmitir o *T. cruzi*. Relevante é o fato de as infecções pelo *T. cruzi* geralmente são assintomáticas e esses hospedeiros mamíferos, silvestres e domiciliados, são considerados reservatórios do *T. cruzi* que propiciam a circulação do parasito na natureza (WHO, 2002).

Ademais, o *T. cruzi* pode ser transmitido congenitamente, da mãe para o concepto, via transplacentária (Rassi e cols, 2012). A transmissão transfusional é considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (EUA, Canadá, Espanha entre outros), no Brasil a legislação vigente obriga a testagem das amostras ou unidade de sangue coletada para a doença de Chagas, onde em 2010 o coeficiente de prevalência médio em candidatos à doação de sangue foi de 0,17% (Ministério da Saúde, 2010). Além disso, a infecção chagásica pode ser transmitida por transplante de órgãos, e acidentalmente em laboratórios de pesquisa e hospitais (Rassi e cols, 2010). Ultimamente, acumulam-se relatos de micro-epidemias de doença de Chagas aguda adquirida pela ingestão de alimentos contaminados. Após o primeiro relato de casos de transmissão oral em Belém do Pará (Shaw e cols, 1969) várias micro-epidemias foram relatadas: em 1969 no Rio Grande do Sul, e em 1985 na Paraíba onde foram relatados casos agudos relacionados à fonte alimentar. Em 2005, em Santa Catarina, surto endêmico foi identificado em associação com ingestão de caldo de cana; em Riacho de Santana e no vale do rio São Francisco, ambos na Bahia, em 2004 também por fonte alimentar contaminada. Por último, em 2004 e 2007, foram relatadas várias micro-epidemias de doença de Chagas aguda na região amazônica, alguns dos quais foram imputados ao consumo de suco de açaí (Dias e cols, 2008). A importância da via oral de transmissão na epidemiologia da doença de Chagas ainda é desconhecida.

A transmissão sexual do *T. cruzi* foi sugerida desde sua descoberta, mas ainda não foi comprovada (Carvalho, 2009), na teoria ela pode ocorrer na relação de homem suscetível com mulher infectada em período menstrual, eliminação de tripanosomas no esperma de homens infectados, etc (Fiocruz, 2012). Vianna relatou a presença do *T. cruzi* em células do testículo murino, em 1911, mas não se tem conhecimento da frequência da colonização dos tecidos de órgãos reprodutores. Achados histopatológicos de duas crianças, um menino de 18 meses de idade e de uma menina de 4 meses de idade, portadores da doença de Chagas aguda (Teixeira, 1970), revelaram ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* dentro de células de gonioblastos de tubos seminíferos dos testículos e de células da teca dos ovários. Todos esses achados sugerem que há possibilidade da transmissão do parasito pela via sexual. A demonstração do parasito nas secreções do aparelho reprodutivo masculino ou feminino sugere a possibilidade de transmissão sexual, mas não há casos documentados de transmissão do *T. cruzi* pela via sexual (Teixeira, 2007).

1.3 Doença de chagas na Amazônia

Desde início do século passado, tem-se conhecimento de que mamíferos silvestres (Chagas, 1912; Chagas, 1924) e várias espécies de triatomíneos podem veicular as infecções pelo *T. cruzi* na Amazônia brasileira (Matta, 1919; Deane e Damasceno, 1949). Entretanto, a Amazônia era considerada livre da doença de Chagas, pois estava fora da área de atuação do *T. infestans* (Figura 1), principal transmissor do *T. cruzi* nos ecossistemas cerrado e caatinga. A partir de poucos relatos de casos de doença de Chagas na Amazônia (Shaw e cols. 1969), a endemia emergiu na região na metade do século passado e se acentuou a partir de 1996 (Ferreira e cols, 1997; Valente e cols, 1997, Ministério da Saúde; 2005). Desde então têm sido relatados casos humanos autóctones de doença de Chagas na região norte brasileira e a doença, ultimamente, tem sido considerada endêmica na Amazônia. Muitos desses casos foram detectados, simultaneamente, na mesma família, na ausência de triatomíneos domiciliados (Pinto, 2001), sugerindo a aquisição da

infecção pela via oral (Shaw e cols, 1969, Lainson e cols, 1979). De 1997 a 2008 foram identificados 617 casos agudos na região, associados à micro-epidemias ou casos isolados com padrão epidemiológico sugestivo de transmissão do *T. cruzi* pela via oral (Ministério da Saúde, 2009).



Figura 1. Distribuição da doença de Chagas no Brasil: áreas endêmicas, enzoóticas e com micro-epidemias isoladas de casos em humanos na região norte [Coura, 2002].

A ocorrência de transmissão de *T. cruzi* pela via oral pode associar características peculiares da doença de Chagas cardíaca na região Amazônica (Barbosa-Ferreira, 2010). Por outro lado são crescentes as micro-epidemias familiares e doença clínica com síndrome febril prolongada, além de casos assintomáticos (Pinto e Cols, 2001; Pinto e Cols, 2004; Coura e Cols, 1994). Os fatores de risco para o agravamento da doença de Chagas na região amazônica são a migração humana e o desmatamento descontrolado. A

migração humana favorece o transporte de triatomíneos de áreas endêmicas, podendo importar o ciclo doméstico de áreas de transmissão doméstica para outras áreas que não possuem esse perfil. Já o desmatamento pode favorecer a adaptação de triatomíneos silvestres a habitações humanas ou nas proximidades (Coura e cols, 2002).

1.4 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico da Tripanossomíase Americana e da doença de Chagas é um protozoário da ordem Cinetoplastida, família *Trypanosomatidae* que tem como peculiaridade a grande quantidade de DNA mitocondrial, representando até 25% do DNA total do parasito. O kDNA tem estrutura tubular localizada no cinetoplasto da célula. O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo (Figura 2). Sucintamente, as formas epimastigotas do *T. cruzi* no intestino médio do inseto diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas no intestino terminal do triatomíneo e são eliminadas pelas fezes, podendo contaminar os hospedeiros pela pele ou mucosa. As tripomastigotas invadem células do hospedeiro, transformam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária. As amastigotas se transformam em tripomastigotas, e com a ruptura da célula parasitada ganham a corrente sanguínea. Os Triatomíneos adquirem o *T. cruzi* durante o repasto no indivíduo com formas tripomastigotas no sangue, podendo transmiti-lo para outro hospedeiro fechando assim o ciclo (Burleigh, 2004).

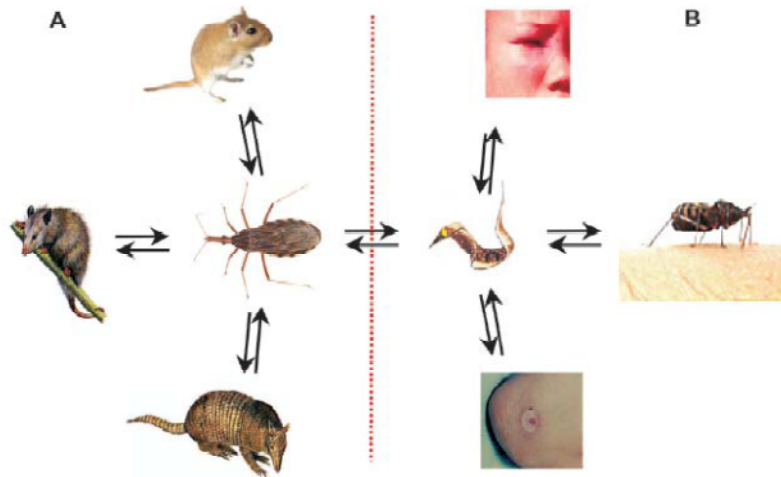


Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no homem e em mamíferos. A) Ciclo silvestre. B) Ciclo peri-domiciliar (Teixeira e cols, 2006).

1.4.1 O DNA do cinetoplasto

O material genético do *T. cruzi* fica localizado no núcleo celular e na mitocôndria. O DNA mitocondrial do cinetoplasto é reconhecido como *kinetoplast* DNA (kDNA). Uma característica marcante desse protozoário é a organização do kDNA em moléculas circulares de maxicírculos e minicírculos (Klingbeil & Englund, 2004) (Figura 3).

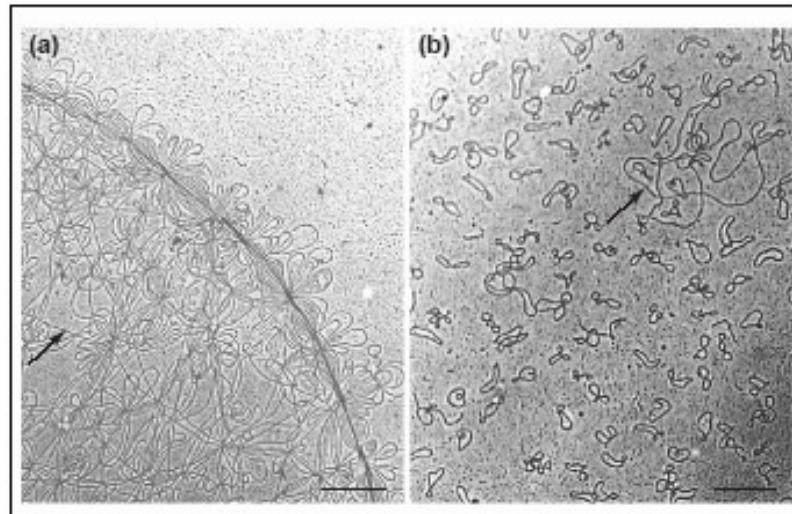


Figura 3. O DNA mitocondrial. (a) Maxicírculos e minicírculos de kDNA formam uma rede. **(b)** Ultraestrutura de minicírculos decatenados e único maxicírculo (seta) (Liu e cols, 2005a).

Os maxicírculos, em número de 40 a 50 cópias têm aproximadamente 40 kb e possuem genes que codificam proteínas mitocondriais tais como aquelas do complexo respiratório (Klingbeil & Englund, 2004). Já os minicírculos de kDNA são cerca de 15 mil moléculas circulares de 1,4 kb, concatenadas e presas aos maxicírculos. Os minicírculos tem a função de codificar RNAs guias (gRNA) com função de editoração dos mRNAs dos maxicírculos (Junqueira e cols, 2005). Minicírculos são organizadas em regiões variáveis e conservadas. O minicírculo do *T. cruzi* possui quatro regiões conservadas (~ 122 pb) e quatro regiões variáveis intercaladas, cada uma com aproximadamente 238 pb (Figura 4).

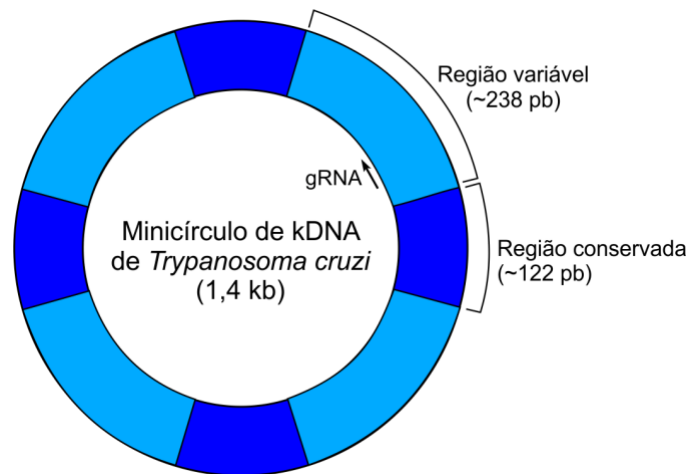


Figura 4. Estrutura de minicírculo de kDNA com regiões conservadas (azul escuro) e variáveis (azul claro).

1.5 Manifestações clínicas

Ao iniciar a infecção o parasito invade e prolifera em quase todos os tipos de células nos hospedeiros mamíferos (Carvalho, 2009). Os tecidos conjuntivo, epitelial de revestimento e glandular, músculos liso e estriado, medula óssea, células mononucleares do sistema fagocitário e, também, células gonadais podem ser intensamente parasitados (Teixeira, 2007). Entretanto, a intensidade das infecções pelo *T. cruzi* pode variar de caso para caso, provavelmente devido às reações imunes do hospedeiro contra o parasito.

As manifestações clínicas da doença têm relação com o período da infecção. Para facilitar a compreensão, a infecção foi dividida nas fases aguda, crônica essa última com a forma indeterminada. A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* geralmente é assintomática, e passa despercebida na maioria dos pacientes. Em cerca de 5% dos casos agudos, os indivíduos infectados apresentam febre, mialgia, dores articulares, taquicardia, edema, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, e outros sintomas de quadro infeccioso agudo. Em alguns desses casos pode-se detectar chagoma de inoculação no local de entrada do parasito, ou sinal de Romaña que aparece como inchaço ocular unilateral, bipalpebral (Prata, 2001; Teixeira e cols, 2011).

A parasitemia encontrada na fase aguda da infecção, sintomática ou assintomática, desaparece espontaneamente em poucos meses, mas o indivíduo continua com a infecção subpatente evidenciada pelos anticorpos específicos contra o *T. cruzi*. Nessa fase o indivíduo pode apresentar a forma indeterminada, a qual se caracteriza pela ausência de manifestações clínicas, e, portanto, o indivíduo tem bom estado de saúde, sem anormalidades no trato digestivo e no coração (Prata, 2001). Porém, em cerca de um terço dessas infecções crônicas podem surgir manifestações da doença de Chagas cardíaca e/ou digestiva (Moncayo, 2003). Em 94% dos infectados crônicos a manifestação da doença atinge função cardíaca; 38,5% desses podem falecer subitamente, e os restantes 56% morrem com insuficiência cardíaca. Desordens gastrointestinais também conhecidas como megas (megaesôfago e megacólon) acometem 5,5% dos casos (Rassi e cols, 2012). Porém, a alta letalidade na fase crônica é associada à cardiomiopatia chagásica. (Teixeira e cols, 2006).

Não existe tratamento eficaz para a doença de Chagas. A possibilidade de desenvolver vacina para prevenir a infecção depende de conhecimentos novos, ainda inexistentes (Lauria-Pires, 2007, Rassi e cols, 2012). As campanhas de controle da doença no Brasil têm como alvo a eliminação do *Triatoma infestans* principal inseto vetor do *T. cruzi* em alguns ecossistemas. Esta estratégia foi considerada eficaz no Brasil e nos países do cone sul (Chile, Argentina e Uruguai). Com o desalojamento do *T. infestans* das choupanas houve uma queda acentuada dos índices de transmissão do *T. cruzi* pelo inseto vetor. Porém, outras espécies de triatomíneos são eficientes na transmissão do *T. cruzi* para o homem (Pineda, 1998). Atualmente, as campanhas de saúde pública concentram-se na melhoria da qualidade da habitação, visando a impedir o contato do inseto com as pessoas (Dias, 2002).

1.6 Diagnóstico

O primeiro diagnóstico da doença foi feito por Carlos Chagas (1909), ao analisar ao microscópio uma lâmina contendo esfregaço de sangue de uma menina de 3 anos de idade. Atualmente, o diagnóstico da Doença de Chagas pode ser confirmado pelos exames laboratoriais. Vários testes foram

desenvolvidos para detectar a infecção pelo *T. cruzi*. Na fase aguda o diagnóstico clínico pode ser confirmado pela pesquisa direta do parasito no exame microscópico do sangue a fresco, pela hemocultura e pelo xenodiagnóstico (Lana e Tafuri, 2000; Luquetti e Rassi, 2000; Rey, 2001). Na fase crônica das infecções pelo *T. cruzi*, na ausência de parasitemia demonstrável, o diagnóstico pode ser feito pelos métodos indiretos.

A doença de Chagas crônica cursa com alterações da função cardíaca, cansaço, edema, e arritmias confirmadas pelo eletrocardiograma, e aumento do tamanho do coração demonstrado pelos raios-X. Manifestações da doença de Chagas crônica também são os megas do sistema digestivo, com dilatação e hipertrofia da parede do esôfago e do colon. (Lana e Tafuri, 2000; Brener e Barral-Netto, 2000; Rey, 2001). O xenodiagnóstico e a hemocultura podem ser feitos na tentativa de revelar a parasitemia, mas a sensibilidade desses testes é considerada baixa em torno de 40-50%. (Lana e Tafuri, 2000; Luquetti e Rassi, 2000; Rey, 2001). No curso da infecção crônica são empregados testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi*. Os testes mais empregados são imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (imuno-enzimático) e hemaglutinação (HI). Vale lembrar que os testes que detectam anticorpos variam quanto à sensibilidade e especificidade (Vexenat e cols, 1996; Gadelha e cols, 2003, Coura e Borges-Pereira, 2012).

Os testes de PCR com sequências aneladoras de DNA nuclear (nDNA) ou DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* também têm sido usados. Esses testes têm alta sensibilidade, mas a especificidade depende de reagentes padronizados, e o controle de qualidade deve ser constante. A PCR com *primers* aneladores do nDNA pode identificar a infecção críptica que muitas vezes existe na ausência de anticorpos (revisto em Teixeira e cols, 2006). Entretanto, a PCR com sequências aneladoras (*primers*) do kDNA do *T. cruzi* precisa ser interpretada com cautela, visto que o kDNA pode achar-se integrado no genoma da pessoa sem a infecção ativa (Hecht e cols, 2010). A sensibilidade da PCR foi comprovada por Andersson (2004), ao realizar testes pareados em amostras de soros e de DNA de 39 pacientes. O autor identificou 21 casos positivos pelo teste ELISA, enquanto a PCR diagnosticou 33 casos positivos. Essa diferença não deve ser interpretada como imprecisões dos métodos empregados. Pois, sabe-se que os resultados dispares de PCR

mostram casos de infecção ativa, com resultados positivos para kDNA e de DNA nuclear do *T. cruzi*, e aqueles outros casos em que apenas o kDNA parasita fica integrado no genoma.

1.7 Patogênese

Durante muito tempo acreditou-se somente na teoria que a patogênese da doença de Chagas tinha origem na persistência do parasito nos tecidos, o qual rompia mecanicamente as células parasitadas gerando inflamações crônicas, lesões típicas da doença. Entretanto essa teoria não explica o motivo da baixa letalidade nos pacientes com a infecção na fase aguda e também por que dois terços dos chagásicos com infecção crônica não apresentam lesões. Em 1974, Santos-Buch e Teixeira constataram que células cardíacas alogênicas de coelhos infectados com *T. cruzi* e que se encontravam na fase crônica eram rejeitadas pelos linfócitos do animal (Teixeira e cols, 1975). O relato de uma rejeição acelerada de células embrionárias de coração de coelhos por linfócitos imunes enquanto linfócitos de coelhos controle (não infectados) não as afetavam (Teixeria, 2006) fez surgir a hipótese da teoria autoimune para a doença de Chagas. Experimentos realizados com animais geneticamente idênticos demonstraram que enxertos de coração de feto de camundongos infectados eram destruídos pelas células imunes do receptor, enquanto que camundongos saudáveis não rejeitavam o enxerto (Ribeiro dos Santos e cols, 1992). Animais tratados com nitroderivados tripanocidas apresentaram suas células cardíacas rejeitadas por células do sistema imune (Teixeira e cols, 2006). Portanto estudos realizados no nosso laboratório sugerem que a integração do material genético do *T. cruzi* através elementos retrotransponíveis do genoma do hospedeiro, característica do evento de transferência horizontal, desencadeia os mecanismos que geram a autoimunidade típica da doença de Chagas.

2. Elementos transponíveis

Vários estudos têm revelado que cerca de 50% do genoma da maioria dos seres eucariontes é composto por sequências repetitivas e grande parte

dessas regiões repetitivas é formada por elementos transponíveis ou seqüências de DNA móveis capazes de se transportar para outros locais dentro do genoma, sem qualquer obrigatoriedade reconhecida de homologia relacionada com o sítio-alvo de posicionamento novo (Deininger & Batzer, 1999; Schaack e cols, 2010, Burns e Boeke, 2012). Esses elementos são classificados em duas classes, de acordo com as estruturas e o mecanismo de transposição; i) transposons que utilizam transposases para realizar o evento de transposição; ii) retrotransposons que necessitam de um RNA intermediário como molde e utiliza a transcriptase reversa para copiar e transpor o transcrito (Casse e cols, 2006). Eventualmente, ao se movimentar, os elementos transponíveis carregam consigo seqüências adjacentes para novos sítios do genoma (Wright e Fingiam, 2001). Por possuírem essas propriedades os elementos transponíveis são conhecidos como modeladores de genomas, pois promovem rearranjos, criando genes novos, ou modificando genes preexistentes (Smit, 1996 e 1999; Kidwell e Lisch, 2001). Pode-se incluir como consequências desses eventos, o impacto funcional das alterações na expressão de genes endógenos bem como na geração de produtos quiméricos resultantes da fusão do genoma do hospedeiro com DNA exógeno (Teixeira, 2007). No genoma humano existem cerca de sete classes de DNA transposons que se encontram inativos nos vertebrados, sobretudo nos mamíferos (Hecht, 2008). Os retrotransposons têm maior número de cópias no genoma humano, uma grande parcela dos quais possui atividade. Os elementos retrotransponíveis são divididos em duas subclasses; os que possuem LTR (longas repetições terminais) e os que não contêm LTRs, incluindo LINEs (long interspersed elements) que são seqüências repetitivas longas e SINEs (short interspersed elements) correspondendo a seqüências repetitivas curtas (Figura 5).

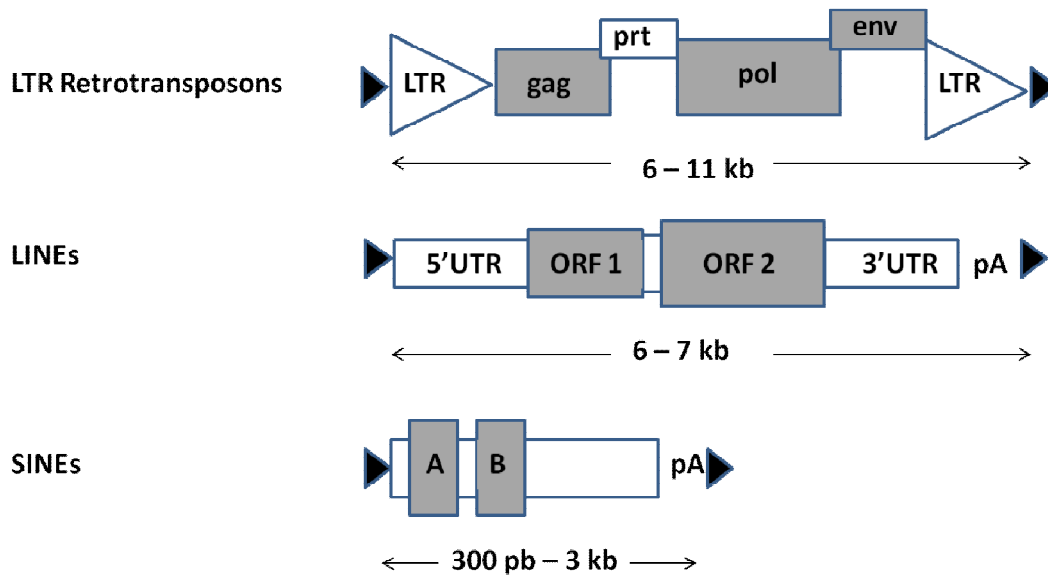


Figura 5: Estrutura dos elementos transponíveis; LTR note os genes *gag* (group-specific antígeno), *pol* (polimerase) e *env* / (envelope) em retrotransposons LTR. LINE tem característica não-LTR. SINE é constituído de monômeros semelhantes (A e B) com cauda poli-A (esquema adaptado de Babushok e Kazazian, 2007).

2.1 Características dos retrotransposons

Aproximadamente 8% do genoma humano é composto por retrotransposons LTR, com capacidade de copiar e colar fragmentos genômicos mediante atividade da transcriptase reversa (Burns e Boeke, 2012). Essa classe de elementos transponíveis encontrada nos genomas de mamíferos codifica enzimas necessárias para a regulação da transcrição pelas repetições terminais de sua estrutura. Seus sistemas de replicação são similares aos dos retrovírus infectantes, pois possuem os genes *gag* e *pol*, que codificam uma integrase. A transcrição reversa é realizada no citoplasma e sua síntese é feita pelo tRNA (Lewin, 2001). Não se sabe ao certo quem deu origem a quem, se os retrotransposons são provenientes de retrovírus que perderam a capacidade infectante ou se os retrovírus são consequência da evolução dos retrotransposons. Devido à proximidade desses elementos com a classe de vírus, os retrotransposons também são chamados de retrovírus endógenos (Teixeira, 2007).

Os retrotransposons não-LTR's são agrupados em uma família denominada LINE, na qual apenas o elemento LINE-1, ou L1 possui atividade em consequência de suas duas ORFs bem definidas. Os L1 chegam a representar 17% do genoma humano, sugerindo que essa classe é bem sucedida em mamíferos. Esses elementos surgiram há cerca de 120 milhões de anos saltando de genoma em genoma e atualmente continua se expandindo no genoma humano (Lee e cols, 2006). LINE-1 de humanos possui cerca de 6000 pb e sua estrutura contém uma 5'UTR onde se encontra o promotor de RNA Pol-II, duas fases de leitura aberta (*ORF's*), uma região 3'UTR e uma cauda poli-A. A *ORF-1* é responsável pela codificação de uma proteína com afinidade por RNA, a qual é essencial para a retrotransposição (Martin, 2006). A *ORF-2* codifica proteínas com atividades de endonuclease e transcriptase reversa (Hedges e Batzer, 2005). Portanto, acredita-se que a inserção do elemento LINE no cromossomo ocorre quando a endonuclease da *ORF-2* cliva uma única fita do DNA, liberando um 3'-OH que atua como *primer* para a transcrição reversa, utilizando o RNA de L1 como molde (Kazazian e Goodier, 2002).

Os SINE's são elementos pequenos de 75 a 500 pb que contêm um promotor de RNA polimerase III (responsável pela transcrição), assemelhando-se ao tRNA, e uma cauda poli-A. São encontrados nos genomas de mamíferos, mas o número de cópias desses retroelementos variam muito (Deininger e cols 2003). SINEs são encontrados em regiões de DNA não repetitivos, principalmente naquelas ricas em GC, habitualmente presentes regiões codificadoras. Diferentemente, LINE's localizam-se em regiões ricas em AT. Por não codificar proteínas os SINE's dependem da transcriptase reversa de LINE's para se mover no genoma. Os elementos transponíveis da família *Alu* são encontrados exclusivamente em primatas. Os membros dessa família (*Alu*) não possuem muitas diferenças, mas não são idênticos, visto que tem 87% de similaridade com a sequência consenso. *Alu* é o único SINE com atividade em humanos e representa cerca de 5% do genoma total (Lander e cols, 2001).

3. Transferência de DNA e Evolução.

A evolução é um processo contínuo de mudança e seleção dos organismos mediante alterações no DNA, particularmente ativo durante a reprodução, quando eventos de mutações e recombinações remodelam o DNA durante a divisão meiótica das cromátides. Existem outros mecanismos de alteração de DNA que também contribuem enormemente para o processo de evolução, como, por exemplo, a aquisição de DNA de outros organismos. Entre esses mecanismos dá-se maior importância para a transferência gênica lateral (TGL) e vertical (TGV). A TGL diz respeito à transferência de material genético entre espécies filogeneticamente distantes. TGL tem sido reconhecida como uma importante via de evolução dos procariotos, desde tempos imemoriais (Gilbert e cols, 2010; Burns e Boeke, 2012). Entretanto, a TGL pode ocorrer de procariotos para procariotos, de procariotos para eucariotos, de eucariotos para procariotos e de eucariotos para eucariotos (Keeling e Palmer, 2008). A TGV é a transferência vertical do DNA integrado mediante TGL pela reprodução sexuada. TGL e TGV produzem e sustentam genomas quimeras (Katz, 2002). O fenômeno requer que o DNA exógeno seja assimilado nas células germinativas. Essas mudanças repercutem no aperfeiçoamento dos mecanismos de sobrevivência e adaptação essenciais para a continuidade da vida. Os retrotransposons têm papel importante na evolução dos seres vivos. Demonstrou-se que o genoma humano expandiu de 15% a 20% em relação ao do chimpanzés e que 90% dessa expansão deveu-se à inserção de retrotransposons (Liu e cols, 2003). Além de arquitetos, LINEs produzem crescimento de genomas das mais diferentes espécies. Estima-se que 45% do genoma humano, 15% da *Drosophila* e até 70% do genoma de plantas e anfíbios (Biemont & Vieira, 2005). A retrotransposição de elementos LINEs promove recombinação ectópica e alteram expressão e regulação de genes. Constata-se que esses eventos continuam ativos nos dias atuais, pois elementos da classe L1 foram inseridos recentemente no genoma humano, sugerindo a explicação para os polimorfismos em determinada região de cromossoma em grupos populacionais (Seleme e cols, 2006). A evolução genômica tem demonstrado que modificações no DNA em consequência de transferências gênicas, duplicações, perdas de genes e outros eventos

relacionados à molécula que contém informação são fundamentais para a sobrevivência das espécies.

3.1 Transferência Lateral de DNA

A transferência lateral de DNA ocorre naturalmente há muito tempo (Hecht, 2008). Retrovírus e lentivírus utilizam a maquinaria celular para replicação, convertendo RNA em cDNA, integrando-o no genoma do hospedeiro (Schröder e cols, 2002). Além das classes virais citadas acima, sabe-se que DNA de bactérias integra em células hospedeiras e esse fenômeno é relativamente frequente, e isso tem sido demonstrado pelo sequenciamento de genomas. A presença de DNA em organelas simbiotes é um exemplo da plasticidade de genoma. Atualmente existem teorias que sugerem as atuais mitocôndrias e cloroplastos, estruturas que possuem material genético próprio, originalmente presentes em eubactérias ancestrais, foram transferidas para organismos eucariontes em associação endossimbiótica (Gray, 1999). Lander e cols (2001) sugerem que durante a evolução dos vertebrados cerca de uma centena de genes procariotas foram incorporados ao genoma humano. Outros autores (Stanhope e cols, 2001; Choi, 2007) sugerem que transferência gênica entre eucariontes são raros, pois a membrana que envolve o núcleo separa o material genético das organelas no citoplasma. Mas muitos afirmam (Boucher e cols, 2003) que TLG ocorre com frequência entre eucariotas, até pelo simples contato físico como ocorre entre plantas e parasitos (Mower e cols, 2004; Davis e Wurdack, 2004). A literatura tem documentado diversos episódios de transferência gênica entre eucariotas. Por exemplo, foram identificadas sequências de nucleotídeos de camundongos no genoma de *Schistosoma japonicum* (Imase e cols, 2004).

Por último, foi relatado que espermatozoides poderiam agir como vetores de DNA exógeno (Brackett e cols, 1971). Pesquisadores de laboratórios independentes confirmaram essa sugestão, mostrando que espermatozoides se associam com moléculas de DNA exógeno, transferindo-as durante a fertilização para as próximas gerações (Brinster e cols, 1989 e Lavitrano e cols, 1989). Spadafora (1998) afirmou que os espermatozoides de varias espécies são capazes de interagir e assimilar o DNA, como se fossem vetores. A

transferência gênica mediada por esperma (TGME) depende da capacidade do gameta assimilar molécula de DNA exógeno e liberá-la no oócito durante a fertilização. Pode-se dizer que a TGME ocorre em duas etapas. Na primeira o DNA exógeno interage espontaneamente com o espermatozoide e, na segunda, há liberação do esperma com o DNA integrado para a fertilização (Spadafora, 2008b). A atividade de transcriptase reversa do esperma é conhecida (Sciamanna e cols, 2003). Pode-se afirmar que a transcriptase reversa endógena no esperma regula a atividade de retroelemento que associa moléculas de RNA ou DNA exógeno através da transcrição reversa sequencial. Portanto a TGME pode ser considerada fenômeno natural de seleção de animais mediante rearranjos no genoma e alterações fenotípicas (Spadafora, 2008a). Pittogi e cols (2003) e Beraldi e cols (2006) demonstraram a atividade transcriptase reversa de LINE-1 em células germinativas de mamíferos.

4. Integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro.

Estudos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC), localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, demonstraram que minicírculos de kDNA do *T. cruzi* é integrado com frequência significativa no genoma de células de hospedeiros mamíferos (Teixeira e cols, 1994). A partir desse achado vários estudos têm sido conduzidos visando a compreender o fenômeno da integração do kDNA do *T. cruzi*, e mutações subsequentes que induzem alterações genotípicas e fenotípicas no hospedeiro. Eventos de integração do kDNA tem sido relatados em coelhos, primatas, aves, e em humanos naturalmente infectados (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011). Trabalhos recentes do LMPDC demonstraram sequências de minicírculos são transferidas para sítios específicos do genoma do homem, primata e coelho e, na maioria das vezes, o sítio de integração do kDNA foi o retrotransposon LINE-1 (Nitz e cols, 2004). Experimentos *in vitro* comprovaram que o kDNA integrado nos elementos LINE-1 (Argañaraz, 1996), pode se mobilizar para outro sítio do genoma da célula hospedeira (Simões-Barbosa, 2000). A transferência lateral de kDNA (*lateral kDNA transfer* – LkDT) é definida como a integração de sequências de minicírculos em células somáticas e germinativas do hospedeiro. Já a

transferência vertical de kDNA (*vertical kDNA transfer* – VkDT) é a herança do kDNA integrado pela progênie via células germinativas (Hecht e cols, 2010; Teixeira, 2011). Esses fenômenos requerem estudos para elucidar os eventos de TGL e TGV em chagásicos (Hecht e cols. 2008).

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Diante das informações descritas, os objetivos principais deste estudo visam identificar os sítios preferenciais das quimeras kDNA-DNA hospedeiro, e documentar a presença do nDNA do *T. cruzi* no sêmen de chagásicos.

2. Objetivos específicos

- ✓ Diagnosticar a infecção do *T. cruzi* e a integração de kDNA desse parasito no sêmen de chagásicos da região amazônica brasileira através de testes moleculares.
- ✓ Identificar e caracterizar os sítios de integrações das sequências de kDNA no genoma e as mutações em cromossomos de células germinativas de adulto humano.

III MATERIAIS E MÉTODOS

1. Descrição da amostragem do estudo

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna, com protocolo CEP-HCGV nº 054/2009 (Anexo I). Foram selecionadas quatro famílias, todas do estado do Pará, para a realização dos estudos sobre a integração do kDNA e verificação da presença de DNA nuclear do *T. cruzi* nas amostras de esperma desses pacientes. Os pacientes que forneceram as amostras são provenientes do município de Barcarena, situada a 150 km de Belém do Pará e no município de Breves, parte integrante do arquipélago de Marajó. As quatro famílias estudadas associam-se a micro-epidemias de infecção pelo *T. cruzi*, as quais têm sido atribuídas à transmissão por via oral, principalmente pela ingestão do açaí batido, hábito extremamente comum na cultura alimentar regional. Estes indivíduos foram notificados pela Secretaria de Estado e Saúde Pública do Pará (SESPA), após terem sido confirmados pelo LACEN e/ou Hospitais ou postos dos respectivos municípios, dos quais foram incluídos pacientes com diagnóstico de caso agudo pelo exame parasitológico direto positivo ou marcador sorológico de fase aguda (IgM) anti-*T. cruzi* positivo, de acordo com o Consenso Brasileiro de doença de Chagas para casos agudos (MS, 2005). Casos nas famílias notificados como suspeitos e não confirmados, também fizeram parte do estudo e foram submetidos aos mesmos critérios de avaliação.

Indivíduos voluntários adultos das famílias A, B, C e D doaram 15, 6, 10, e 3 amostras de esperma respectivamente, que foram colhidos em preservativo anticoncepcional de látex. Mais 19 amostras de esperma foram obtidas de pessoas que tinham sintomatologia consistente com Doença de Chagas aguda. No grupo controle negativo, amostras de esperma foram obtidas de indivíduos sem história epidemiológica de infecção chagásica, provenientes de região não endêmica. Os controles tinham IFI, HA e ELISA negativos para antígenos de *T. cruzi*. Todos os indivíduos que participaram dessa pesquisa como voluntários preencheram formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). No momento da entrevista foram colhidos dados epidemiológicos mediante questionário (Anexo III).

2. Extração do DNA de células do sêmen

O método desenvolvido por Carter e cols (2000) foi utilizado para extrair o DNA do sêmen. Os espermatozoides ressuspensos em PBS foram centrifugados a 1300 x g. Ao sedimento adicionou-se 3 ml de tampão de extração (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.04% proteinase K, 1% DTT) e a incubação procedeu durante 2 horas a 55° C.

O protocolo para a extração do DNA das amostras foi realizado de acordo com Sambrook e Russel (2001). Em suma, as amostras já em tampão de extração foram submetidas a duas extrações com igual volume de Clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1) e uma extração com igual volume de Clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24: 1), onde a separação da fase orgânica da aquosa foi feita pela centrifugação a 5000 x g por 15 minutos. Após essa etapa, as amostras foram acondicionadas a -80°C para a precipitação do DNA em 5 V de etanol 100%, seguido de incubação de 12 horas a -80°C. Após o período de incubação, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, seco e ressuspenso em 500 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) a 37 °C por 12 horas. O DNA resultante da extração foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade era observada em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio. Após esse processo, os tubos com as amostras de DNA (estoque) foram acondicionadas a -20°C.

2.1 Extração de DNA de *T. cruzi*

Para a obtenção do DNA genômico do *T. cruzi* formas epimastigotas do parasito foram crescidas em meio LIT e coletadas após centrifugação a 1500 x g por 15 minutos. Lavou-se o sedimento com TBS e o mesmo foi ressuspenso em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células/ml de solução e incubado. Após 1 hora de incubação a 37°C, foi adicionado proteinase K (100 µg/ml) seguida de nova incubação por 12 horas a 37°C. A partir dessa etapa seguiram-se duas extrações com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1), e uma extração com clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24: 1). Em seguida precipitou-se o DNA com 2,5 volumes de etanol gelado (100%) e com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, pH 4.7. O sedimento foi lavado duas vezes

com etanol gelado (70%), secado e, depois, ressuspensão em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O DNA resultante foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e as alíquotas (estoque) do DNA foram mantidas a -20°C.

2.2 Extração de kDNA

O kDNA foi extraído segundo metodologia descrita por Pérez-Morga *et al.* (1993). Foram colhidas 5×10^7 formas de cultivo após uma centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS, ressuspensão em tampão NET-100 (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de EDTA pH 8,0, 100 mM de NaCl) e as células foram lisadas com SDS 10%. Logo após foi adicionado Proteinase K (20µg/ml) e em seguida incubou-se por 12 horas a 37 °C. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com ajuda de uma pipeta e acrescentado Tampão NET-100 e sacarose 20%. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos. Depois, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta. Adicionou-se novamente tampão NET-100 e sacarose 20%, repetindo-se a centrifugação. Então, o sedimento foi ressuspensão em 1000 µL de água destilada, seguindo-se duas extrações de clorofane e uma extração de clorofil. O kDNA foi precipitado com 2,5 v de etanol gelado (100%) e com 1/10 v de acetato de sódio 3 M, pH 8,0. O pellet foi lavado duas vezes com etanol gelado (70%), secado e, ressuspensão em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada utilizando géis em diferentes concentrações (0,8%, 1,0% e 1,2%) submersos em tampão TAE 1X, onde as amostras puderam ser analisadas pelo padrão de migração eletroforética. As amostras e um marcador de massa molecular (1 kb Plus DNA *ladder* - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA (Azul de Bromofenol 0,25%; Xileno Cianol FF 0,25%; Glicerol 30%) e o sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 110 V) com amperagem constante.

Após a separação eletroforética uma banda linearizada de kDNA (1,4kb) foi recortada e purificada através do Kit – GE Healthcare (GFX PCR DNA and Gel *Band Purification*) conforme as recomendações do fabricante.

4. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Para amplificar o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* no DNA molde extraído das células germinativas dos pacientes, foram utilizados dois pares de *primers* específicos: Os pares de *primers* S35/36 (Sturm e cols, 1989) foram usados nas reações visando amplificação das sequências de minicírculos de kDNA, enquanto pares de *primers* TCZ1/2 (Moser e cols, 1989) foram empregados para amplificar sequências de nDNA do parasito, produzindo fragmentos de sequências de 188 nucleotídeos. A Tabela 1 mostra as sequências de cada par de *primers*.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas reações de PCR

Primers	DNA a ser amplificado	Sequencias
	Nuclear	Sequencias Nucleares
TCZ 1	nDNA	5' CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT 3'
TCZ 2	nDNA	5' CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG 3'
	Mitocondrial kDNA	Sequencias de minicírculos de kDNA
S 35	kDNA	5' ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'
S 36	kDNA	5' GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'

As reações utilizando os *primers* de kDNA foram padronizadas com as seguintes condições; 200ng de DNA de células germinativas foram utilizados como molde e os reagentes do kit de PCR da Invitrogen: 1X tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,05µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. As reações que utilizaram os *primers* de

TCZ foram padronizadas com as seguintes condições; foram utilizados como molde 200ng de DNA de células germinativas e os reagentes do kit de PCR da Invitrogen: 1X tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,02μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Foram incluídos em todas as reações os devidos controles, negativos e positivos, que consistiram, respectivamente, de tubo sem amostra de DNA (branco), DNA de indivíduo controle não infectado, DNA de indivíduo chagásico, e de 200 pg de DNA de *T. cruzi*. Os testes de PCR foram conduzidos em triplicata e realizados no termociclador *Mycycler* modelo Thermo cycler Bio-Rad e seguiram os seguintes programas:

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

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

Uma variação da técnica *Tail* – PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced* – PCR) foi utilizada na tentativa de se obter as regiões do genoma humano que flanqueiam as sequências de kDNA integradas. Essa técnica foi descrita inicialmente por Liu e Whittier (1995), e consiste em ciclos alternados de baixa e alta estringência utilizando *primers* específicos combinados com *primers* degenerados. As altas temperaturas favorecem o anelamento dos *primers* específicos e as baixas temperaturas permitem o anelamento de ambos.

Para a realização desse estudo, foi realizada uma alteração da *TAIL*–PCR baseada em dados anteriores que indicaram a ligação do kDNA a retroelementos

LINE – 1 (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006), portanto, os *primers* degenerados foram substituídos por *primers* específicos para as sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. A essa nova metodologia deu-se o nome de *tpTAIL-PCR* (*target primer Thermal Asymetric Interlaced – PCR*). Os *primers* do DNA humano foram obtidos de regiões conservadas de elementos L1 (Tabela 2), com o intuito de substituir os *primers* degenerados de Liu e Whittier (1995). Para a primeira amplificação utilizou-se 300 ng de DNA genômico em uma reação contendo 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,4µM do *primer* de kDNA (S34 ou S67), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), juntamente com 0,04µM de cada um dos *primers* de L1 usados neste estudo.

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

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

A *tpTAIL*-PCR foi conduzida em três etapas com ciclos específicos cada uma com programa diferenciado para o teste e o programa utilizado para a realização da *tpTAIL*-PCR 1 foi:

1ª amplificação:

	95°C (05:00)
5 ciclos	95°C (00:30)
	64°C (01:00)
	72°C (02:00)
	94°C (00:30)
	25°C (02:00)
	72°C (02:00)
12 ciclos	94°C (00:30)
	64°C (01:00)
	72°C (02:00)
	94°C (00:30)
	64°C (01:00)
	72°C (02:00)
	94°C (00:30)
	44°C (01:00)
	72°C (02:00)
	4°C ∞

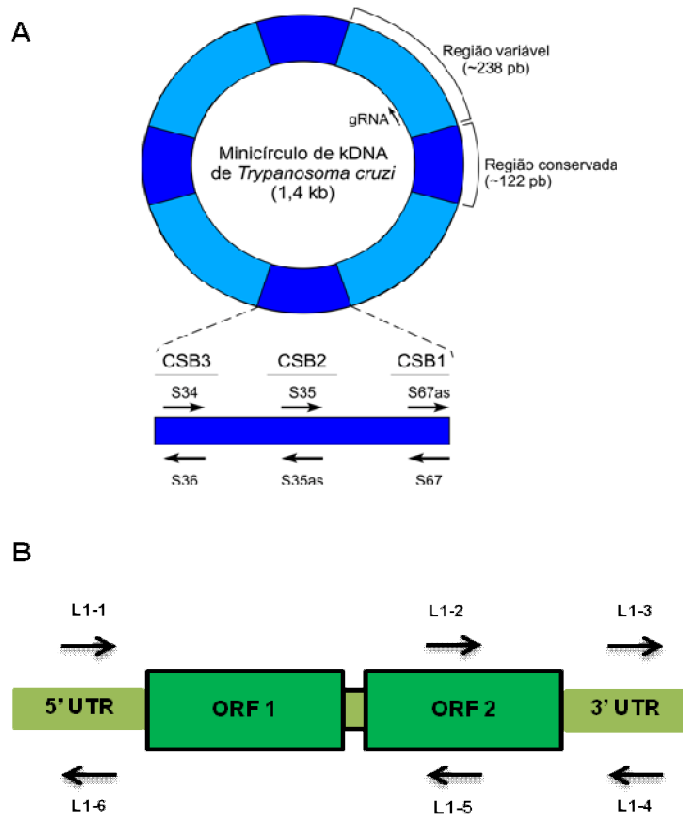


Figura 6: Regiões de obtenção dos *primers* utilizados na *tpTAIL*-PCR. A) Estrutura do minicírculo de kDNA, composta por 4 regiões conservadas (azul escuro) e 4 regiões variáveis (azul claro). Em destaque, os *primers* obtidos das fitas *sense* e *anti-sense*. B) Elemento LINE-1: seqüências conservadas nos diversos L1 humano possibilitaram a construção de *primers* para as regiões 5'-UTR, 3'-UTR e ORF2.

Na amplificação da segunda parte da técnica, *tpTAIL*-PCR 2, foram utilizados 2 μ L da diluição de 1/40 do produto da amplificação da *tpTAIL*-PCR 1, em uma reação contendo 20 mM Tris HCl pH=8,4, 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 μ M do *primer* de kDNA mais interno (S35 ou S35 reverso), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), mantendo-se os mesmos *primers* de L1 utilizados na primeira amplificação (10 ng). O programa utilizado na *tpTAIL*-PCR 2 foi o seguinte:

2ª amplificação:

	95°C (04:00)
12 ciclos	94°C (00:30)
	64°C (01:00)
	72°C (02:00)
	94°C (00:30)
	64°C (01:00)
	72°C (02:00)
	94°C (00:30)
	45°C (01:00)
	72°C (02:00)
	72°C (07:00)
	4°C ∞

Após o segundo ciclo de amplificação os produtos da *tpTAIL*-PCR 2 foram diluídos 1:10, dos quais foram utilizados 2 µL das respectivas diluições como molde para a amplificação da *tpTAIL*-PCR 3. O conteúdo da reação consistiu em, 1X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,4µM do *primer* de kDNA mais interno (S67 reverso ou S36), 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen) junto com 10 ng dos mesmos *primers* de L1. O programa utilizado na *tpTAIL*-PCR 3 foi o seguinte:

3ª amplificação:

	95°C (05:00)
20 ciclos	94°C (00:30)
	45°C (01:00)
	72°C (02:00)
	72°C (07:00)
4°C ∞	

6. Southern Blot dos produtos de PCR

Após a separação eletroforética, os produtos de PCR foram transferidos para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-XL - *Amersham Pharmacia Biotech*) utilizando-se o método de transferência alcalina (Sambrook e Russel, 2001). Sucintamente, desnatura-se o DNA em solução alcalina (NaOH 0,4M) por 20 minutos e, então, faz-se a transferência, por capilaridade, do DNA presente no gel para a membrana, utilizando a mesma solução alcalina e folhas de papel toalha. Após 8 horas de transferência, as membranas eram secadas em estufas a 37 °C para a fixação do DNA.

6.1. Marcação de sondas radioativas

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

6.2. Purificação de sondas radioativas

As sondas radiomarcadas foram purificadas em coluna *Sephadex G-50* e lâ de vidro (Sambrook e cols, 1989). A incorporação radioativa foi confirmada através de cintilografia. As sondas foram usadas dentro dos limites de concentração de 1 a 2 x 10⁶ cpm/ml de solução de hibridização e as atividades específicas foram iguais ou maiores que 10⁸ cpm/ μ g de DNA.

6.3. Pré-hibridação e hibridação

As membranas foram bloqueadas com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão) por 4 horas e após esse tempo, as sondas radiomarcadas (aproximadamente 75 ng/µL) previamente desnaturadas (aquecimento a 100 °C, por 5 minutos e resfriada imediatamente em gelo) foram adicionadas por mais 12 h a 65 °C. Passadas 12 horas, as membranas foram lavadas duas vezes em SSC - 2X/0.1% SDS, a 65 °C, por 15 minutos, seguidas de uma lavagem em SSC- 0.1X/0.1% SDS, a 65 °C, por 15 minutos. Em seguida as membranas foram revestidas em filme plástico de PVC em um cassete BioMax Kodak e expostas a filmes de raios-X (KODAK T-MAT) por no mínimo 4 horas a -80 °C.

7. Clonagem e transformação em *E. coli* competente

7.1. Ligação do inserto ao vetor

Os produtos da *tpTAIL*-PCR que hibridizaram com a sonda de kDNA de *T. cruzi*, foram clonados em vetor comercial pGEM *T-Easy* (Promega) conforme instruções do fabricante. Esse vetor possui como característica a presença de uma timina em ambas as extremidades 3'. A Taq Platinum (Invitrogen) adiciona uma timina na extremidade 3', possibilitando pareamento ligação dos produtos da *tpTAIL*-PCR.

7.2 Preparo de células competentes

O preparo das células competentes foi baseado no protocolo de cloreto de rubídio (Sambrook e Russel, 2001) e a linhagem de *E. coli* utilizada foi a *XL10-Gold* (*Stratagene*).

7.3. Transformação de *E. coli*

As células de *E. coli* XL10-Gold foram transformadas de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel, 2001. Foram adicionados 3 µL da

ligação a 100 µL de células competentes e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Logo após foram submetidas à incubação em banho-maria a 42 °C por um período de 2 minutos no gelo (choque térmico). O meio de cultura LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Em seguida a cultura foi centrifugada por 60 segundos e o sedimento foi plaqueado em meio seletivo-ágar LB com (Ampicilina 100 µg/ml e X-gal 40 µg/ml) e incubada a 37 °C por 24 horas.

7.4. Seleção dos clones recombinantes de *E. coli*

Após a transformação, as colônias com inserto foram “palitadas” para uma membrana de nylon carregada positivamente e selecionadas mediante hibridização com sonda de kDNA marcada com P³² dATP (Sambrook & Russel, 2001).

7.5. Extração de DNA plasmidial

Os clones que hibridizaram com a sonda de kDNA foram submetidos a extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo de lise alcalina, descrita por Sambrook e Russel (2001). A análise dos insertos foi feita mediante a digestão com *EcoRI*. Os clones selecionados para o sequenciamento automático foram tiveram o seu DNA plasmidial reextraído pelo Kit de purificação Ilustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit-GE Healthcare, segundo as recomendações do fabricante.

8. Sequenciamento dos clones e análise em banco de dados

Os clones selecionados foram sequenciados comercialmente (*Genomic*, São Paulo). A análise das sequências foi realizada com o auxílio do programa *Geneious 4.8.2* e as sequências foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados utilizando-se os algoritmos BLASTn, BLASTx (www.ncbi.nlm.nih.gov), e GIRI (<http://www.girinst.org>).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Reação de polimerização em cadeia

Foram realizadas reações de polimerização em cadeia (PCR) visando à amplificação do DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (kDNA) para diagnosticar a infecção pelo *T. cruzi* e selecionar amostras para caracterização das integrações. As reações que visavam amplificação do kDNA e do nDNA foram conduzidas em triplicata para cada par de *primers* onde foram considerados dois resultados iguais. As tabelas 3 e 4 fornecem as informações dos testes PCRs.

Tabela 3: Identificação das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* por PCR usando *primers* específicos para nDNA E kDNA nas cinco famílias do estudo.

Paciente	PCRs Famílias	
	TCZ	kDNA
	Resultados	Resultados
3	+	+
5	-	-
7	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
25	+	+
29	+	+
31	+	+
34	-	-
37	+	+
46	+	+
60	+	+
61	+	+
64	+	+
85	+	+
87	+	+
91	+	+
97	+	+
100	-	+
101	+	+
102	+	+
104	+	+
121	+	+
122	+	+
124	+	+
125	+	+
126	-	+
131	+	+
134	+	+
136	-	+
137	+	+
139	+	+
140	+	+

Tabela 4: Identificação das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* com PCR usando primers específicos para nDNA e kDNA em casos suspeitos e doença de Chagas aguda, mas não agrupados em famílias.

PCRs Casos Avulsos		
Paciente	TCZ	Kdna
	Resultados	Resultados
1555	+	+
1564	-	+
1567	+	+
1584	+	+
1585	+	+
1593	-	+
1595	+	+
1610	+	+
1617	-	-
1628	+	+
1629	-	-
1630	-	-
1667	-	-
1669	+	+
1683	+	+
1684	+	+
1686	+	+
1693	+	+
1709	+	+

Os produtos amplificados pelos *primers* TCZ 1/2 (Moser e cols, 1989), geraram fragmentos de 188 pb e seus catâmeros, correspondentes a uma região repetitiva do núcleo do parasita. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela técnica de hibridização utilizando sonda específica radiomarcada (Figura 7). Os resultados obtidos mostraram que 44 dos 53 casos analisados (83%). A presença de nDNA do parasito nas amostras demonstra a infecção ativa pelo *T. cruzi* nesses pacientes.

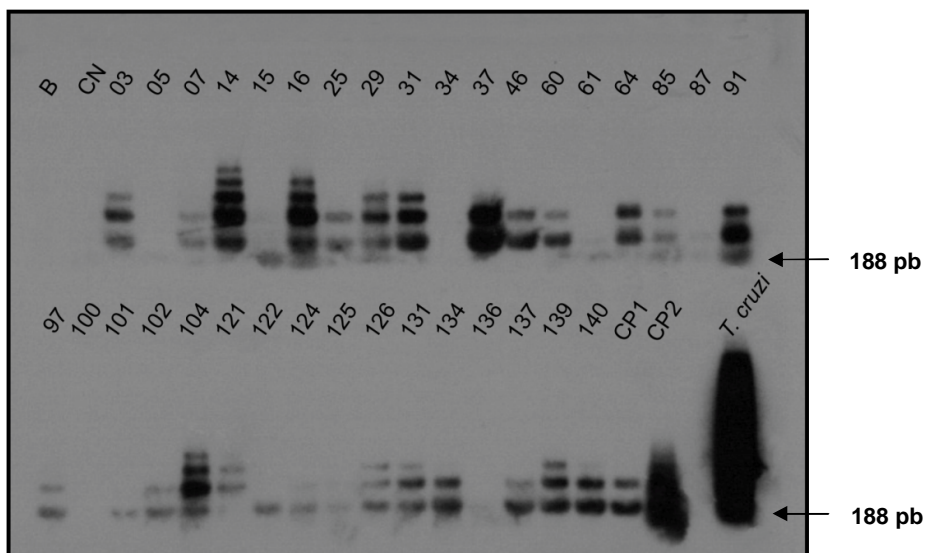


Figura 7: Southern Blot dos produtos da amplificação da PCR de nDNA utilizando os *primers* TCZ 1/2 após hibridização com sonda específica. B, branco; CN, controle negativo e CP, controle positivo (1 e 2).

Para a detecção do kDNA foi utilizado o par de *primer* S35/S36 (Sturm e cols, 1989), que geraram fragmentos de 330 pb e seus catâmeros. A especificidade dos produtos da reação foi confirmada por hibridização com sonda de DNA específica (Figura 8).

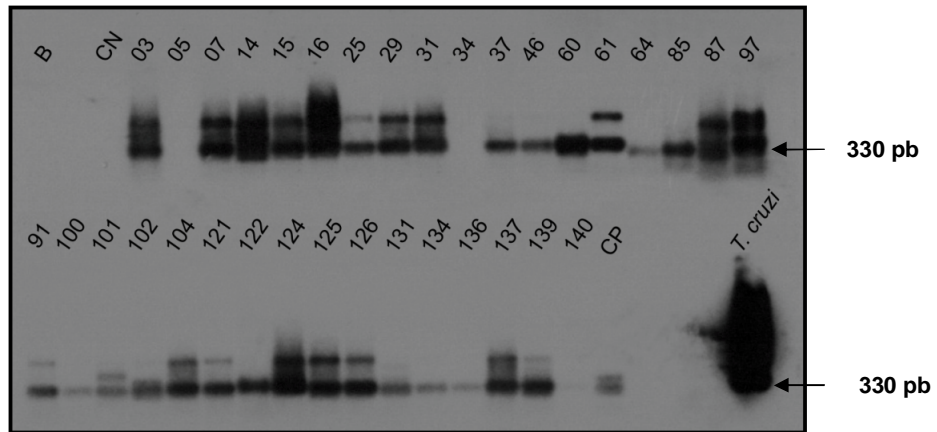


Figura 8: *Southern Blot* dos produtos da amplificação da PCR de kDNA utilizando os *primers* S35/36 após hibridização com sonda específica. B, branco; CN, controle negativo e CP, controle positivo.

Das 53 amostras analisadas 48 (90%) amplificaram kDNA. Embora os primers de kDNA sejam os mais sensíveis, a diferença entre o percentual de positividade das amostras amplificadas pelos primers nucleares TCZ1/2 (82%) pode ser indicativo da presença de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma das células germinativas de indivíduos que não tinham a infecção persistente pelo *T. cruzi*. Em cinco casos apenas, 2 no grupo das famílias e 3 nos casos avulsos, os testes de PCR para kDNA e nDNA foram negativos, o que indica a possibilidade desses pacientes não serem infectados pelo *T. cruzi*. Em dois casos dos casos avulsos encontramos kDNA integrado aos seus genomas com PCR negativa para TCZ o que sugere que esses pacientes tenham herdado as integrações de seus genitores. Os resultados dos exames PCR na amostragem do estudo, com primers específicos para nDNA e kDNA, estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5: Amplificação do nDNA e do kDNA do *Trypanosoma cruzi* na amostragem do estudo*.

TCZ 1/2	S35/36
44/53	48/53

* Número de amostras amplificadas/ número total de amostras.

2. Estudo das Famílias

Este é uma parte integrante da linha de pesquisa do LMPDC que visa a caracterizar a epidemiologia das infecções chagásicas e identificar eventos de integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* nas células somáticas e do sêmen, na tentativa de associar grupos de mutações com o prognóstico clínico dos casos analisados. A presente dissertação remete ao estudo das células do sêmen de pacientes que se propuseram a participar do estudo (materiais e métodos). Os dados sorológicos (Imunofluorescência indireta) aqui apresentados fazem parte das teses de Doutorado das alunas Adriana Benevides de Almeida e Perla Fabíola de Araujo, respectivamente, sobre as associações dos achados clínicos com as mutações, e sobre a caracterização das mutações nos genomas de células somáticas de indivíduos de quatro famílias do estudo geral. Para garantir um acesso direto aos resultados obtidos na investigação das células germinativas, e, também, visando ao futuro cruzamento de dados, nós confeccionamos heredogramas com as informações obtidas para cada uma das 4 famílias.

A família A com 44 indivíduos contribuiu com 15 amostras de sêmen, conforme mostra a Figura 9.

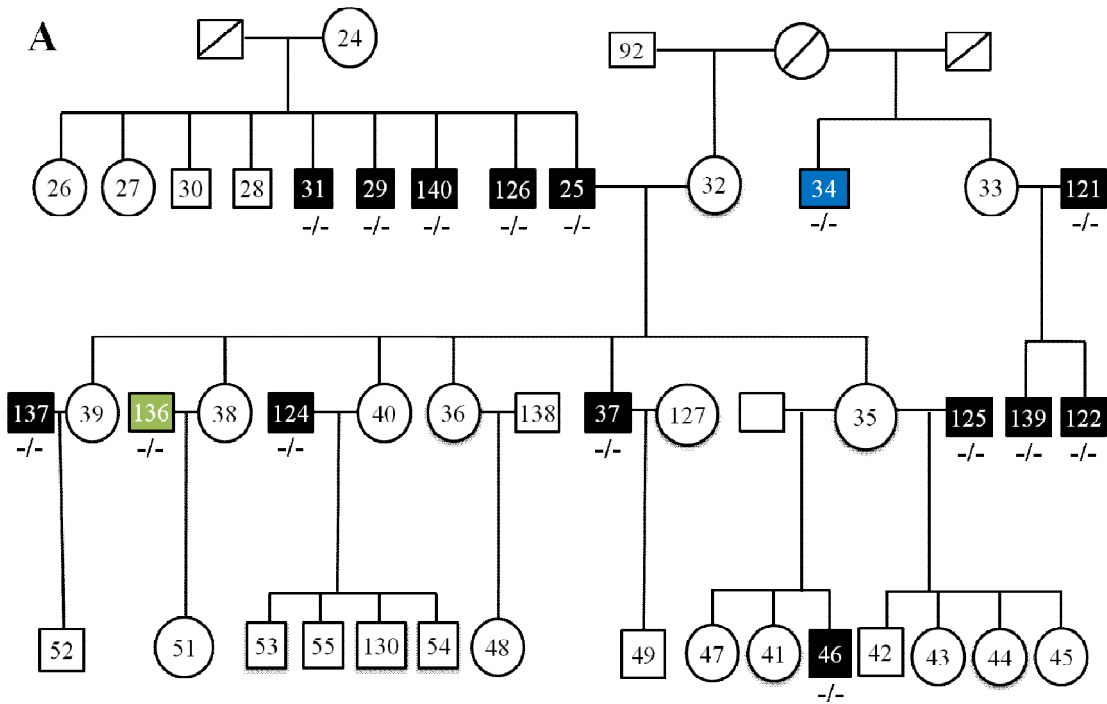


Figura 9: Heredograma da família A. Os indivíduos (quadrado, macho; círculo, fêmea) que tiveram PCRs positivas para nDNA e kDNA estão indicados pela cor preta. Aqueles indivíduos marcados na cor azul tiveram resultados negativos para nDNA e kDNA. E os casos na cor verde foram negativos para nDNA, mas foram positivos para kDNA. Quadrados e círculos em branco significam que não forneceram material para análises. A composição de sinais +/- indicados abaixo das amostras indica, respectivamente, positividade ou negatividade dos testes de imunofluorescência (IgM/IgG).

Na família B, composta por 15 indivíduos, foram colhidas 6 amostras de esperma para análises do nDNA e kDNA do *Trypanosoma cruzi* (Figura 10).

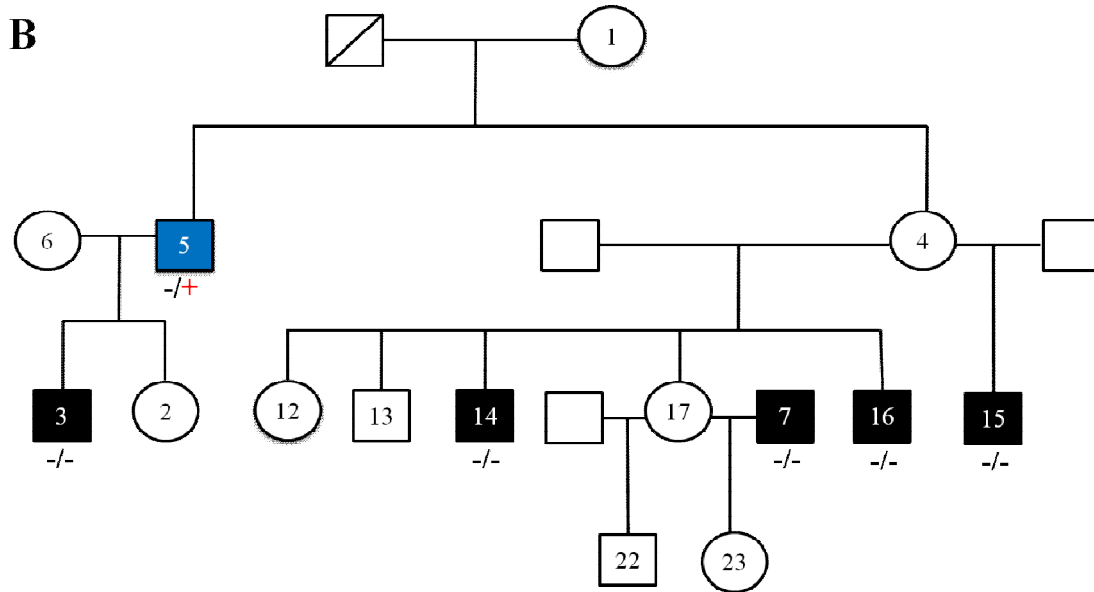


Figura 10: Heredograma da família B. A explicação para os dados do heredograma é a mesma da figura anterior. Em preto, resultados de PCR positivos para nDNA e kDNA. Em azul, casos que tiveram PCRs negativas para nDNA e kDNA. Indivíduos em branco não forneceram amostras para análises. Os sinais +/- abaixo das amostras referem aos resultados do teste de imunofluorescência (IgM/IgG).

A família C, composta de 29 indivíduos, forneceu oito amostras de sêmen para análises (Figura 11).

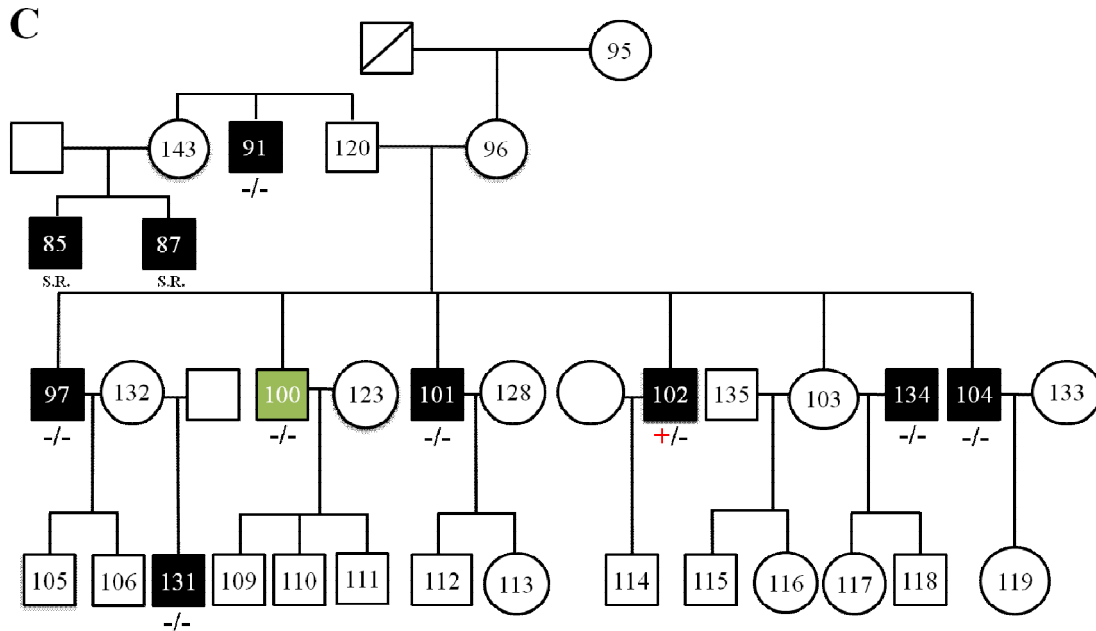


Figura 11: Heredograma da família C. Os indivíduos (quadrado, machos. Círculos, fêmeas) indicados pela cor preta tiveram PCRs positivas para nDNA e kDNA. Na cor azul, significa resultado negativo para nDNA e kDNA. Aqueles na cor verde tem resultado negativo para nDNA e positivo para kDNA. Os casos indicados na cor branca não forneceram material para exame. Os sinais abaixo das amostras indicam resultados dos testes de imunofluorescência (IgM/IgG). S.R., sem resultados.

A família D com 21 indivíduos forneceu 3 amostras de esperma para análises (Figura 12).

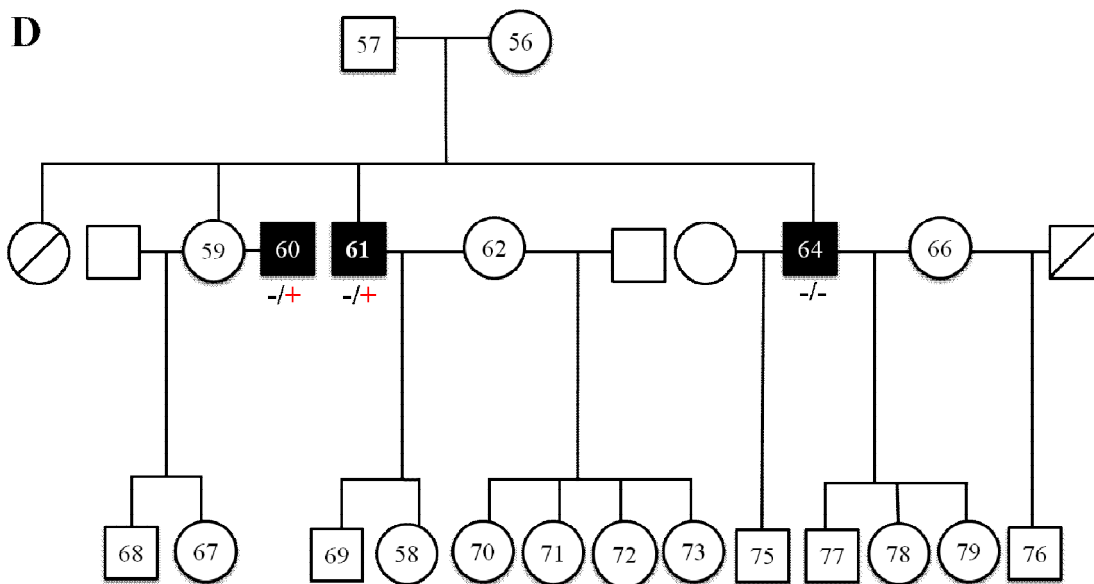


Figura 12: Heredograma da família D. Indivíduos (quadrado, machos. Círculos, fêmeas). Em preto resultados positivos para PCR de nDNA e kDNA. Indivíduos em branco não foram avaliados por esse estudo. Os sinais abaixo das amostras indicam resultados dos testes de imunofluorescência (IgM/IgG).

É interessante observar que 2 indivíduos das 4 famílias foram negativos nos testes PCRs de nDNA e de kDNA (paciente 5 da família B, e caso 34 da família A). Entretanto, o paciente 5 teve IFI positiva apresentando anticorpos IgG contra o *T.cruzi*. O paciente 100 da família C e 136 da família A não amplificaram TCZ, mas as PCRs foram positivas para kDNA e o teste IFI foi negativo. Vale notar que apenas quatro pacientes foram positivos pelo teste IFI; o caso 5 positivo para IgG como citado anteriormente, os casos 60 e 61 positivos para IgG e o caso 102 positivo para IgM. Destes os casos 60, 61 102 tiveram PCRs positivas para nDNA e para kDNA o que pode sugerir o curso da infecção na fase crônica. Também os pacientes 85 e 87 não tiveram exames sorológicos, mas os testes moleculares (PCR) confirmaram positividade para nDNA e kDNA.

3. Identificação de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas.

A *tpTAIL*-PCR foi utilizada para amplificar sequências de minicírculos integradas ao DNA haploide empregando *primers* específicos de kDNA do *T. cruzi* com *primers* específicos de LINE-1. A utilização de *primers* de kDNA mais internos a cada ciclo da PCR permitiu a eliminação dos produtos de baixa especificidade, formados na primeira amplificação. Ao final do terceiro ciclo, os produtos amplificados que hibridizaram com sonda específica de kDNA indicaram os amplicons de diferentes tamanhos que foram selecionados para ligação em vetor de clonagem (Figura 13).

Os produtos do terceiro ciclo da *tpTAIL*-PCR que apresentaram positividade para kDNA foram ligados a plasmídeos e transformados. Os transformantes foram submetidos à hibridização de colônias com sondas de kDNA e, após a seleção, as colônias que demonstraram melhores resultados (sinais fortes no filme) tiveram seus insertos analisados por digestão enzimática com *EcoRI*. Os clones com os maiores insertos foram enviados para o sequenciamento comercial.

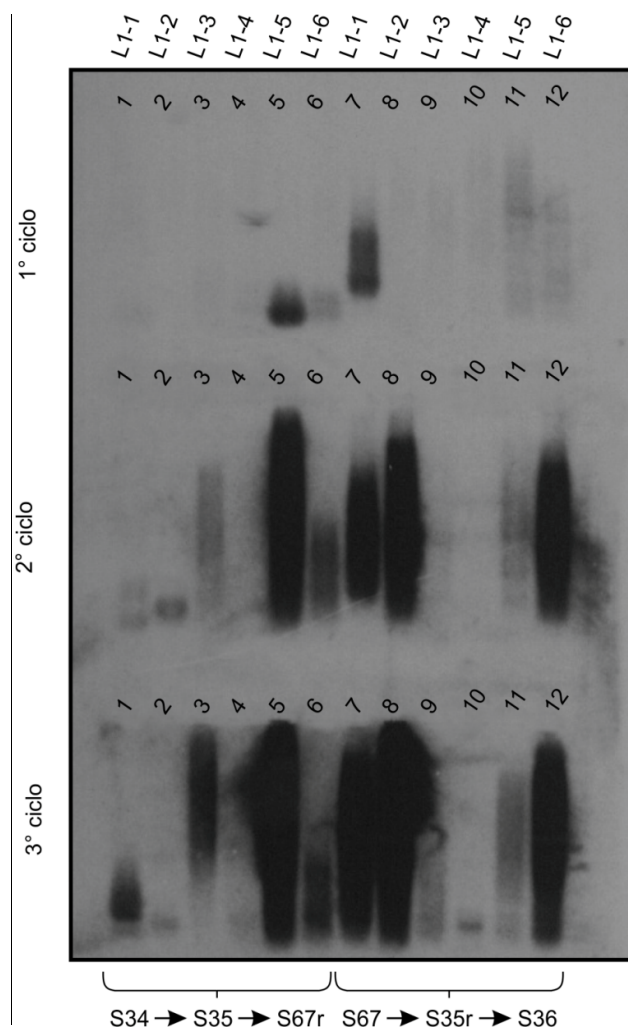


Figura 13: Southern Blot dos produtos da *tpTAIL*-PCR do paciente 46 hibridizados com sonda de kDNA. *tpTAIL* PCR 1, amplificação realizada com os primers L1-1 a L1-6 combinados com o par de *s* S34/S67. *tpTAIL*- PCR 2: após a primeira reação, os produtos foram diluídos com água Mili-Q na proporção 1:40 e reamplificados utilizando-se novamente os primers de L1-1 a L1-6 com o par de *primers* S35/S35R. *tpTAIL*-PCR 3: após a segunda reação os produtos desta foram diluídos na proporção 1/10 e reamplificados utilizando-se novamente os primers de L1-1 a L1-6 combinados com o par de *primers* S67R/S36.

Foram sequenciados 559 clones, dos quais 122 continham apenas o vetor ou tiveram um sequenciamento ruim, 188 apresentaram apenas DNA humano, 95 continham apenas kDNA, e 144 continham kDNA flanqueado pelo DNA hospedeiro. Em resumo, o rendimento da *tpTAIL*-PCR foi 32,95% (Tabela 6). Desses 144, após o alinhamento das sequências 2 clones se apresentaram idênticos a outras sequências do estudo, ou seja, era repetição de outro clone (casos FH 80 = FH 85 e FH 403 = FH 405). Entre os 53 de pacientes estudados, 38 apresentaram clones com integração de minicírculos de kDNA flanqueados por DNA humano. Em apenas 12 indivíduos das quatro famílias não foi possível obter sequências com o kDNA integrado no genoma (7 na família A, 2 na família B, 1 na família C e 2 na família D). Entre os 19 casos não agregados em família, apenas 3 não foi possível obter sequências com o kDNA integrado. Porém, nesses casos, talvez o baixo rendimento da *tpTAIL*-PCR e falhas no sequenciamento explique a baixa taxa de integração, em comparação com os casos vistos nas famílias. Os resultados da análise dos clones estão apresentados no Anexo IV.

Tabela 6: Rendimento das *tpTAIL*'s PCR.

Tabela de análise de rendimento dos clones com inserto	Nº de clones	% do total de clones
Clones contendo kDNA e Humano	144	32,95%
Clones contendo somente Humano	188	43,02%
Clones contendo somente kDNA	95	21,74%
Clones sem similaridade significativa com Humano/kDNA	10	2,29%
Clones iguais	2	0,36%

Em resumo, foram obtidos 142 clones que continham sequências de minicírculos do kDNA integrados no DNA haploide humano. A Figura 14 exhibe a topologia de um desses casos. O fenômeno de integração de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* foi observado na maioria dos homens das quatro famílias do estudo.

A

L1-6

```
1      TGGGAGCTGT ACACCGGAGC AAAGAAGGAA ACGTTCTTGA GGAGCAAAGT CTAAAAAACT
61     ACCCGCCTAG CTTCTTTTTC TATAGAAGTC TACTAATAGC TAGTCCTGCA AATTCCAAC
121    CATTCAAATA TGAGTATCAT AATGGTAAAA AACACAGCAA CTGTTCAAAG CCCTATTATA
181    AAAAAGTGGA GAGACAGCAG TACAACTTCC TTAATGACAA ACAAACATA CTTGAAAAAA
241    CAAAACAAAC AAACAAACAA CAATGCTAGC TACCAAGGAA GACCACACAA CAGTAAAAGA
301    AAACATCTGG GGAAGGGATG ACCAGATAAT GTACGGGTGA GATGCATGAT TTTTCGGGCC
361    CAAATTTGAA CGCCCCTCCC AAAACAGAAA TTCCAGAAA AATCTAACAC CAATTCATGA
421    CACACAACAA CCCAACATAA ACAACCACAC CTACCCTTTA ACCATACCAT ATCCATAGAC
481    AACCATCATT ATTAAACAAA CTAAGATCTA CTATAATAAC AATCGAAATT AACTAATAT
541    CTTCTCACAC ACATACCACT CTACAGTTAA TCCACAACAC ATCATCATAT GTTCACAACA
601    ATAACTCACA CAATCTAATT CTATGCTCTA GTCCTATATT ACACCAACCC CAATCGAACC
```

S36

B

[AC004134.1](#) Homo sapiens chromosome 17 Expect = 8e-154 Identities = 319/327 (98%), Gaps = 4/327 (1%).

[M19185.1](#) T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 1, Expect = 8e-21 Identities = 64/66 (97%), Gaps = 0/66 (0%).

Figura 14: Evento de integração de minicírculo de kDNA do *T. cruzi* no genoma de um paciente chagásico. A) Paciente 1669, clone FH-103. A sequência em azul

escuro representa uma região conservada de kDNA com *E-value*= 8e-21, a em azul claro a região variável. A sequência em verde representa o DNA humano na região hCIT.507_E_2, do cromossomo 17 ([AC004134.1](#)) com *E-value*= 8e-154. O trecho amarelo representa a região de micro-homologia (bases compartilhadas) entre os DNAs. Os primers utilizados na terceira reação da *tpTAIL*-PCR estão sublinhados.

B) Resultados da análise das sequências no banco de dados BLASTn. O alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados consultado está disponível no Anexo VI.

A Tabela 7 mostra a distribuição dos eventos de integração nos cromossomos, onde se verifica que as integrações não ocorreram apenas os cromossomos 15, 21 e Y.

Tabela 7: Distribuição das integrações de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* nos cromossomos de células haploides de adultos.

Cromossomo	FAMÍLIAS				Avulsos	Total
	A	B	C	D		
1	0	0	1	7	6	14
2	0	0	1	3	1	5
3	1	0	4	0	4	9
4	0	0	0	2	3	5
5	0	0	3	0	4	7
6	1	0	3	0	4	8
7	5	0	4	5	5	19
8	0	0	1	1	1	3
9	0	0	1	1	0	2
10	0	0	4	1	1	6
11	0	0	0	0	1	1
12	0	0	1	0	2	3
13	0	0	0	0	1	1
14	0	0	0	1	2	3
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	1	2
17	0	0	0	0	2	2
18	0	0	2	0	5	7
19	0	0	3	1	0	4
20	1	0	0	1	1	3
21	0	0	0	0	0	0
22	1	0	0	0	0	1
X	3	2	14	15	17	51
Y	0	0	0	0	0	0
Indeterminado	0	0	0	1	0	1
Total	12	2	42	40	61	157

A maioria dos eventos de integração foi registrada no cromossomo X, onde foram encontradas 32,5% das mutações. Este dado é semelhante ao obtido (Hecht, 2008; e Araujo, 2008). No nosso estudo, o *locus* AL732374.14 concentrou 83% das mutações de kDNA no cromossomo X. A Figura 15 mostra um evento de integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi*, com duas regiões de micro-homologias, no *locus* AL732374.14.

A

L1-5

```

1      TCCTGGTTTA GTCTTGGGAG GGTGTATGTG TATCAGAGCC TGGTTTTATT GGTCTATTCA
61     AAGATTCAAC TTCTTCCTGG TTTAGTCTTG GGAGGGTGGT TCAAATCTGG GGCCGAAAAA
121    TCATGCATCT CCCCCGTACA TTATATGGCC GAAAATGGGG ATTGTTTACG GGAGGTGAGG
181    TTCGATTGGG GTTGGTGTAT TCAGAGATTC AACTTCTTCC TGGTTTAGTC TTGGGAGGGT
241    GTATGTGTAT CAGAGCCTGT TATTGGTCTA TTCAAAGATT CAACTTCCTC CTGGTTTTGG
301    GAGGGGGGTT C
      S67 AS

```

B

M19188.1 *T. cruzi* kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4 Expect = 1e-39
Identities = 109/118 (92%), Gaps = 0/118 (0%).

AL732374.14 Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X
Contains a mitochondrial ribosomal protein S18C (MRPS18C) pseudogene, the
3' end of the PHF8 gene for PHD finger protein 8 and a CpG island, complete
sequence, Expect = 1e-38, Identities = 108/118 (92%), Gaps = 5/118 (4%).

Figura 15: Evento de integração de minicírculo de kDNA do *T. cruzi* no sítio preferencial do cromossomo X **A)** Clone FH-211 do paciente 87. A sequência em azul representa uma região conservada de kDNA integrado no *locus* AL732374.14 com *E-value*=1e-39, a sequência em verde representa o DNA humano com *E-value*= 1e-38. Os trechos amarelos representam as regiões de micro-homologia (bases compartilhadas) entre os DNAs. Os *primers* utilizados na última reação da *tpTAIL* PCR estão sublinhados. **B)** Resultados da análise das sequências no banco de dados BLASTn. O alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados consultado está disponível no Anexo VI.

3.1 Caracterização das sequências que flanquearam as integrações de kDNA no genoma humano.

Após a verificação da distribuição dos fenômenos de integração do kDNA do *T. cruzi* nos cromossomos humanos, foi feita uma análise detalhada das regiões que flanqueiam os eventos de integração para verificar se havia preferência a sítios específicos do genoma humano. Notamos que as integrações ocorreram predominantemente em retrotransposons da família LINE, o que representou 56,63% dos clones sequenciados (Figura 16). O *locus* AL732374.14, identificado como o sítio preferencial de integração do kDNA no cromossomo X, foi caracterizado como

um elemento do tipo LINE-1. Em relação à retrotransposons não autônomos, houve apenas um evento de transposição por essa via através do elemento Alu, o clone FH- 544, do paciente 1686. Em 9 clones verificamos o kDNA flanqueado por genes, onde podemos chamar atenção para 4 desses (FH-69, FH-315, FH-377 e FH-497), que apresentaram kDNA associado a genes pertencentes à família das quinases. De interesse, o clone FH-126 apresentou integração de minicírculos de kDNA junto ao gene do receptor olfatório OR6K2. Em 22,9% dos clones, não foi possível determinar o *locus* de integração mesmo após pesquisa em banco de dados (GIRI) por falta de informações sobre as regiões em questão, ainda que esses *loci* tivessem *E-value* significativo e identidade relevante com cromossomos humanos. Esses casos foram depositados na tabela como *locus* indeterminado (Anexo IV). Em 24 clones foram identificadas outras famílias de retroelementos (retrovírus endógenos) flanqueando o kDNA integrado no genoma humano, como por exemplo, no clone FH-255 do paciente 101 que além do elemento LINE foi flanqueado também pelo retrovírus endógeno MER45 contido na sequência do DNA humano (Figura 17).

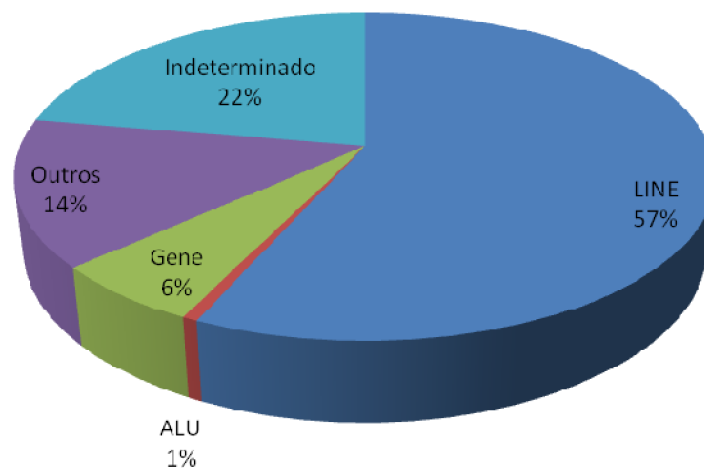


Figura 16: Distribuição dos sítios de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma dos pacientes analisados.

A

L1-2

```
1      TCCCAAGACT AAACCAGGAG GAAGTTGAAT CTTTGAATAG ACCAAATTAA AGGCTCTGAT
61     ACACATACAC CATCCCAAGA CTAAACCAGG AAGAAGTTGA ATCTCTGAAT ACACCAACCC
121    CAATCGAACC TCACCTCCCG TAAACAATCC CCATTTTCGG CCATATAATG TACGGGTGAG
181    ATGCTATATG AAGCTTCATA TTAATAAGTA GAAAGTTTTG ATAGAAGACA AAATCAGAAA
241    CTGTGAGTCA GTCCATGATA CCATTACAGT ATATCCAAAT GTGACACTAC ATTCTTTACT
301    GGCTTATCTT AGTTTTGACC CCAAAGGGCT CAGCATCACA TATTTATGTC TGGGGCACTG
361    GTGCTGGCTG TCTACCATCA GATACCCTGA CAAGTCCTTG AGAGCTGGAA GCTTTCCTAT
421    ATTGTCCACT GTTCTTTTCA AGATCTGCTA CATAATCCAT GGGGCCAGT GCAAAATGAA
481    TATTAATAAT TTTAAGATAA CAACAACAGA GCACTGAGCC AAGGGTGGGG ACCTTCCAAG
541    CACAAGGCCC TATATATCAA CATAAGTCAT CCCCTAGGAA GTCAGCTGTC TCTACTTCCA
601    ATGTCTAGAA TATTACAGGG CACGAAGTGG GGGTTCGATT
```

B

AL161804.4 Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-409I10 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human), complete sequence, Expect = 0.0 Identities = 452/453 (99%), Gaps = 0/453 (0%).

M19188.1 T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4, Expect = 5e-23 Identities = 71/75 (95%), Gaps = 0/75 (0%).

Figura 17: A) Integração de minicírculo de kDNA no genoma humano do paciente 101, clone FH-255. Verde, DNA humano, com $E\text{-value}=0.0$; a região sublinhada refere-se ao *primer* de LINE1. Em azul, kDNA de *T.cruzi* com $E\text{-value}=5e-23$; amarelo; região de micro-homologia; e, em vermelho, sequência do retrovírus endógeno MER45 o qual apresentou Score=537 (Giri). **B)** Resultados da análise das sequências no banco de dados BLASTn. O alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados consultado está disponível no Anexo VI.

4. Análise da formação de novas ORF's (Fases de leitura aberta)

Com base nas informações de trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Nitz e cols, 2004; Simões Barbosa e cols, 2006 e Hetch, 2008) que demonstraram a possibilidade de formação de fases de leitura aberta (ORFs) quiméricas, resultantes dos eventos de integração do kDNA no genoma do hospedeiro, foi realizado uma busca *in silico* de possíveis ORFs nas sequências contidas nos 142 clones estudados. A pesquisa revelou a presença de 178 ORFs quiméricas hipotéticas, formadas por sequências pertencentes ao parasito e ao hospedeiro humano (Figura18)

SEQ DNAMAN1: 649 bp;
 Composition 142 A; 79 C; 163 G; 265 T; 0 OTHER
 Percentage: 21.9% A; 12.2% C; 25.1% G; 40.8% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 201.46 dsDNA: 400.0
 ORIGIN

S36

```

1      GGTTCGATTG GGGTTGGTGT AATATAGTGA TGGGCGGTTA ATTATGATAA TTTGTTATGT
61     GTGGTTTTGA TAATGTTTCG TTTGTTAGTG GTGGTTATAG TGTATAAGAG TACGCTATGT
121    AGGAATGATG AGTTATAGTG TGCAATAGAG TGTGTATTAT GTTGTAAGA GTGTAAGTTA
181    TAAAATGTTA TAGGTTGTTT GGGTGATGGT TGTGTATAGG TTATGTGTAG GTTAAAATTG
241    GAGTCTTGAA AACTGGAATT CTTGGTTTTG GGAGGGGCGT TCAACTTTCA GGGCCCAAAT
301    TCATGCATCT CACCCGTACA TTA CTGGTC ATCCCTTCCC CAGATGTTTT CTTTTACTGT
361    TGTGTGGTCT TCCTTGGTAG CTAGCATTGT TGTGTTGTTG TTTGTTTGT TTTTTCAAGT
421    ATGTTTTGTT TGCATTAAG GAAGTTGTAC TGCTGTCTTT CCACTTTTTT ATAATAGGGC
481    TTTGAACAGT TGCTGTGTTT TTTACCATTA TGATACTCAT ATTTGAATGA GTTGGAAATTT
541    GCAGGACTAG CTATTAGTAG ACTTCTATAG AAAAGGAAGC TAGGCGGGTA GTTTTTTAGA
601    CTTTGCTCCT CAAGAACGTT TCCTTCTTTG CTCCGGTGTA CAGCTCCCA

```

L1-6

Figura 18: Formação de ORF quimérica putativa no clone FH-102 proveniente do paciente 1669. Sequência que demonstra a integração de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em LINE-1 humano. A região em azul é referente à região do kDNA integrada, em verde o DNA humano do LINE-1 no cromossomo 17 (AC004134.1). A região da ORF quimérica está sublinhada pela seta preta, abrangendo desde o início até seu final. Os *primers* utilizados para esse evento estão sublinhados no início e no final da sequência. Esse clone não apresentou similaridade significativa após análise no banco de dados BLASTx.

Após a determinação das novas ORFs quiméricas formadas no evento de integração de minicírculos de kDNA no genoma humano foi realizada uma busca de possíveis homologias em banco de dados utilizando o algoritmo BLASTx e os resultados dessa análise encontram-se sumarizados na tabela do ANEXO V.

Ao analisar essas novas fases de leitura aberta, verificamos que ao contrário do obtido por Hetch (2008), que a maioria das sequências apresentavam homologias com 35 novas proteínas hipotéticas depositadas no referido banco de dados com *E values* significativos, onde chamamos a atenção para o *locus* CAR 63099.1, o qual representou aproximadamente 28% das proteínas hipotéticas analisadas nos 142 clones contendo eventos de integração do kDNA. É importante chamar a atenção para 2 casos; o clone FH-126 do paciente avulso 1684 onde se formou uma nova ORF associada ao membro 2 da família 6, subfamília k do gene do receptor

olfatório OR-17, o qual pertence a uma família composta por 339 genes intactos e 297 pseudogenes que são distribuídos em 172 subfamílias, sendo 60% idênticos em suas sequências proteicas (Malnic e cols, 2004). Não menos interessante, o clone FH-513 do caso 1667 que apresentou uma nova fase aberta de leitura abrangendo um domínio putativo conservado do gene da Atrofina-1, a qual é evolutivamente conservada e funciona como um regulador transcricional. Mutações nesse gene são associadas a uma doença neurodegenerativa dominante (Shen e cols, 2007). Portanto, é fundamental que mais estudos sejam realizados a fim de que se obtenha informações sobre as consequências do fenômeno de integração do kDNA na expectativa de identificar os mecanismos que desencadeiam a doença e também verificar as implicações das alterações genóticas e fenotípicas desses eventos.

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a região amazônica brasileira como uma área endêmica em expansão para a doença de Chagas, apresentando um perfil epidemiológico divergente de outras áreas, pois os casos notificados até então, ocorrem em sua maioria como micro-epidemias atribuídas à transmissão por via oral. A região possui características que podem agravar a situação epidemiológica, como o desmatamento descontrolado, que pode favorecer a adaptação das diversas espécies de triatomíneos sinantrópicos ao ciclo doméstico ou peridomiciliar (Coura e Cols, 2002).

O diagnóstico molecular dos pacientes demonstrou na maioria dos casos estudados, tanto no grupo das famílias, quanto no grupo dos casos avulsos, a presença de DNA nuclear do parasito, corroborando a possibilidade da transmissão por via sexual. Outro dado importante foi verificado em 2 casos das famílias (pacientes 100 e 136), com a identificação de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma do hospedeiro. Essas amostras tiveram resultados de PCR's negativos para nDNA e testes sorológicos (IFI) negativados, o que sugere que esses indivíduos possam ter herdado as mutações, reforçando a hipótese de transferência vertical do kDNA.

A análise das sequências obtidas na *tpTail*-PCR, possibilitou a identificação de várias sequências contendo minicírculos de kDNA de *T. cruzi* integrados no genoma humano. O perfil das integrações de kDNA encontradas nas amostras da região amazônica foi semelhante às características descritas em estudos prévios, conduzidos em populações provenientes de outras regiões brasileiras (Hecht e cols, 2010). O fenômeno da integração ocorreu em quase todos os cromossomos, no entanto, foram identificados sítios preferenciais, em *locus* específicos nos cromossomos 1, 7 e X. A análise de bioinformática revelou que esses sítios preferenciais de integração são elementos retrotransponíveis da família LINE-1, confirmando os dados anteriores (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011).

A busca de ORFs possibilitou a identificação de 178 novas ORFs hipotéticas nas sequências analisadas. Todas essas ORFs são formadas por sequências provenientes do kDNA do parasito e por sequências pertencentes ao DNA do

hospedeiro, o que caracteriza uma sequência quimera. A presença de putativas ORFs quimeras é um achado frequente nas sequências com integração do kDNA e pode estar associado com os mecanismos de patogênese da doença de Chagas.

A aquisição de kDNA pelo material genético do homem, decorrente da infecção natural pelo *T. cruzi*, é um fenômeno que tem implicações no processo coevolutivo entre o parasita e seu hospedeiro. Eventos de integração de DNA exógeno estão associados à remodelagem dos genomas, possibilitando alterações na expressão gênica e favorecendo a formação de proteínas quiméricas. É fundamental aprofundar os estudos sobre os mecanismos de integração do kDNA e suas consequências, no interesse de ampliar os conhecimentos à respeito dos mecanismos responsáveis pela geração das lesões teciduais presentes na doença de Chagas.

VI. PERSPECTIVAS

Esse trabalho contribuiu para melhorar a compreensão da doença de Chagas na região amazônica brasileira, fornecendo parâmetros evolutivos e agregando dados epidemiológicos, que podem auxiliar na caracterização do perfil da doença. No entanto, mais estudos devem ser realizados no âmbito de se traçar estratégias para o combate e prevenção a essa endemia e também para elucidar:

- Os mecanismos moleculares que participam da integração do kDNA no genoma dos hospedeiros, principalmente humano;
- Como as integrações do kDNA no genoma humano estão envolvidas na patogênese da doença de Chagas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO, N. V.; SHIKANAI, Y.M.A., AMATO, V.S. **Doença de Chagas Aguda. In: Dias JCP Coura JR (eds) Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p.127-133, 1997.**

ANDRADE, Z.A. **Imunopathology of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. V 94(1): 71-80, 1999.**

ANDERSSON, J. **Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. Trends in parasitology. V 20(2): 52-3, 2004.**

ARAUJO, P.F.. **Herança vertical de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma de células germinativas humanas. Dissertação, Universidade de Brasília, 2008.**

ARGAÑARAZ, E.R. **Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elemento L1 no genoma da célula hospedeira. Tese, Universidade de Brasília, 1996.**

BABUSHOK, D.V; KAZAZIAN H.H. **Progress in Understanding the Biology of the Human Mutagen LINE-1. Human Mutation. V 0: 1-13, 2007.**

BARBOSA-FERREIRA, J.M.; GUERRA, J.A.O; SIMOES, F.S.F.; MAGALHAES, B.M.L.; COELHO, I.A.R.C.L.; BARBOSA, M. G. V.. **Envolvimento cardíaco em casos de Chagas aguda da doença na região amazônica. Arq. Bras. Cardiol. vol.94 no.6, 2010.**

BERALDI, R; PITTOGGI, C; SCIAMANNA, I; MATTEI, E; SPADAFORA, C. **Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. Mol Reprod Dev . V 73:279–287. 2006.**

BIEMONT, C; VIEIRA, C. **What transposable elements tell us about genome organization and evolution: the case of *Drosophila*.** *Cytogenet Genome Res.* V 110 (1-4): 25-34, 2005.

BONAMETTI, A.M; CASTELO-FILHO, A; RAMOS, L.R; BALDY, J.L.S; MATSUO, T. ***Trypanosoma cruzi* infection in blood donors.** *Journal of Public Health.* V 32(6): 566-71, 1998.

BOUCHER, Y.; DOUADY, C.J.; PAPKE, R.T.; WALSH, D.A.; BOUDREAU, M.E. R.; NESBØ, C. L.; CASE, R.J.; DOOLITTLE, W.F. **lateral Gene Transfer and The Origins of Prokaryotic Groups.** *Annu. Rev. Genet.*, 37:283–328, 2003.

BRACKETT, B.G; BARANSKA, W; SAWICKI, W. **Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:353-357, 1971.

BRENER, Z. **Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82 (1): 205-213, 1987.

BRENER, Z; ANDRADE, Z; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** *Guanabara Koogan, 2ª edição,* 2000.

BRINSTER, R.L; SANDGREN, E.P; BEHRINGER, R.R; PALMITER, R.D. **No simple solution for making transgenic mice.** *Cell,* 59:239-241, 1989.

BURLEIGH, B.A. **Probing *Trypanosoma cruzi* biology with DNA microarrays.** *Parasitology.* V 128: S3-S10, 2004.

BURNS, K.H; BOEKE, J.D. **Human transposon tectonics.** *Cell.* 11;149(4):740-52, 2012

BUSTAMANTE, J.M; RIVAROLA, H.W; FÉRNANDEZ, A.R; ENDERS, J.E; FRETES, R; PALMA, J.A; PAGLINI-OLIVA, P.A. **Indeterminate Chagas Disease:**

***Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy.** *Clinical science.* V 104: 415-420, 2003.

CARTER, K.L; ROBERTSON, B.C; KEMPENAEERS, B. **A differential DNA extraction method for sperm on the perivitelline membrane of avian eggs.** *Reproductive Biology and Behaviour Group, MPG Research Center for Ornithology, Postfach 1564, D-82305, 2000.*

CARVALHO, L.O.P.; ABREU-SILVA, A.L.; HARDOIM, D.J.; TEDESCO, R.C.; MENDES, V.G.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CALABRESE, A.S. **Trypanosoma cruzi and myoid cells from seminiferous tubules: Interaction and relation with fibrous components of extra cellular Matrix in experimental Chagas' disease.** *Int. J. Exp. Path.* 90, 52–57, 2009.

CASSE, N; BUI, Q.T; NICOLAS, V; RENAULT, S; BIGOT, Y; LAURIER, M. **Species sympatry and horizontal transfers of *Mariner* transposons in marine crustacean genomes.** *Molecular Phylogenetics and Evolution.* V 40: 609-619, 2006.

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

CHAGAS, C. **Possibilidade de ser o tatu um depositário de *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (nota prévia).** *Brazil-Med.* 30, 305–306, 1912.

CHAGAS, C. **Infection Naturelle des Singes du Pará (*Chrysotrix sciureus*), par *Trypanosoma cruzi*.** *C. R. Soc. Biol.* 90, 873–876, 1924.

CHOI, I.G.; KIM, S.H. **Global extent of horizontal gene transfer.** *Proc. Natl. Acad. of Sc.i USA.* 104: 4489–4494, 2007.

COURA J.R., BARRET T.V., NARANJO M.A. **Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção.** *Rev Soc Bras Med Trop*, 27:251-253, 1994.

COURA J.R.; JUNQUEIRA, ANGELA C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. **Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil.** *Trends in Parasitology*, Vol.18, No.4, 2002.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 45 no.3, 2012.

DAVIS, C.C; WURDACK, K.J. **Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales.** *Science.* V 305 (5684): 676-678, 2004.

DEANE, M.P.; DAMASCENO, R. **Encontro de *Panstrongylus lignarius* naturalmente infectado por tripanosoma do tipo *cruzi* e algumas notas sobre a sua biologia.** *Rev. Serv. Saúde Publ.* 2, 809–814, 1949.

DEININGER, P.L; MORAN, J.V; BATZER, M.A; KAZAZIAN H.H.Jr. **Mobile elements and mammalian genome evolution.** *Curr. Opin. in Gen. & Dev.*13: 651 – 658, 2003.

DEININGER, P.L.; BATZER M. **Alu Repeat and Human Disease.** *Mol. Genet. Metabol.*, 67: 183 – 193, 1999.

DIAS, J.C.P. **História natural.** In: Cançado J.R.; Chuster, M. (eds), **Cardiopatia Chagásica.** *Fundação Carlos Chagas de Pesquisa Médica. Belo Horizonte*, p.9-113, 1985.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. **The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review.** *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, v. 97(5), 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P.; BASTOS, C.; ARAUJO, E.; MASCARENHAS, A.V.; NETTO, E.M.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAUJO, R.F.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; ARAS, R. **Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(3):296-30, 2008.

DOOLITTLE, W.F.; BAPTESTE, E. **Pattern pluralism and the Tree of Life hypothesis.** *Proc Natl Acad Sci. USA* 104: 2043–2049, 2007.

FERREIRA M.S, LOPES E.R, CHAPADEIRO E, DIAS J.C.P; LUQUETTI A.O. Doença de Chagas. In: VERONESI R, FOCACCIA R. **Tratado de infectologia.** São Paulo: Ed. Atheneu, p.94-106, 1997.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Doença de Chagas. Mecanismos de transmissão.** Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas>.

GADELHA, A.A.M; VERÇOSA, A.F.A; LORENA, V.M.B; NAKAZAWA, M; CARVALHO, A.B; SOUZA, W.V; FERREIRA, A.G.P; SILVA, E.D; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S; GOMES, Y.M. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test.** *Vox Sanguinis.* V 85: 165-170, 2003.

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

GRAY, M.W. **Evolution of organellar genomes.** *Current Opinion in Genetics & Development.* V 9: 678-687, 1999.

HECHT, M.M. **Transferência horizontal de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e herança vertical das mutações.** Tese, *Universidade de Brasília*, 2008.

HECHT, M.M; NITZ, N.; ARAUJO, P.F.; SOUSA, A.O.; ROSA, A.C.; GOMES, D.A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A.R.L. **Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts.** *PLoS One.* 5(2): e9181, 2010.

HEDGES, D.J; BATZER, M.A. **From the margins of the genome: mobile elements shape primate evolution.** *BioEssays.* V 27:785–794, 2005.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. **The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination.** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e 300, 2008

IMASE, A; OHMAE, H; IWAMURA, Y; KIRINOKI, M; MATSUDA, H. **A comparative study on mouse MHC class I sequences detected in Schistosoma japonicum recovered from BALB/c (H-2d) and C57BL/6 (H-2b) mice.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* V 35 (1): 8-10, 2004.

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

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

KAZAZIAN, H.H; GOODIER, J.L. **LINE Drive: Retrotransposition and Genome Instability.** *Cell.* V 110: 277–280, 2002.

KEELING, P.J., PALMER, J.D. **Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution.** *Nature Rev.* 9: 605–618, 2008.

KLINGBEIL, M.M; ENGLUND, P.T. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication.** *PNAS.* V 101(13): 4333-4334, 2004.

LAINSON R, SHAW J.J, FRAIHA H, MILES M.A, DRAPER C.C. **Chagas' Disease in the Amazon Basin: 1 – Trypanosoma cruzi infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil.** *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73:193-204, 1979.

LANA, M; TAFURI, W.L. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** In: NEVES, DP; MELO, AL; GENARO, O; LINARDI, PM. *Parasitologia Humana*. 10^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p.73-96, 2000.

LANDER, E.S; LINTON, L.M; BIRREN, B; NAUSBAUM, C; ZODY, M.C; BALDWIN, J; DEVON, K; DEWAR, K; DOYLE, M; FITZHUGH, W. **Initial sequencing an analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium.** *Nature*. V 409: 860-921, 2001.

LAURIA-PIRES, L.; CASTRO, C.N. Tratamento. In: Teixeira, A. R. L. **Doença de Chagas e evolução.** Brasília, Editora UnB,. p. 167-180, 2007.

LAVITRANO, M; CAMAIONI, A; FAZIO, V.W; DOLCI, S; FARACE, M.G, et al. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs-genetic transformation of mice.** *Cell*. 57:717-723, 1989.

LEE, J; CORDEUX, R; HAN, K; WANG, J; HEDGES, D.J; LIANG, P; BATZER, M.A. **Different evolutionary fates of recently integrated human and chimpanzee LINE-1 retrotransposons.** *Gene*. V 10.1016: 1-10, 2006.

LEWIN, B. **Genes VII.** Atmed Editora, 7^a edição, 2001.

LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, S.A; AGBO, E.E.C; ENGLUND, P.T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *Trends in Parasitology*. V 21(8): 363-369, 2005a.

LIU, Y.G; WHITTIER, R. **Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking.** *Genomics*. V 25 (3): 674-81, 1995.

LUQUETTI, O; RASSI, A. Em BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRALNETTO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MALNIC, B; GODFREY, P.A; BUCK, L.B. **The human olfactory receptor gene family**. *PNAS*. V 101 (8): 2584-2589, 2004.

MARTIN, S.L. **The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition**. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. V 2006: 1-6, 2006.

MATTA, A. **Um novo Reduvídeo do Amazonas. *Rhodnius brethesi* n. sp.** *Amazonas Med.* 2, 93–94, 1919.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Consenso brasileiro em doença de chagas**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, Suppl. III, p. 12-14, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos**. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Doença de Chagas: aspectos clínicos**. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>.

MONCAYO, A. **Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries**. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 98(5), p. 577-591, 2003.

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

MOWER, J.P; STEFANOVI, S; YOUNG, G.J; PALMER, J.D. **Gene transfer from parasitic to host plants.** *Nature.* V 432: 165-166, 2004.

NITZ, N; GOMES, C; ROSA, A.C; SOUZA-AULT, M.R; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, R.J; TEIXEIRA, A.R. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell.* V 118 (2): 174-186, 2004.

PÉREZ-MORGA, D; ENGLUND, PT. **The Attachment of minicircles to Kinetoplast DNA networks during replication.** *Cell,* 74: 703-711, 1993.

PINEDA J.P, LUQUETTI A. **Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas.** *Rev Soc Bras Med Trop;* 31:473-80, 1998.

PINTO, A.Y.N., HARADA, G.S., VALENTE, V.C., ABUD, J.E.A., GOMES, F.S., SOUZA, G.C.R., VALENTE, S.A.S. **Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 34, p. 413-419, 2001.

PINTO A.Y.N., VALENTE S.A.S., VALENTE V.C. **Emerging Acute Chagas Disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement.** *Braz J Infect Dis,* 6:458-464, 2004.

PIRARD, M; LIHOSH I.N; BOELAERT, M; BASANTA, P; LOPEZ, F; VAN DER STUYFT, P. **The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region.** *Transfusion,* 45, p. 554-561, 2005.

PITTOGGI, C; SCIAMANNA, I; MATTEI, E; BERARDI, R; LOBASCIO, A.M; MAI, A; QUAGLIA, M.G; LORENZINI, R; SPADAFORA, C. **A role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development.** *Mol Reprod Dev.* V66:225–236, 2003.

PRATA, A. **Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease.** *The Lancet Infectious Diseases.* V 1: 92-100, 2001.

RASSI A.JR.; A, RASSI; MARIN-NETO, J.A. **Chagas disease.** *Lancet.* 375:1388-402, 2010.

RASSI A.JR.; A, RASSI; RESENDE, J.M. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).** *Infectious Disease Clinics of North America. Tropical Diseases.* V.26, Issue 2, 275–291, 2012.

REY, L. **Parasitologia:** parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2001.

RIBEIRO, S.R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SANTANA SILVA, J.; SAVINO, W.; MENGEL, J. **Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.** *J. exp. Med.* V 175: 29-39, 1992.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Second Edition. Cold Spring Harbor NY, 1989.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Third Edition, Chapter 6. *Cold Spring Harbor NY*, pp 7-12, 2001.

SANTOS-BUCH, C.A. & TEIXEIRA, A.R.L. - **The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** *J. exp. Med.* V 140: 38-53, 1974.

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

SCHOFIELD, CJ; JANNIN, J; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control.** *Trends Parasitol* n° 12, 22:583-8, 2006.

SCHRÖDER, ARW; SHINN, P; CHEN, H; BERRY, C; ECKER, JR; BUSHMAN, F. **HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots.** *Cell.* V 110: 521-529, 2002.

SCIAMANNA, I; BARBERI, L; MARTIRE, A; PITTOGGI, C; BERARDI, R; GIORDANO, R; MAGNANO, A; HOGDSON, C; SPADAFORA, C. **Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information.** *Elsevier.* V 312:1039–1046, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas.** *Rev Soc Bras Med Trop,* 38 (supl III):30, 2005.

SELEME, M.C; VETTER, M.R; CORDAUX, R; BASTONE, L; BATZER, M.A; KAZAZIAN, H.H. **Extensive individual variation in L1 retrotransposition capability contributes to human genetic diversity.** *PNAS.* V 103 (17): 6611-6616, 2006.

SHAW, J.; LAISON, R; FRAIHA, H. **Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de Doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil.** *Rev. Saúde públ., S. Paulo,* 3(2): 153-157, dez. 1969.

SHEN, Y.; LEE, G.; CHOE, Y.; ZOLTEWICZ J.S.; PETERSON, A.S. **Functional Architecture of Atrophins.** *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, NO. 7, pp. 5037–5044, 2007.

SILVEIRA, A.C. **Situação do controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;* 30 (supl I):42, 1997.

SIMÕES-BARBOSA, A. **Transferência horizontal de seqüência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para transposon LINE-1 e alteração da expressão do gene p9 na célula hospedeira.** *Tese, Universidade de Brasília,* 2000.

SIMÕES-BARBOSA, A; ARGANARAZ, E.R; BARROS, A.M; ROSA, A.C; ALVES, N.P; LOUVANDINI, P; D'SOUZA-AULT, M.R; NITZ, N; STURM, N.R; NASCIMENTO, R.J; TEIXEIRA, A.R. **Hitchhiking Trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (8): 833-43, 2006.

SMIT, A.F. **The origin of interspersed repeats in the human genome.** *Curr. Opin. Genet.,* 6: 743-748, 1996.

SPADAFORA, C. **Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation.** *Bioessays.* V 20 (11): 955-964, 1998.

SPADAFORA, C. **A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes.** *Syst Biol Reprod Med.* 54 (1):11-21, 2008a.

SPADAFORA, C. **Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information.** *Human Reproduction,* pp. 735–740, 2008b.

STANHOPE, M.J.; LUPAS, A.; ITALIA, M.J.; KORETKE, K.K.; VOLKER, C.; BROWN, J.R.; **Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfers from bacteria to vertebrates.** *Nature* 411, 940-944, 2001.

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

TEIXEIRA, A.R.L.; ROTERS, F.; MOTT, K. E. **Acute Chagas de disease.** *Gazeta Médica da Bahia,* 70, p. 176-186, 1970.

TEIXEIRA, A.R.L; TEIXEIRA, M.L; SANTOS-BUCH, C.A. **The immunology of experimental Chagas' disease - IV. Production of lesions in rabbits** 131

similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Path.* V 80: 163-180, 1975.

TEIXEIRA, A.R; ARGANÁRAZ E.R; FREITAS JR, LH; LACAVALA, Z.G.M. **Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mutat. Res.* 305: 197–209, 1994.

TEIXEIRA, A.R.L; ARGANÁRAZ, ER; FREITAS, JR; LAÇAVA, ZGM; SANTANA, JM; LIU, YG; ZHAO, S; BAILEY, JA; SAHINALP, SC; ALKAN, C; TUZUN, E; GREEN, ED; EICHLER, EE. **Analysis of Primate Genomic Variation Reveals a Repeat-Driven Expansion of the Human Genome.** *Genome Research.* V 13: 358-368, 2003.

TEIXEIRA, A.R.L; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (5): 463-491, 2006.

TEIXEIRA, A.R.L. Patologia da doença de Chagas humana. In: **Doença de Chagas e evolução.** Brasília, Editora UnB, 2007. p. 89-101, 2007.

TEIXEIRA, A.R.L.; HECHT, M.M.; GUIMARO, M.C., SOUSA, A.O.; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity.** *Clinical Microbiology Reviews.* p. 592–630, 2011.

TEIXEIRA, A.R.L; GOMES, C; NITZ, N; SOUSA, A.O; ALVES, R.M; GUIMARO, M.C; CORDEIRO, C; BERNAL, F.M; ROSA, A.C; HEJNAR, J; LEONARDECZ, E; HECHT, M. ***Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism.** *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 5(3): e1000, 2011.

VALENTE S.A.S; FRAIHA N.H.; LEÃO R.N.Q.; MILES M.A. **Doença de Chagas. In RNQ Leão, Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico,** Ed. CEJUP, p. 597-610, 1997.

VEXENAT, A.C; SANTANA, J.M; TEIXEIRA, A.R. **Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, p. 177-185, 1996.

VIANNA G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3, 276–292, 1911.

VIRREIRA, M; TORRICO, F; TRUYENS, C; ALONSO-VEGA, C; SOLANO, M; CARLIER, Y; SVOBODA, M. **Comparison of PCR methods for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection.** *Rev Soc Bra Méd Trop.* V 38 (2): 65-67, 2005.

WINCKER, P.; BOSSENO, M.F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M.A.; MOREL CM; BRENIERE SF. **High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area.** *FEMS microbiol*;124:419-24, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION ON BEHALF OF THE SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES. **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**, 17 a 20 de abril de 2005, Buenos Aires, Argentina, 2007.

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

WRIGHT, S.; FINNEGAN, D. **Genome evolution: Sex and transposable elements.** *Current Biology*, 11: R296-R299, 2001.

ANEXO I



FUNDAÇÃO PÚBLICA ESTADUAL
HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAS VIANNA
GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA




Belém, 21 de maio de 2009.

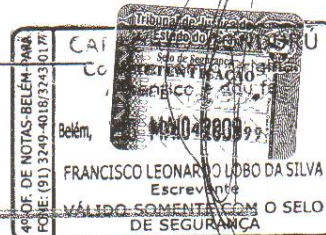
PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Protocolo: Nº 054/2009 - CEP/FHCGV
2. Projeto de Pesquisa: "ASSOCIAÇÃO DE LOCI DAS MUTAÇÕES DE KDNA DE TRYPANOSSOMA CRUZI NO GENOMA COM PROGNÓSTICO DO CHAGÁSICO DA AMAZÔNIA"
3. Pesquisador Responsável: Adriana de Jesus Benevides de Almeida
4. Instituição/Unidade: Fundação Pública Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna
5. Data de Entrada: 08/05/2009
6. Data do Parecer: 21/05/2009

PARECER: O Comitê de Ética em Pesquisa da FHCGV analisou o Projeto supracitado e, conforme Parecer datado de 21/05/2009 emitido por este CEP, verificou que foram atendidas todas as adequações recomendadas de acordo com as normas da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**


Helder José Lima Reis
Coordenador do CEP/FHCGV



CEP/FHCGV

Tv. Alferes Costas s/n – Pedreira – Belém (PA) – CEP: 66087-660
Fone/Fax: (091)3276-1770
E-mail: gepfhcgv@yahoo.com.br

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO: Associação de loci das mutações de kDNA de *T. cruzi* no genoma com prognóstico do chagásico.

Informação ao paciente

Estamos pedindo seu consentimento para participar voluntariamente em um estudo sobre a Doença de Chagas. Nós queremos saber como a pessoa que tem a infecção pode ter sua saúde alterada. Para isso precisamos estudar suas células, onde pode ocorrer a alteração. Talvez essas alterações estejam associadas com as queixas em algumas pessoas.

Se você decidir participar deste estudo, perguntaremos a você sobre seus familiares; onde você nasceu e sua exposição ao “barbeiro”, sobre seu trabalho e o número de pessoas que vivem em sua casa. Mediremos sua pressão e pulso, além do exame físico e faremos eletrocardiograma, teste ergométrico, ecodopplercardiograma e holter para analisar a função do seu coração. Precisaremos colher amostras de sangue de uma veia de seu braço. Isto pode causar um pequeno desconforto passageiro. Você poderá desistir e se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo dos cuidados médicos da equipe do estudo. Esta consulta não será paga por você e não está sujeita a cobrança de qualquer natureza. Nós não garantimos que haverá um benefício direto do estudo para você. Mas podemos garantir que o estudo é sigiloso e que nem mesmo a inicial do seu nome aparecerá em qualquer comunicação sobre esse assunto.

Decisão do paciente

Depois de ter lido e/ou ouvido a informação que me foi passado, sei o que significa o estudo proposto pelos Professores Antonio Teixeira, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, e Dra. Adriana Almeida, médica cardiologista, e deixo registrado aqui que a minha decisão de participar neste estudo é voluntária e tem a importância de colaborar com a pesquisa para conhecer a doença de Chagas. Eu sei também que minha participação pode ser interrompida por mim a qualquer momento após o início do estudo, sem prejuízo para meu atendimento pela equipe médica da instituição.

Minha assinatura ou impressão digital testemunhada indica que fui eu que decidi participar dessa pesquisa e que li e/ou me foi dado conhecimento sobre o estudo, sendo que eu entendi tudo da forma explicada acima. Uma cópia deste documento ficará em meu poder.

Brasília, ____ de _____ de 20 ____ . Hora:

Assinatura ou impressão digital do voluntário:

Assinatura do pesquisador:

Fones para contato e email (paciente):

Fones para contato dos pesquisadores:

Dra. Adriana: 61-98119895

Dr. Antonio Teixeira: 61-33494987

ANEXO III

Ficha de Consulta

Ficha nº _____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Sexo: ___ Data de nascimento: ___/___/___ Estado Civil: _____

Naturalidade: _____ Área: () Rural () Urbana

Residiu neste local durante quantos anos: _____

Data do Exame: ___/___/___

ANTECEDENTES:

1. Pessoais:

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

2. Familiares:

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

3. Dados Clínicos:

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

ANEXO IV

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
3	FH-01	1-165	159-348	TGGTGTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-43
	FH-02	1-146/243-378	140-255	TGGTGTA/TTAGTCTTGGGAG	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e-40
	FH-06	1-425	459-526	-	7	AC002383.1 (indeterminado)	4e-17
	FH-08	531-931	1-454/978-1260	-	7/20	AC002383.1(indeterminado)/A L050403.16 (HERV46I)	0.0/1e-130
	FH-11	1-316	334-784	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-12	1-138/80-282	300-757	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-13	1-140	155-609	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-14	628-671	1-395	-	22	Z97353.3 (LINE-1)	0.0
7	FH-163	1-117/159-261/352- 418/466-544/586-646	425-481	GCATCTCACCCGTACA	6	AL161905.15 (LINE-1)	3e-13
15	FH-23	68-184/369-485	1-73/171- 297/480-528	TACACC/CCCTCCCAAACCA/AAACCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	6e-47
16	FH-175	1-302	345-483	-	3	AC133750.2 (indeterminado)	2e-53
29	FH-42	156-267	1-164/261-384	TTGGGAGGG/TGGTGTA	X	AC233279.2 (LINE-1)	2e-51
	FH-44	299-737	1-93/190- 307/744-851	TTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-43
	FH-50	1-394	458-580	-	10	AC020641.8 (LINE-1)	3e-50
46	FH-545	177-431	67-183/425-481	TACACCA/CTCCCAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-41
	FH-546	28-136	1-34/134-250	TTGGGAG/GGT	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e-46
	FH-547	1-153/256-367	145-262/361-415	CCCTCCCAA/TACACCA/CTCCCAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-46

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
46	FH-548	1-30/236-346	128-244/340-522	GGT/TTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	7e-46
	FH-549	404-444/544-586	462-513	-	18	AC021763.10 (indeterminado)	6e-16
46	FH-550	245-328/468-538	341-439	-	6	NG_025928.1 (indeterminado)	6e-40
	FH-552	121-197	1-108	-	6	AL773541.6 (indeterminado)	5e-40
	FH-556	1-321	321-948	-	2	AC098872.5 (LINE-1)	0.0
64	FH-201	132-254	1-124	-	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-38
87	FH-211	82-199	1-97/193-311	TTAGTCTTGGGAGGGT/TGGTGTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-38
91	FH-218	315-432/315-432	1-102/257-316/427-499/598-673	TT/GGTGTA/TTAGTCTTGGGAGGG/GGTGTA	X	AC233279.2 (LINE-1)	9e-46
	FH-219	44-161/285-402	1-60/168-300/397-470	TTAGTCTTGGGAGGGT/TTAGTCTTGGGAGGGT/GGTGTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	3e-49
	FH-220	18-136	1-23/121-214	TAGACC/ACCCTCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	8e-34
	FH-221	220-448	1-213/436-458	GAGATGCAAGAAT	4/20	AC096768.3 (HERVH48I)/AL050403.16 (indeterminado)	7e-85/1e-101
	FH-223	1-51/96-122/235-577	110-228	CCCAATCGAACCC	7	AC012596.4 (PRIMA41)/(LINE-1)	5e-48
97	FH-227	380-437	1-148	-	2	AC019110.7 (indeterminado)	8e-57
	FH-228	149-413	1-132	-	indeterminado	AC234421.2 (indeterminado)	1e-54
	FH-229	397-495	1-324	-	1	AL049825.18 (indeterminado)	2e-154
	FH-230	1-112	390-709	-	1	AL049825.18 (ERV3-16A3_I)	6e-156
100	FH-232	46-122/148-225/251-327/353-436	1-53/111-159/214-262/316-364	TACACCAA/GGTGAGATGCAT/TACACCAACCCC/GGTGAGATGCAT/TACACCAACCCC/GGTGAGATGCAT/TACACCAACCCC	1	AC093150.4 (LINE-1)	9e-12
	FH-233	44-66/114-190	77-121/197-258	ATGCATCT	1	AC093150.4 (LINE-1)	9e-12
	FH-234	119-186/234-310	73-117/195-245/325-359	ATGCATCT/ATGCATCTCACC	1	AC093150.4 (LINE-1)	9e-11

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
100	FH-243	1-157/210-327/353-415/431-510	154-224/210-367-503-550	TGTA/TTAGTCTTGGGAGGG/TTGGTGTA/TTAGTC TTGGGAGGG/TTGGTGTA	X	AC233279.2 (LINE-1)	3e-18
	FH-246	1-137/316-345	144-262	-	7	AC012596.4 (LINE-1)/(PRIMA41)	3e-47
	FH-248	108-133/180-277/324-431	1-118/428-471	GGTTCGATTGG/TGGG	1	AC092765.2 (LINE-1)/(PRIMA41)	2e-47
101	FH-249	73-190	1-78/176-369	TACACC/CCCTCCCAAAACCAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-18
	FH-250	71-130/242-359/456-572	1-76/175-247/345-417/567-633	TACACC/TACACC/CCCTCCCAAGACTAA/AAACCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	6e-22
	FH-251	1-200/332-406	401-474	TAGACCGGAG/GCATCTC/GGTGTA	4/X	AC104819.4 (indeterminando)/AL732374.14 (LINE-1)	1e-66/5e-15
	FH-255	110-184	1-117/188-640	TACACCAA	14	AL161804.4 (LINE-1)/MER45	0.0
	FH-256	93-210	1-107/203-251	TTAGTCTTGGGAGGG/TTGGTGTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-18
	FH-257	1-80/134-251/303-420/446-531	76-148/246-317/413-460	GGTGT/TTAGTCTTGGGAGGG/GGTGTA/TTAGTC TTGGGAGGG/TTGGTGTA/TAGTCTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	3e-19
	FH267	179-281/328-425/473-569/616-693	1-177	-	7	AC012596.4 (PRIMA41)/(LINE-1)	6e-48
	FH268	210-291	85-203	-	7	AC012596.4 (PRIMA41)/(LINE-1)	3e-47
	FH-271	86-191	1-88/184-228	AGG/TTGGTGTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-19
	FH-272	145-262/315-432/458-576	1-160/257-329/425-474	TTAGTCTTGGGAAGGT/GGTGTA/TTAGTCTTGGG AGGG/TTGGTGTA/TTAGTCTTGGGAGGGTG/GGN GTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-46
	FH-273	64-183/209-326/352-468/521-639	1-70/167-216/311-359/454-526/624-712	TACACC/CACCCTCCCAAGACTAA/TACACCAA/AC CCTCCCAAGACTAA/CACCAA/CCCTCCCAAGACT AA/TACACC/ACCTTCCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e-25
	FH-275	1-292	285-436	GGCGTTC	2	AC019110.7 (ERV3-16A3_I)	1e-61

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
101	FH277	94-427	1-102	ATAATGTAC	1	AC231957.1 (LINE-1)	7e-38
102	FH-285	211-328	1-216/316-365	TACACC/CTCCCAAACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e-52
104	FH-59	93-154	219-534	-	X	Z93341.5 (indeterminado)	2e-134
	FH-60	234-282	309-467	-	8	AC022068.6 (indeterminado)	7e-64
	FH-62	686-720	1-404	-	9	AL445663.10 (indeterminado)	0.0
	FH-69	445-479	1-156	-	16	NC_000016.9 Gene (PRKCB)	1e-67
	FH-70	46-102	94-154	CCCTCCCAA	10	AC221032.3 (LINE-1)	7e-13
	FH-71	46-102	94-181	CCCTCCCAA	19	AC124608.1 (LINE-1)	1e-18
121	FH-294	42-159	1-49/144-263/271-589	TACACCAA/ACCCTCCCAAGACTAA	X/19	AL732374.14/AC010319.10 (LINE-1)	1e-42/3e-158
	FH-296	401-475	1-411/468-494	GCATCTCACCC/TTGGTGTA	19/6	AC010319.10/FP325329.6 (LINE-1)	0.0/0.017
	FH-297	42-160	186-261	TACACCAA/CCCCCTTCCCAAGACTAA/TACACCA A/GATGC	8/19	AF117829.3/AC010319.10 (LINE-1)	1e-12/0.0
	FH-298	1-41/76-193/215-324/359-468/503-612/647-773	34-83/180-222/317-366/461-510/605-654	CCCGTTCC/TACACCAA/CCCTCCCAAAACCA/TAC ACCAA/CCCCTTCC/TACACCAA/CCCCTTCC/TAC ACCAA/CCCCTTCC/TACACCAA	5	AC091930.3 (LINE-1)	5e-12
	FH-301	1-347	340-429	CATCTCAC	5	AC104121.3 (indeterminado)	0.007
	FH-302	277-380/422-451	431-718	ACCAACCCCAATCGAACCCAC	10	AL392043.21 (indeterminando)	3e-134
	FH-303	173-291/344-460-513-639	1-183/277-349/446-518	TACACCATCCC/CCCTCCCAAGACTAA/TACACC/ CCCTCCCAAAACCAA/TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-17

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
121	FH-305	44-161/214-332/358-475/528-645/698-805	1-49/147-219/316-363/461-533/631-703	TACACC/CCCTCCCAAAACCAA/TACACC/CACCC TCCAAGACTAA/TAGACC/CCCTCCAAGACTAA /TACACC/CCCTCCCAAAACCAA/TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-25
	FH-310	73-180/251-316/217-255	334-421	-	3	AC079910.18 (LINE-1)	5e-34
	FH-311	1-27/74-181/218-317	335-422	-	3	AC079910.18 (LINE-1)	5e-34
	FH-314	114-239/376-441/583-681/762-827	258-309/459-552/845-947	-	18/3	AC021763.10/AC079910.18 (LINE-1)	9e-16/ 6e-37
	FH-315	207-647/911-1093	37-200/677-759	-	2/10	NC_000002.11/ NC_000010.10 Gene (CYP27A1)/Gene (CHUK)	5e-71/9e-30
	FH-316	1-27/156-395	334-561	-	X	AC112497.4 (indeterminado)	2e-104
122	FH-319	42-159	1-47/145-217	TAGACC/CCCTCCCAAAACCAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	6e-17
	FH-321	1-93/190-308	79-196	TTGGTTTTGGGAGGG/TGGTGTGA	X	AL732374.14 (LINE-1)	3e-34
	FH-322	43-158	1-49/145-232	ACACCAA/CCCTCCCAAAACCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	3e-26
125	FH-339	1-49	277-557	-	9	NC_000009.11 Gene (ASTN2)	1e-134
	FH-345	254-356/425-522/564-628	1-92/151-247	-	12	AC129028.3 (indeterminando)	2e-29

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
126	FH-352	146-176/218-331	1-158	GTGGGGGTTTCGAT	5	NG_008282.1 (indeterminando)	5e-67
	FH-353	252-347/394-419	403-691	CCAACCCCAATCGAACC	10	AL392043.21 (indeterminado)	1e-132
	FH-359	94-191	3-80	-	3	AC092995.7 (HERV9)	1e-24
	FH-361	12-89/306-342/384-480	188-306	G	7	AC012596.4 (LINE-1)/(PRIMA41)	2e-45
131	FH-370	1-28/237-390/473-390	374-486	TGGTGTATTCAGGGATT/TGGTCTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-35
134	FH-377	1-63/105-207/249-275/338-413	263-381/397-643	CCCAATCGAACCC/TCCCAAGATGGCCAAATAGG AACAGCTCCGGGTACAGCTCCCA/CCAACCCCA ATCGAACC	7/2	AC012596.4 (PRIMA41)/(LINE-1)/ NC_000002.11 Gene (DGKD)	6e-48/3e-115
137	FH-75	1-93	85-201	TTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e-34
	FH-80	320-437	1-185/195-242/423-470	CCCTCCCAAGACTAA	7	AC004941.2 (LINE-1)	2e-77
	FH-84	312-423	1-283/236-305	-	1/7	AL133288.12/AC245132.2 (LINE-1)	6e-78/2e-20
140	FH-391	1-86	94-165	-	7	AC012596.4 (indeterminado)	2e-11

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
1555	FH-399	8-166/263-420/517-674/700-836	160-277/414-531/667-712	TGGTGTA/TTAGTCTTGGGAGGG/TGGTGTA/TTA GTCTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	8e-41
	FH-405	473-575	6-455	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-406	38-120/162-264/306-408/450-525	1-60	TCTTGCATCTCCCCGTACATTA	X	AC231645.2 (LINE-1)	1e-11
	FH-407	1-48/251-327	309-935	CATCTCACCCGTACATTAT	10	AC026396.8 (LINE-2)/(MLT1C1)	0.0
1564	FH-416	353-396/615-643	1-367	TCTGAACGCCCTCC	5	NG_032072.1 (indeterminado)	2e-173
	FH-420	217-340	1-230	TGGTTTTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e-56
	FH-421	236-392/587-705	1-249/399-601/700-774/846-937	TGGTTTTGGGAGGG/TTAGTCTTGGGAGGG/GGT GTA	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e-57
1584	FH-432	473-570/617-714	6-445	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-433	472-570/617-714/910-1007/1054-1082	1-454	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
	FH-434	4-106/148-250/293-394	411-913	-	1	AL513044.13 (HERVH)	0.0
	FH-435	472-565/616-714	6-54	-	7	AC002383.1 (HERV46I)	0.0
1585	FH-438	1-29	196-358	-	5	NC_000005.9 Gene (PHF15)	1e-62
	FH-440	287-369/567-592	1-270	-	4	AC012504.7 (indeterminado)	3e-127

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
1593	FH-447	3-25/66-162/254-356/399-500/542-643	737-1118	-	3	AC078793.13 (indeterminado)	1e-140
	FH-450	99-161	227-370	-	8	AP006306.1 (indeterminado)	2e-58
	FH-451	52-488	497-601	-	6	CR759772.4 (indeterminado)	2e-28
	FH-452	365-426	365-426	-	6/6	AL773541.6/AL451064.6 (indeterminado)	9e-40/5e-74
	FH-453	109-294/311-611	1-79/632-851	-	18/1	AC079052.4/AC229661.3 (indeterminado)	7e-29/9e-60
	FH-454	57-233/284-469/486-546	19-64/550-614	TACACCAA	18	AC021504.5 (LINE-1)	3e-20
1595	FH-445	1-21/44-109	95-170	TCCCCCGTACATTAT	1	AC225770.2 (LINE-1)	5e-22
	FH-458	48-110/163-183	96-168	CCCTCCCAAACCAA/TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-22
	FH-460	87-150	1-81/137-195	CTCCCAAACCAAA	1	NG_032046.1 (LINE-1)	5e-24
	FH-461	75-105/157-177	90-162	CCCTCCCAAACCAA/TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	8e-20
1610	FH-464	403-509	1-227	-	20	NG_008334.1 (LINE-1)	3e-100
1628	FH-473	74-189	7-79	TACACC	X	AL732374.14 (LINE-1)	1e-23
	FH-474	296-357	13-100/126-279	-	5/18	AC094105.3/AC079052.4 (LINE-1)	1e-28/2e-70

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
1629	FH-488	121-195/406-442	1-108	-	6	NG_025928.1 (indeterminado)	1e-41
	FH-497	62-192	28-75/425-688	CTGGTTT	4	NC_000004.11Gene (MAPK10) (LINE-1)	6e-118
	FH-499	1-41	290-604	-	11	EU518937.1 (indeterminado)	9e-153
	FH-500	798-884	1-619	-	X	AL359973.11 (LINE-1)	0.0
1667	FH-513	1-82	76-110	AAACCAG	3	AC027296.21 (LINE-1)	1e-07
	FH-516	83-145	55-89	CTGGTTT	3	AC027296.21 (LINE-1)	1e-07
	FH-517	1-82	76-110	AAACCAG	3	AC027296.21 (LINE-1)	9e-08
	FH-520	10-124	203-275	-	X	AL732374.14 (LINE-1)	4e-21
1669	FH-095	5-62/106-206/587-630	363-530	-	X	NG_021253.1 (LINE-1)	3e-76
	FH-098	53-164	14-66/157-210	TTGGGAGGGGGGTT/TTGGTGTA	5	AC091930.3 (LINE-1)	2e-14
	FH-100	6-68/94-211/237-355/408-525	56-101/195-244/341-413/509-558	CTCCAAGACTAA/TACACCAA/CACCCTCCAAG ACTAA/TACACCAA/CCTTCCAAGACTAA/TACAC C/CACCCTCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-20
	FH-102	1-324	318-649	ACATTAT	17	AC004134.1 (indeterminado)	2e-155
	FH-103	320-385/627-660	1-332	GACCAGATAATGT	17	AC004134.1 (indeterminado)	8e-154
	FH-104	295-376/597-623	1-304	AATAATGTAC	4	AC110768.5 (indeterminado)	1e-144
	FH-105	1-35/245-329	314-398	CATTATTATCCCACCA	1	AL360093.11 (indeterminado)	4e-28
	FH-107	425-458	1-183	-	7	AC004941.2 (LINE-1)	5e-78
1683	FH-115	427-529	3-235	-	14	AL049832.3 (MLT1B)	3e-107
	FH-119	145-262/422-539	16-159/257-375/389-436/546-634	TTAGTCTGGGAAGG/GGTGTA/TTAGTCTGGGA AGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-48

Paciente	Clone	kDNA	Humano	Micro-homologia	Sítio de Integração		E-value
					Cromossomo	Locus	
1684	FH-126	56-81/122-224/266-368/410-465	1-68	GGTTCGATTGGGG	1	NC_000001.10 Gene (OR6K2)	9e-19
1686	FH-523	10-125/184-259	120-192	GGTGTA/ TTGGGAGGG	X	AL732374.14 (LINE-1)	5e-25
	FH-527	36-139	146-226	-	12	AC129028.3 (indeterminando)	8e-28
	FH-531	43-80/122-224/266-321	1-66	CACAGGAGGAGAGGTTCCATTGGG	12	NC_000012.11Gene (GRIN2B)	1e-27
	FH-537	93-172/201-249	62-100/234-376	TACACCAA/GCCCCCTCCCAAACCA	13	NC_000013.10 Gene (GPC6)	3e-61
	FH-539	140-318	1-52/73-145/305-377	TACACC/CCCTCCCAAAGCCA	X	AL732374.14 (LINE-1)	2e-20
	FH-540	49-171/407-523/678-787/864-975	340-412/507-661/867-975	TACACC/CCCCCTCCCAAACCA/ACCGACCCC AACCGAACCTCATCTCCCGTAAACAATCCCCATT TTCGGCTATATAATGTACGGGGGAGATGCATGAT TTTCGGGGCCCAATTTGAACCCCTCCCAA	X/18	AL732374.14/AC079052.4 (LINE-1)	6e-18/5e-64
	FH-541	49-295/407-523/876-983	340-412/507-669/837-878/977-1007	TACACC/CCCCCTCCCAAACCA/CTCCCAA	14/18	AL732374.14/AC079052.4 (LINE-1)	6e-18/7e-62
	FH-544	430-546	1-180	-	16	AC007216 (AluJb)	8e-80
1693	FH-146	66-183	1-71/340-412/169-241	TACACC/CCCTCCCAAGACTAA/CCCTCCCAAGACTAA/TACACC/CCCTCCCAAGACTAA	X	AL732374.14 (LINE-1)	3e-23
1709	FH-153	84-181/184-210	17-87	TACA	X	AC233279.2 (LINE-1)	4e-18

ANEXO V

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
3	FH-01	PRTLCSIPVHYMAENEGCLREVGFWDWGCIQR	[CAR63107.1] hypothetical protein	7e-07
16	FH-175	HLTRTLYARKWGVLEVGFDWGWGC	[CAR63129.1] hypothetical protein	6e-11
46	FH-545	1)MHLPRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYSEIQLPPGLVLGECMCIR	[CAR63114.1] hypothetical protein	2e-19
		2)LVLGGAFRFGPEKSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	1e-05
		3)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
	FH-546	1)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
		2)MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGSVYSEIQLPGLVLGECMCIR	[CAR63095.1] hypothetical protein	1e-19
	FH-547	1)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
		2)MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYSEIQLPPGLVLGGCMCIR	[CAR63118.1] hypothetical protein	3e-22
		3)MHEILAKNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.041
	FH-548	1)MHLPRTLYGRKWGLFTGGEVRLGSVYSEIQLHPGLVLGGCMCIR	[CAR63114.1] hypothetical protein	3e-20
		2)MHDSAINLRPLPR	Sem similaridade significativa	-
		3)YMAENGDCLEVRFDWGRSIRQFNF	[CAR63076.1] hypothetical protein	6e-08
		4)MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYSEIQLPPGLVLGECMCIR	[CAR63118.1] hypothetical protein	5e-21
	FH-549	1)MHLTRTLWFWEGRS	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.006
		2)MHEFPPQKSTPTPTLSGLQSPGPVL	[CAR63086.1] hypothetical protein	1e-06
	FH-550	1)ILVLGGAVKFMKSCISPVHYGFGKGGGL	[CAR63124.1] hypothetical protein	9e-08
		2) MHEFPPQKSAPTPTLSGLQSP	[CAR63086.1] hypothetical protein	9e-05
FH-552	1)MHLTRTLWFWEGRS	[CAR63123.1] hypothetical protein	0.009	
	2)ILVLGGAVKFMKSCISPVHYGFRGGGL	[CAR63124.1] hypothetical protein	7e-08	
64	FH-201	GLSTGSEVPLGLVCVYQSPFLVYSEIQLPGLVLGGCMCIK	[CAR63079.1] hypothetical protein	4e-15
87	FH-211	1)MHDFSAPDLNHPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	6e-04
		2)MHLPRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYSEIQLPGLVLGGCMCIR	[CAR63114.1] hypothetical protein	5e-21
91	FH-218	1)SKIQLPGLVLGGWFKSGAEESCISPVHYMAENGGRLREVR	[CAR63119.1] hypothetical protein	3e-15
		2) MHDFSAINLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	4e-04
		3)GVCYGRWVFDWGWCMCTRACYWSIQRFNFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	2e-11
		4) MHDSSAPDLNHPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.008
		5)FDWGWCMCIRACYWSIQ	[CAR63083.1] hypothetical protein	3e-07
	FH-219	1) MHDFSAPDLNHPKTKP	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.020
		2)MHLTRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLLIVYSEIQLPPG	[CAR63116.1] hypothetical protein	3e-20
3)MHLTRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLLIVYSEIQLPPGLVLGGCMCIR		[CAR63116.1] hypothetical protein	1e-28	

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
91	FH-221	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	5e-06
97	FH-228	MHLTRTLWFWEPSL	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.019
100	FH-232	1)YMAENGDCLEVRFDWGWCTDCF	[CAR63076.1] hypothetical protein	6e-07
		2)YMAENGDCLEVRFDWGWCTDCF	[CAR63076.1] hypothetical protein	6e-07
	FH-233	MHLPRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSPLLVYSGIQLPPG	[CAR63114.1] hypothetical protein	2e-21
	FH-234	1)PTPIEPYTNPNGTSPPV	[CAR63098.1] hypothetical protein	0.42
		2)CISPVHYMAENGDCLEVRFDWGC	[CAR63119.1] hypothetical protein	9e-12
FH-243	1) LREVVVRLGLLYVYQSPLLVYSGIQLPPGLVGGAFKFGPEKSCISPVHYMPENGGCLRE	[CAR63119.1] hypothetical protein	8e-28	
	2)MRDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	3e-05	
101	FH-256	LNQEEVESLNTPIGFHTH	[CAR63148.1] hypothetical protein	2e-07
	FH-272	GCVYGRRWFHWGXMCIRACYWSIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	4e-11
		1)GCVYGRRWFYWGCMCIRACYWSIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	1e-12
	FH-273	2)LGRGVKLGPEKSC	[CAR63121.1] hypothetical protein	2e-06
		3)GCVYGRRWFDWGWCMCIRARYWCIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	3e-11
		4) VVRLGLVYVYQSPLLVYSGIQLPPGLVLGGGSNLGP	[CAR63121.1] hypothetical protein	9e-16
		5)MHDFSAPDLNHLPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	3e-09
FH-277	1)MHLTRTLC	Sem similaridade significativa	-	
	2)MAENSCISPVNFKIENEVPGFLKTQR	Sem similaridade significativa	-	
102	FH-285	1)MHLTRTLYGRKWGLFMGSVVRLGLVYVYQSPLLVYSEIQLPPGLVLGECMRIR	[CAR63116.1] hypothetical protein	2e-24
		2)GDCLWEVWFDWGWCMCIRARYWCIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	6e-08
		3)MAENGDCLEWVWFDWGWCMCIR	[CAR63115.1] hypothetical protein	6e-07
		4)MHDFSAPDLNPPPCKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	1e-05
104	FH-59	1)CISPVHYGFGRGRQIYGRKIMHLTRTLWFWEAS	[CAR63104.2] hypothetical protein	7e-13
		2) WFWEGPSNLWPKNHASHPYIMVLG	[CAR63080.1] hypothetical protein	2e-06
121	FH-294	MHDFSAPDLNHPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	6e-04
	FH-297	MRDFSGPSLNPPSQD	Sem similaridade significativa	-
		1)MQLLPGLVLGR	Sem similaridade significativa	-
	FH-298	2)LREVRFDWGWCIQRFNFFLV	[CAR63076.1] hypothetical protein	3e-07
		3)MRDFSGPSLNPPSQD	Sem similaridade significativa	-
		4)MRDFGSPSLNPPSQD	Sem similaridade significativa	-
		1)MQEFPPQKLTSTPTLSGLRLPSPYITPTPIEPHKQL	[CAR63171.1] hypothetical protein	2e-15
	FH-302	2)VGFWDWGCNI	[CAR63129.1] hypothetical protein	0.83
		3) VYAQLLVGFDWGC	[CAR63108.1] hypothetical protein	2 . 6
FH-303	1)MPENGVCLREQVLLGMVYIGR	Sem similaridade significativa	-	
	2)LLEVRFDWGWCMCIRARNWCI	[CAR63115.1] hypothetical protein	5e-05	

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
121	FH-303	3)MHLTRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSP	[CAR63079.1] hypothetical protein	5e-13
		4)RVWFWEGRSNKGRKI	[CAR63080.1] hypothetical protein	0.072
		5)MHLPRTLYGRKWRRFFMGSEVRFFLVYAYQSPLVEYSEIQIPPLVGG	[CAR63114.1] hypothetical protein	3e-18
	FH-305	1)MHLPRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLL	[CAR63079.1] hypothetical protein	7e-14
		2)FDWGWCMCIRACYWSIQ	[CAR63083.1] hypothetical protein	3e-07
		3)SEIQLLPGLVLGGAFKFGPEKSCISPVHYMAENGDCLEVR	[CAR63119.1] hypothetical protein	7e-20
		4)GFLWEVRFDWGWCMCIRGRYWSIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	1e-07
		5)MHLTRTLYGRKWGLFTGGEVRLGVSVEIQLHPGLVGG	[CAR63118.1] hypothetical protein	1e-19
		6)MHDFSAINLNPPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.002
		7)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
		8)GGCLWEVRFDWGWCMCIRACYWSIQ	[CAR63115.1] hypothetical protein	1e-12
		9)PGLVLGGAFKFGPEKSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	8e-08
		10)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
		11)GFLWEVRFDWGWCMCIR	[CAR63115.1] hypothetical protein	8e-04
	FH-310	MHLTRTLWFWEES	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.066
	FH-311	MHLTRTLWFWEES	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.066
	FH-314	1)CISPVHYGFRGGGQ	[CAR63104.2] hypothetical protein	0.012
		2)MHLTRTLWFWEES	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.066
		3)ASHPYIMVLGGAVKFMKSCISPVHYGFRGG	[CAR63124.1] hypothetical protein	2e-12
4)MHLTRTLWFWEGRSNLWPKNHASHPYIMVLGGGF		[CAR63085.1] hypothetical protein	1e-12	
5)CISPVHYGFRGRQIYGRKITHLPRTLWFWE		[CAR63104.2] hypothetical protein	1e-11	
FH-315	1)MVLGGGFDSGCLHKDTWLSGTR	Sem similaridade significativa	-	
	2)MHLTRTLWFWEGASI	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.023	
FH-322	CISPVHYMAENGGCLREVRFDWGWCVQRFNLLV	[CAR63076.1] hypothetical protein	2e-17	
126	FH-353	VGFDWGCNI	[CAR63129.1] hypothetical protein	0.84
	FH-359	MHEFLPQKMTSTPPFGI	Sem similaridade significativa	-
	FH-361	KVDLNPDLRSTAPISLYANPNRTLHLPQSNP	[CAR63162.1] hypothetical protein	5e-06
131	FH-370	1)SIQRLNFFLVLGGAFKFGPEKSGISPV	[CAR63076.1] hypothetical protein	5e-08
		2)MPDFSGPNLNAPPKTR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.050
134	FH-377	MPGNLKILAALVSIPR	[CAR63161.1] hypothetical protein	0.073
122	FH-321	MHLPRTLFRKWGLFTGGEVRLGLVYSGIQLPPLVGGECMCTR	[CAR63114.1] hypothetical protein	6e-19
137	FH-75	MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63122.1] hypothetical protein	2e-06
	FH-80	MHLPRTLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSPLLVEIQLPPLVGGECMCIR	[CAR63114.1] hypothetical protein	1e-29

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
137	FH-85	MHLPRPLYGRKWGLFTGGEVRLGLVYVYQSPLLVYSEIQLPPGLVLGECMCIR	[CAR63114.1] hypothetical protein	1e-29
140	FH-391	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	4e-04
1555	FH-399	1)CISPVHYMAENEGCLREVGFDWGWCIQR	[CAR63076.1] hypothetical protein	2e-11
		2)MAENEGCLREVGFDWGWCIQR	[CAR63107.1] hypothetical protein	7e-07
		3)MHDFSGPNLNPPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	1e-05
		4)MAENEGCLREVGFDWGWCIQR	[CAR63107.1] hypothetical protein	7e-07
		5)MHDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-06
	FH-403	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	2e-05
FH-405	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	2e-05	
FH-407	FVKCWFWEGPSNLWPKNHASHPYIMSPRKLKQLNV	[CAR63088.1] hypothetical protein	4e-05	
1564	FH-420	MHDFSGPNLNAPPKT	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.002
	FH-421	1)MAENGDCLEVRFDWGWCMCIRACYWSIQRFNFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	6e-20
		2)YSEIQLPPGLVLGGAFKFGPEESC	[CAR63119.1] hypothetical protein	2e-08
		3)ESGDCLREVRFDWGWCMCIRACYWSIQRSNFFL	[CAR63106.1] hypothetical protein	4e-17
		4)RPLPTIQARLIM	Sem similaridade significativa	-
1584	FH-432	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	2e-05
	FH-433	SGVQLPSYITPTMPHPLP	[CAR63128.1] hypothetical protein	1e-04
	FH-435	LREVGFDWGCNIRRWEL	[CAR63129.1] hypothetical protein	2e-05
1585	FH-440	MHLTRTLWFWEAGSL	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.002
1593	FH-450	ASHPYIMVLGGAFKFGPENSCISPVHYGFRGVQVWAGKFMHLTRTLWFRE	[CAR63104.2] hypothetical protein	5e-27
	FH-451	1)CISPVHYVFRGLWFWEGRS	[CAR63104.2] hypothetical protein	0.031
		2)SPVHYVFRGLWFWEGRS	[CAR63104.2] hypothetical protein	0.71
	FH-454	EFSGPNLTAPPKTEP	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.67
1595	FH-445	1)LVLGGAFKFGPEKSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	5e-06
		2)RQEQVLWLRPLHM	Sem similaridade significativa	-
	FH-458	PGLVLGGAFRMAEKSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	5e-05
	FH-460	1)MHLTRTLWFWEAGS	[CAR63122.1] hypothetical protein	0.008
		2)PGLVLGGAFKFGPENSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	4e-07
		3)MHEFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	7e-06
		4)EFSGPNLNAPPKTKPGRS	[CAR63099.1] hypothetical protein	2e-04
FH-461	PGWVLGGAVKFMMAEKSCISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	0.001	
1628	FH-473	MAEGGDCLREVGFDWGWCMCIR	[CAR63115.1] hypothetical protein	2e-07
	FH-474	MHLTRTLWFWEGRSLCSFEL	[CAR63085.1] hypothetical protein	0.009
1629	FH-488	ILVLGGAFKFMMAEKSCISPVHYGFRGGL	[CAR63124.1] hypothetical protein	2e-08

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
1629	FH-497	1)FLLVLGGAFNFWAGNSCISPVH	[CAR63084.1] hypothetical protein	2e-06
		2)WFWEGRSTFGPEIH	[CAR63085.1] hypothetical protein	0.038
		3)WFWEGRSTFGPEIHA	[CAR63085.1] hypothetical protein	0.008
1667	FH-513*	1) WCIQRSNFFLVLGGAVKFGPENSCISPV	[CAR63076.1] hypothetical protein	2e-07
		2)WFWEGRSNLGRKIHA	[CAR63080.1] hypothetical protein	0.001
		3)SWFWEGRSNLGRKIH	[CAR63080.1] hypothetical protein	0.003
	FH-517	1)RFDWGWCRVRLGLVYSEIQLLPGFGR	[CAR63155.1] hypothetical protein	1e-06
		2)GFGRRGGQIWAGKFMH	[CAR63104.2] hypothetical protein	0.002
		3)SWFWEGRSNLGRKIH	[CAR63080.1] hypothetical protein	0.028
FH-520	AKIGVCLREVGFDWGWCGAEQNVYSVRLGL	[CAR63155.1] hypothetical protein	5e-10	
1669	FH-100	1)MLDFSGPSPSPSQD	Sem similaridade significativa	-
		2)MHLPRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLLVYSEIQLPPGLVLG	[CAR63114.1] hypothetical protein	2e-23
	FH-102	MHLTRTLSGHPFPR	Sem similaridade significativa	-
	FH-103	MHLTRTLSGHPFPR	Sem similaridade significativa	-
	FH-104	MHLPRTLFYIR	Sem similaridade significativa	-
FH-105	MCSLWWDNNVRVR	Sem similaridade significativa	-	
1683	FH-119	1)MHDFSGPNLNALPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	5e-05
		2)MHDFSGPNLNALPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	5e-05
		3)MAENGGCLWEVGFWDWGWCMCIR	[CAR63115.1] hypothetical protein	4e-08
		4)MHLTRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLLVYSEIQLPPGLVLGGCMCRGMYPFLPD	[CAR63077.1] hypothetical protein	1e-33
		5) MHLTRTLYGRKWGLFMGSGVRLGLVYVYQSPLLVYSEIQLPPGLVL	[CAR63116.1] hypothetical protein	5e-21
1684	FH-126	1) TPEWFDWGWGNIRRW	[CAR63174.1] hypothetical protein	3e-05
		2) NPNRTTIQEFIFSAFPYSW	[NP_001005279.1] olfactory receptor 6K2	5e-04
1686	FH-523	1)LAENGGCLWEVRFWDWGWCMCIRACYWSIQRFNFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	4e-19
		2)GGCLWEVRFWDWGWCMCIRACYWSIQRFNFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	4e-17
		3)MRDFSGPNLNAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	3e-05
		4)LVLGGAFKFGPEKSRISPVH	[CAR63119.1] hypothetical protein	2e-04
	FH-537	1)CQTSLELLIQVVLGGAFKFGPEKSC	[CAR63076.1] hypothetical protein	0.004
		2)MAENEGCLREVGFDWGWCIQR	[CAR63107.1] hypothetical protein	7e-07
		3)CQTSLELLIQVVLGGAFKFGPEKSCISPV	[CAR63076.1] hypothetical protein	1e-05
		4)PHCQNCSEFRWFWEGRSNLGPKN	[CAR63088.1] hypothetical protein	0.27
	FH-539	1)FDWGWCMCIRACYWSIQRNLNFSLV	[CAR63093.1] hypothetical protein	5e-11
		2)LALGGAVKFGPENSCISPVHYSFGRGVQVWAGKFTH	[CAR63104.2] hypothetical protein	6e-15
		3)MHEFSGPNLTAPPKAKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	3e-04
		4)YSEIQHLPLALGGAVKFGPENS	[CAR63119.1] hypothetical protein	0.003

Paciente	Clone	ORF Quimera Putativa (*)	Resultado Blastx	E-value
1686	FH-540	1)LAENGGCLREARFDWGWCMCIRACYWSIQRFYFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	2e-18
		2) ILLNCAVVLGGGFEGPEKSCISPVHYLAENGGCLRE	[CAR63119.1] hypothetical protein	3e-11
	FH-541	1)LAENGGCLREARFDWGWCMCIRACYWSIQRFYFFLV	[CAR63115.1] hypothetical protein	2e-18
		2)MHLPRTLYSRKWGLFTGDEVRLGSVYSEIQHLPGLFLGG	[CAR63114.1] hypothetical protein	2e-11
	FH -541	3)LYSRKWGLFTGDEVRLGSVYS	[CAR63077.1] hypothetical protein	0.001
1693	FH-146	1)MHLTRTLYGRKWGLFMGSEVRLGLVYVYQSPLI	[CAR63079.1] hypothetical protein	7e-14
		2)FDWGWCMCVRACYWSTQ	[CAR63083.1] hypothetical protein	3e-06
		3)LREVVVRLGLVYVCQSLLLVSSEIQLLPGLVLGGAFKMAEKSCISPVHYMAENGGCLWEVR	[CAR63119.1] hypothetical protein	2e-24
		4)MHDFSAINLKAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.003
		5)MHDFSAINLKAPPKTKPGR	[CAR63099.1] hypothetical protein	0.003

(*) Aminoácidos provenientes da sequência do hospedeiro humano estão representados em verde, e os provenientes da sequências de kDNA estão representados em azul. Os aminoácidos em preto não foram reconhecidos no banco de dados.

ANEXO VI

Alinhamento com sequências depositadas no banco de dados BLASTx.

Figura 14

>gb|AC004134.1| Homo sapiens chromosome 17, clone hCIT.507_E_2, complete sequence
Length=119307

Score = 553 bits (612), Expect = 8e-154, Identities = 319/327 (98%), Gaps = 4/327 (1%)

Strand=Plus/Plus

```
Query 10   TACACCGGAGCAAAGAAGGAAACGTTCTTGAGGAGCAAAGTCTAAAAAACTACCCGCCTA 69
          |||||
Sbjct 28619 TACACCGGAGCAAAGAAGGAAACGTTCTTGAGGAGCAAAGTCTAAAAAACTACCCGCCTA 28678
Query 70   GCTTCCTTTTCTATAGAAGTCTACTAATAGCTAGTCCTGCAAATTCCTCACTCATTCAAAT 129
          |||||
Sbjct 28679 GCTTCCTTTTCTATAGAAGTCTACTAATAGCTAGTCCTGCAAATTCCTCACTCATTCAAAT 28738
Query 130  ATGAGTATCATAATGGTAAAAAACACAGCAACTGTTCAAAGCCCTATTATAAAAAAGTGG 189
          ||
Sbjct 28739 ATAAGTATCATAATGGTAAAAAACACAGCAACTGTTCAAAGCCCTATTATAAAAAAGTGG 28798
Query 190  AGAGACAGCAGTACAACCTCCTTAATGacaaacaaaacatacttgaaaaaaca----aaa 245
          |
Sbjct 28799 AAAGACAGCAGTACAACCTCCTTAATGACAAACAAAACATACTTGAAAAAACAAAACAAA 28858
Query 246  caaacaacaacaacaacaTGCTAGCTACCAAGGAAGACCACACAACAGTAAAAGAAAAACA 305
          |||||
Sbjct 28859 CAAACAAACAAACAACAATGCTAGCTACCAAGGAAGACCACACAACAGTAAAAGAAAAACA 28918
Query 306  TCTGGGGAAGGGATGACCAGATAATGT 332
          |||||
Sbjct 28919 TCTGGGGAAGGGATGACCAGATAATGT 28945
```

>gb|M19185.1| TRBKPMCL T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 1
Length=162

Sort alignments for this subject sequence by:

Score = 111 bits (122), Expect = 8e-21, Identities = 64/66 (97%), Gaps = 0/66 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 320 GACCAGATAATGTACGGGTGAGATGCATGATTTTTTCGGGCCCAAATTTGAACGCCCTCC 379
          |||||
Sbjct 96   GACCAAATAATGTACGGGGAGATGCATGATTTTTTCGGGCCCAAATTTGAACGCCCTCC 37
Query 380 CAAAAC 385
          |||||
Sbjct 36   CAAAAC 31
```

Score = 51.8 bits (56), Expect = 0.007, Identities = 33/35 (94%), Gaps = 1/35 (3%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 627 TCTAGTCC-TATATTACACCAACCCCAATCGAACC 660
          |||||
Sbjct 158 TCTAGTCTATATATTACACCAACCCCAATCGAACC 124
```

Figura 15

>gb|M19188.1 TRBKPMCO T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4
Length=165

Score = 172 bits (190), Expect = 1e-39, Identities = 109/118 (92%), Gaps = 0/118 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 82 TTAGTCTTGGGAGGGTGGTTCAAATCTGGGGCCGAAAAATCATGCATCTCCCCCGTACAT 141
      |||||
Sbjct 30 TTGGTTTGGGAGGGCGTTCAAATTTGGGGCCGAAAAATCATGCATCTCCCCCGTACAT 89

Query 142 TATATGGCCGAAAAATGGGGATTGTTTACGGGAGGTGAGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTGTA 199
      |||||
Sbjct 90 TATTTGGCCGAAAAATGGGGTTGTTTACGGGAGGTGGGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTGTA 147
```

>emb|AL732374.14 Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X
Contains a mitochondrial ribosomal protein S18C (MRPS18C) pseudogene, the 3' end of
the PHF8 gene for PHD finger protein 8 and a CpG island, complete sequence
Length=224187

Score = 169 bits (186), Expect = 1e-38, Identities = 108/118 (92%), Gaps = 5/118 (4%), Strand=Plus/Minus

```
Query 193 TGGTGTATTCAGAGATTCAACTTCTCCTGGTTTAGTCTTGGGAGGGTGTATGTGTATCA 252
      |||||
Sbjct 77480 TGGTCTATTCAGAGATTCAACTTCTCCTCGTTTAGTCTTGGGAGGGTGTATGTGTATCA 77421

Query 253 GAGCCTGTTATTGGTCTATTCAAAGATTCAACTTCTCCTGGTT-----TTGGGAGGG 305
      |||||
Sbjct 77420 GAGCCTGTTATTGGTCTATTCAAAGATTCAACTTCTCCTGGTTTAGTCTTGGGAGGG 77363
```

Score = 147 bits (162), Expect = 5e-32, Identities = 91/97 (94%), Gaps = 3/97 (3%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 TCCTGGTTTAGTCTTGGGAGGGTGTATGTGTATCAGAGCCTGGTTTTATGGTCTATTCA 60
      |||||
Sbjct 77455 TCCTCGTTTAGTCTTGGGAGGGTGTATGTGTATCAGAGCCTG---TTATGGTCTATTCA 77399

Query 61 AAGATTCAACTTCTCCTGGTTTAGTCTTGGGAGGGT 97
      |||||
Sbjct 77398 GAGATTCAACTTCTCCTGGTTTAGTCTTGGGAGGGT 77362
```

Figura 17

>emb|AL161804.4| Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-409I10 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human), complete sequence Length=151853

Score = 812 bits (900), Expect = 0.0, Identities = 452/453 (99%), Gaps = 0/453 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 188  ATGAAGCTTCATATTAATAAGTAGAAAGTTTGTAGAGACAAAATCAGAACTGTGAG 247
          |||
Sbjct 10835 ATGAAGCTTCATATTAATAAGTAGAAAGTTTGTAGAGACAAAATCAGAACTGTGAG 10894
Query 248  TCAGTCCATGATACCATTACAGTATATCCAAATGTGACACTACATTCCTTACTGGCTTAT 307
          |||
Sbjct 10895  TCAGTCCATGATACCATTACAGTATATCCAAATGTGACACTACATTCCTTACTGGCTTAT 10954
Query 308  CTTAGTTTTGACCCCAAAGGGCTCAGCATCACATATTTATGTCTGGGGCACTGGTGCTGG 367
          |||
Sbjct 10955  CTTAGATTTGACCCCAAAGGGCTCAGCATCACATATTTATGTCTGGGGCACTGGTGCTGG 11014
Query 368  CTGTCTACCATCAGATACCTGACAAGTCCTTGAGAGCTGGAAGCTTTCCTATATTGTCC 427
          |||
Sbjct 11015  CTGTCTACCATCAGATACCTGACAAGTCCTTGAGAGCTGGAAGCTTTCCTATATTGTCC 11074
Query 428  ACTGTTCTTTTCAAGATCTGCTACATAATCCATGGGGCCAGTGCAAAATGAATATTAAT 487
          |||
Sbjct 11075  ACTGTTCTTTTCAAGATCTGCTACATAATCCATGGGGCCAGTGCAAAATGAATATTAAT 11134
Query 488  AATTTTAAAGATAACAACAACAGAGCACTGAGCCAAGGGTGGGGACCTTCCAAGCACAAGG 547
          |||
Sbjct 11135  AATTTTAAAGATAACAACAACAGAGCACTGAGCCAAGGGTGGGGACCTTCCAAGCACAAGG 11194
Query 548  CCCTATATATCAACATAAGTCATCCCCTAGGAAGTCAGCTGTCTCTACTTCCAATGTCTA 607
          |||
Sbjct 11195  CCCTATATATCAACATAAGTCATCCCCTAGGAAGTCAGCTGTCTCTACTTCCAATGTCTA 11254
Query 608  GAATATTACAGGGCACGAAGTGGGGTTTCGATT 640
          |||
Sbjct 11255  GAATATTACAGGGCACGAAGTGGGGTTTCGATT 11287
```

Score = 78.8 bits (86), Expect = 5e-11, Identities = 52/57 (91%), Gaps = 2/57 (4%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 61  ACACATACACCATCCCAAGACTAAACCAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATACACCAA 117
          |||
Sbjct 74692  ACACATACACCCCTCCCAAGACTAAACCAGGAAGAAGTTGA--GTCTGAATAGACCAA 74746
```

Score = 64.4 bits (70), Expect = 1e-06, Identities = 51/59 (86%), Gaps = 3/59 (5%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1  TCCCAAGACTAAACCAGGAGGAAGTTGAATCTTTGAATAGACCAAATTAAGGCTCTGA 59
          |||
Sbjct 74704  TCCCAAGACTAAACCAGGAGGAAGTTGAGTC--TGAATAGACC--AATAGCAGGCTCTGA 74759
```

>gb|M19188.1| TRBKPMCO T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4
Length=165

Score = 118 bits (130), Expect = 5e-23, Identities = 71/75 (95%), Gaps = 0/75 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 110 TACACCAACCCCAATCGAACCTCACCTCCCGTAAACAATCCCCATTTTCGGCCATATAAT 169
          |||
Sbjct 147  TACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCGTAAACAATCCCCATTTTCGGCCAAATAAT 88
Query 170 GTACGGGTGAGATGC 184
          |||
Sbjct 87  GTACGGGGGAGATGC 73
```