



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



**Herança e fixação de minicírculos de kDNA de  
*Trypanosoma cruzi* no genoma de chagásicos e seus familiares**

Aluna: Manuela Maciel Britto Aragão

Orientador: Prof. Dr. Antonio Teixeira

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

Brasília – DF

2013

**Manuela Maciel Britto Aragão**

**Herança e fixação de minicírculos de kDNA de  
*Trypanosoma cruzi* no genoma de chagásicos e seus familiares**

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

Brasília – DF

2013

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

Financiamento: FAPDF / CNPq / CAPES

“Uma vez que as suas energias estejam todas concentradas nas raízes, surgirão novos brotos, novas folhagens, novos ramos, e você começará a mover-se para cima, em direção às estrelas”.

*Osho*

## DEDICATÓRIA

À minha amada família.

Aos meus pais, Marluce e Cezar, sempre presentes nos momentos importantes da minha vida, me dando amor e apoio incondicionais, e me permitindo seguir o meu caminho.

Aos meus queridos irmãos Diego, Gabi e Ruan por sempre me alegrarem e compartilharem comigo a alegria de compor a nossa família.

Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

*Se sou feliz é porque tenho pessoas que me acrescentam felicidade todos os dias. E toda oportunidade de agradecer carinho, atenção, amizade, coletividade e apoio não deve ser desperdiçada.*

Ao meu orientador, Prof. Teixeira, por confiar no meu trabalho, me proporcionando a oportunidade de fazer parte da história do LMPDC. Obrigada pelos ensinamentos e por me lembrar todos os dias da minha missão, das minhas responsabilidades e do meu potencial. A convivência e o aprendizado, adquiridos durante o mestrado, me fizeram crescer como bióloga e como pessoa.

À minha co-orientadora Nadjar pela atenção dedicada aos meus experimentos, por compartilhar os seus conhecimentos, tendo paciência em me auxiliar na caminhada pelo mundo da doença de Chagas, além de sempre ter palavras de apoio e abraços carinhosos.

À Mariana que, sempre muito disposta, me ajudou inúmeras vezes, principalmente com as centenas de sequências, sendo paciente em me ajudar com as diversas dúvidas que foram surgindo ao longo deste trabalho. Sem o seu auxílio acredito que ainda estaria na análise dos clones! Sou muito grata pela sua atenção.

À Capes e à FAPDF pela bolsa concedida e pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço a querida Eliete pela ajuda com os materiais esterilizados e pelo carinho distribuindo no corredor, e à Thais que pôs ordem na secretaria, organizando o almoxarifado e facilitando a nossa rotina de trabalho.

Aos queridos colegas do LMPDC. Aos estagiários que me ajudaram muito na bancada, especialmente: Herick, Marcelle e Camilla (hoje mestrandas), Aninha, Guilherme e Bruna; às parceiras de mestrado Ester e Tamires, pessoas de coração lindo que compartilharam o dia a dia pertinho de mim (conviver com vocês sempre alegrou os meus dias); ao Adriano pela constante disposição em ajudar e pela amizade; ao Alê pela auxílio com a parte de bioinformática (Aninha você também!!); à Perla, pelo carinho, pelas risadas e pela disposição em me ajudar nos experimentos; ao Rafael, por me inteirar um pouco sobre o trato com os animais do laboratório (fiquei devendo ser mais participativa); à Cássia, companheira de trabalho noturno (e fornecedora do melhor pão de queijo); e às pessoas queridas que já se foram do LMPDC deixando saudades, Gabi, Fernando e Ciro.

À Dra. Adriana Benevides que colaborou com a casuísta deste trabalho, se dedicando ao contato com os integrantes de uma das famílias aqui estudadas.

Às minhas queridas Lou e Marol, pelo carinho, pela ajuda na bancada, pelos ensinamentos, e, principalmente, pela importância que adquiriram na minha vida, se tornando amigas e estando sempre presentes. Obrigada por me acolherem tão bem e por todos os momentos de alegria, de conversas, de lanches (e açaí), de apoio e de amizade verdadeira. Marol, obrigada por ter esse coração tão bondoso e compartilhar comigo a amizade da querida, Ju. Estar com vocês enche o meu coração de amor e felicidade.

À querida Glaucia que contribuiu para que o meu caminho se cruzasse com o LMPDC. Agradeço o carinho sempre demonstrado e, também, por acreditar no meu potencial.

Aos familiares e amigos que me dão alegria à distância e que tornam minhas idas a minha terrinha, Aracaju, sempre recheada de muito carinho, contribuindo para que eu sempre volte com a energia reconstruída.

Aos amigos que entraram na minha vida durante a minha graduação em Salvador e que me matam de saudades. Em especial Helena, Raquel, Tábata, Dani, Tati e Thaís que são amigas para toda hora e que torcem muito por mim! Ao Pedro que me deu muito apoio na decisão de mudar para Brasília e por ter feito parte da minha história. À Renata, minha “mãe” científica, que se dedicou a guiar os meus primeiros passos em um laboratório de pesquisa.

Aos amigos que fiz ou reencontrei aqui em Brasília, em especial Priscila e Valéria. Agradeço por compreenderem a minha ausência e por sempre mandarem mensagens de apoio e carinho.

À Ceíça e Gerci que sempre cuidaram de mim e da minha família com infinitos gestos de carinho. Nunca conseguiremos retribuir tamanha dedicação. Vocês são seres especiais e muito iluminados. Meu mais carinhoso agradecimento!

Ao homem a quem coube o papel mais chato de todos: escutar sempre as minhas recorrentes reclamações de cansaço físico e mental. Obrigada, André, por ser esse namorado tão parceiro. As suas palavras de força e incentivo e o seu carinho constante foram essenciais para que eu estivesse sempre com um sorriso no rosto. Você me traz paz e felicidade! Juntos.

À minha família, por torcerem tanto por mim e por mostrarem sempre muito amor. Agradeço a paciência que tiveram comigo nesses últimos meses. Principalmente, agradeço a compreensão à minha ausência. Saibam que cada falta minha nos almoços de domingo, nos cinemas, no dia a dia de casa e nos passeios me incomodaram bastante. Prometo que irei recompensá-los com muito amor! Obrigada por serem a base da minha vida.

Em especial, agradeço aos voluntários que participaram desta pesquisa. Com certeza muita fé e esperança foram depositadas por eles em cada uma das amostras cedidas. Que a contribuição resultante desse estudo permita abrir portas que levem a qualidade de vida dos chagásicos.

Por fim, agradeço imensamente àqueles que me protegem. Obrigada pela constante presença, guiando e iluminando o meu caminho.

Shanti.

## RESUMO

A transferência lateral (TL) e vertical (TV) de minicírculos de DNA (kDNA) do *Trypanosoma cruzi* foram investigadas em 26 pessoas de quatro famílias. A infecção ativa foi documentada em cinco pessoas com o DNA nuclear do *T. cruzi*. Evidência da integração do kDNA foi documentada em todos esses casos. Foram obtidas sequências quimeras kDNA-DNA humano de 157 eventos de TL e TV as quais foram analisadas em bancos de dados. As integrações do kDNA foram mapeadas em 19 dos 23 cromossomos, e 72,4% das integrações ocorreram em elementos transponíveis: 80% dessas mutações ficaram retidas em retroelementos LINE-1. O gene do receptor olfatório RO<sub>1-17</sub> reteve 10 das 18 integrações de kDNA em regiões codificadoras. A técnica *tpTAIL*-PCR específica para este gene gerou mais 37 quimeras, totalizando 194 mutações de kDNA-DNA humano. Em 105 eventos (54%) das mutações estavam inseridas em *loci* de indivíduos consanguíneos, verdadeiros eventos de TGV herdados pelas progênes. Em 15 desses eventos (14%) as quimeras kDNA-DNA hospedeiro tinham topologia sugestiva de herança Mendeliana. Os demais 90 eventos (86%) apresentaram diversidade nas sequências de nucleotídeos dos minicírculos integradas no mesmo sitio do genoma de parentais e progênes. Este achado sugere que a maioria das mutações do kDNA no genoma humano apresentam padrão não Mendeliano. Verificou-se ainda que a diversidade de sequências de minicírculos integradas foi aumentada pelos fenômenos de recombinação, truncamento, mobilização e embaralhamento de regiões dos minicírculos nas mutações herdadas. A demonstração de crescimento do genoma com diversidade genética sugere especiação sem limite conhecido. Ademais, TL e TV contribuem para o magnífico fenômeno da evolução, definida por Darwin como “descendentes com modificações”.

**Palavras-chave:** doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, kDNA, transferência lateral, transferência vertical, LINE-1.



## ABSTRACT

The lateral and the vertical gene transfers (LT and VT) of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles was sought among 26 people in four families. The live *T. cruzi* infection was documented in five people showing the parasite nuclear DNA. The evidence of the kDNA integration was shown in all those cases. The kDNA-human DNA chimera sequences were obtained from 157 LT and VT events that were analyzed in databank. The kDNA mutations were found in 19 out of 23 chromosomes, and 72,4% of these integrations occurred in transposable elements; 50% of these mutations were present in the retrotransposable LINE-1. At the *locus* of the olfactory receptor OR<sub>1-17</sub> there were 10 among 18 integrations. The *tp*TAIL-PCR technique with primers specific to the OR<sub>1-17</sub> gene generated, additionally, 37 chimeras among a total of 194 chimeras kDNA-DNA disclosed in the human genome. A total of 105 (54%) mutations were inserted at various *loci* from bloodline individuals in four families, whose are truly events inherited from progeny. Among 15 of those events (14%) there were kDNA-host DNA mutations showing topology that suggests the Mendelian inheritance. The remaining 90 mutations (86%) revealed a broad genetic diversity arising from different minicircle sequences integrated at single *loci* in the parental and progeny. This finding indicates that a great majority of the kDNA mutations in the human genome is non-Mendelian. Additionally, it was shown an increasing diversity of minicircle sequences as a consequence of recombination, reshuffling, hitchhiking, and truncated minicircle at the inherited mutation sites. The documented genome growth and diversity of the minicircles flanking the host DNA at the mutation sites suggested unlimited speciation, hence LT and VT contribute for the magnificent unstoppable evolution, which was defined by Charles Darwin as “descendents with modifications”.

**Key words:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, kDNA, lateral transfer, vertical transfer, LINE-1.

## LISTA DE FIGURAS

		Pg.
<b>Figura 1</b>	Diferentes estádios de desenvolvimento do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	04
<b>Figura 2</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e transmissão vetorial para hospedeiro mamífero.	05
<b>Figura 3</b>	Micrografia eletrônica do kDNA da <i>Crithidia fasciculata</i> .	13
<b>Figura 4</b>	Esquema de um minicírculo de kDNA e os Blocos de sequências conservadas (CSBs).	14
<b>Figura 5</b>	Esquemas das regiões de onde foram obtidos os iniciadores e da reação <i>tp</i> TAIL-PCR.	44
<b>Figura 6</b>	<i>Southern blot</i> sobre produtos de PCR obtidos com iniciadores de nDNA e de kDNA em moldes de DNA genômico de indivíduos da Família D, hibridizados com sonda específica.	54
<b>Figura 7</b>	Heredograma das famílias com indivíduos positivos para nDNA e para kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	56
<b>Figura 8</b>	Sequência quimera padrão mostrando integração de minicírculo de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma humano.	59
<b>Figura 9</b>	Integração do kDNA no <i>locus</i> AL732374.14 do cromossomo X.	61
<b>Figura 10</b>	Caracterização das regiões flaqueadoras das integrações de kDNA no genoma humano.	63
<b>Figura 11</b>	Recombinação de sequências de minicírculos de kDNA que associam a região do gene da enzima Renina (REN) no cromossomo 1 com fragmento de sequência do cromossomo 18.	65
<b>Figura 12</b>	Sequência quimera com integração do kDNA no <i>locus</i> AJ973596.1 do cromossomo X, sítio do gene PQBP1.	67
<b>Figura 13</b>	Alinhamento dos clones da Família B que apresentaram integração de kDNA no <i>locus</i> AC084364.20 do cromossomo 12.	69
<b>Figura 14</b>	Alinhamento dos clones da Família B que apresentaram integração de kDNA no <i>locus</i> AC012596.4 do cromossomo 7.	70
<b>Figura 15</b>	Alinhamento entre os clones selecionados da Família B que apresentaram sequências integradas no <i>locus</i> AC012596.4 do cromossomo 7 com maior similaridade.	71
<b>Figura 16</b>	Alinhamento dos clones da Família C que apresentaram integração de kDNA no <i>locus</i> AC129028.3 do cromossomo 12.	72
<b>Figura 17</b>	Análise conformacional da região de integração do kDNA no <i>locus</i> AC129028.3 do cromossomo 12.	73

<b>Figura 18</b>	Alinhamento dos clones da Família C com integração do kDNA envolvendo o <i>locus</i> AC012596.4 do cromossomo 7.	74
<b>Figura 19</b>	Sequência quimera com integração de minicírculo de kDNA envolvendo os <i>loci</i> AL732374.14 do cromossomo X e BC137023.1 do cromossomo 1.	76
<b>Figura 20</b>	Sequências dos clones da Família D com integração de minicírculo de kDNA no <i>locus</i> NG_031854.1 do cromossomo 12.	77
<b>Figura 21</b>	Alinhamento dos clones da Família D que apresentaram integração de kDNA no <i>locus</i> NG_023443.1 do cromossomo 6.	79
<b>Figura 22</b>	Alinhamento dos clones da Família D que apresentaram integração de kDNA nos <i>loci</i> AL732374.14 e BC137023.1, do cromossomo X e 1, respectivamente.	80
<b>Figura 23</b>	Sequência quimera de evento integração de minicírculo de kDNA no <i>locus</i> AL732374.14 do cromossomo X e embaralhamento da quimera.	82
<b>Figura 24</b>	Sequências dos indivíduos de cada família com integração de kDNA apenas no <i>locus</i> AL732374.14 do cromossomo X.	85
<b>Figura 25</b>	Clones dos integrantes da Família C resultantes da <i>tp</i> TAIL-PCR específica para o gene do RO <sub>1-17</sub> .	88
<b>Figura 26</b>	Clones dos integrantes da Família D resultantes da <i>tp</i> TAIL PCR específica para o gene do RO <sub>1-17</sub> .	90
<b>Figura 27</b>	Análise da variação conformacional da região do <i>locus</i> BC137023.1 que abriga o gene do RO <sub>1-17</sub> .	92
<b>Figura 28</b>	Diferenças entre as sequências flanqueadoras hospedeira e homologia dos minicírculos de kDNA integrado no genoma de indivíduos da Família B.	93
<b>Figura 29</b>	Regiões variáveis de minicírculos de kDNA agrupadas em consensos de acordo com a similaridade entre elas.	94
<b>Figura 30</b>	Esquema ilustrando um evento de <i>hitchhiking</i> do kDNA carreado por um retrotransposon LINE 1.	100

## LISTA DE TABELAS

		Pg.
<b>Tabela 1</b>	Iniciadores específicos para <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizados nas PCR e <i>tp</i> TAIL-PCR	42
<b>Tabela 2</b>	Iniciadores específicos para DNA humano	45
<b>Tabela 3</b>	Sondas utilizadas nos procedimentos de hibridização	48
<b>Tabela A1</b>	Sequências de DNA humano com integração de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	136
<b>Tabela A2</b>	Sequências de DNA humano com integração de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> resultantes da <i>tp</i> TAIL-PCR específica para o gene RO1-17 do <i>locus</i> BC137023.1.	152

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AS</b>	<i>Anti sense</i>
<b>CBS</b>	Blocos de Sequências Conservadas
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>VER</b>	Endogenous retrovirus – retrovírus endógeno
<b>ET</b>	Elemento transponível
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HERV</b>	Retrovírus endógeno humano
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF</b>	Interferon
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>LINE</b>	<i>Long interspersed elements</i> – elemento entrepassado longo
<b>LTR</b>	<i>long terminal repeat</i> – longas repetições terminais
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b>Rev</b>	Reverso
<b>RO</b>	Receptor olfatório
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SINE</b>	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> – Elementos Nucleares Entrepassados Curtos
<b>SSC</b>	Tampão salino citrato de sódio

<b>SSPE</b>	Tampão salino fosfato de sódio - EDTA
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>Tm</b>	Temperatura média de anelamento
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i> – Região não-traduzida

# ÍNDICE

<b>I INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1. DOENÇA DE CHAGAS</b>	<b>01</b>
1.1 Epidemiologia	03
1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
1.3 Vias de transmissão	06
1.4 Manifestações clínicas	08
1.5 Diagnóstico	09
1.6 Tratamento	10
<b>2. <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>12</b>
2.1 Organização e estrutura do cinetoplasto	12
<b>3. PATOGÊNESE</b>	<b>15</b>
3.1 Persistência do parasito	16
3.2 Autoimunidade	18
3.2.1 Autoimunidade e integração do kDNA	20
<b>4. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS</b>	<b>24</b>
4.1 Tipos de elementos transponíveis no genoma humano	25
4.2 Mobilização e rearranjos em retroelementos e associação com doenças genéticas	28
<b>5. TRANSFERÊNCIA LATERAL DE DNA ENTRE ESPÉCIES DIFERENTES</b>	<b>31</b>
<b>6. TRANSFERÊNCIA VERTICAL DE DNA</b>	<b>33</b>
<b>7. JUSTIFICATIVA</b>	<b>35</b>
<b>II OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>1. OBJETIVO GERAL</b>	<b>37</b>
<b>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>37</b>
<b>III MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>1. GRUPO AMOSTRAL ESTUDADO</b>	<b>38</b>
<b>2. COLHEITA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>38</b>
<b>3. EXTRAÇÃO DE DNA</b>	<b>39</b>
3.1 De células mononucleares do sangue periférico de humanos	39
3.2 De formas epimastigotas de cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.3 De kDNA das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
<b>4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE</b>	<b>41</b>
4.1 Amplificação do DNA nuclear (nDNA) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4.2 Amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
<b>5. AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE DNA HUMANO QUE FLANQUEIAM O kDNA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> INTEGRADO – tpTAIL-PCR</b>	<b>43</b>
5.1 Seleção de sequências aneladoras gene-específicas para o teste tpTAIL PCR	46
<b>6. TRANSFERÊNCIA DOS PRODUTOS DE PCR PARA MEMBRANA DE NYLON</b>	<b>47</b>
<b>7. MARCAÇÃO DE SONDAS COM <math>\alpha^{32}\text{P}</math>-dATP</b>	<b>48</b>
<b>8. SOUTHERN BLOT</b>	<b>49</b>
<b>9. CLONAGEM DE BACTÉRIAS <i>Escherichia coli</i> COMPETENTES</b>	<b>50</b>
9.1 Ligação dos produtos da tpTAIL PCR em vetores pGEM T-easy	50
9.2 Preparação e transformação das bactérias <i>E. coli</i> competentes	50
9.3 Seleção dos clones para o sequenciamento	51
9.4 Extração, digestão e seleção do DNA plasmidial	52

<b>10. ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO E MÉTODOS DE ESTATÍSTICA E BIOINFORMÁTICA EMPREGADOS</b>	52
<b>IV RESULTADOS</b>	53
<b>1. EMPREGO DA PCR COM SEQUÊNCIAS ANELADORAS DE nDNA e kDNA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS INFECÇÕES PELO <i>T. cruzi</i></b>	53
<b>2. MAPEAMENTO DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE kDNA NO GENOMA DE INDIVÍDUOS NAS FAMÍLIAS DO ESTUDO</b>	56
2.1 Topologia das regiões flanqueadoras às integrações de kDNA	59
2.2 Identificação de eventos de integração do kDNA em cada família	64
2.3 Integrações de minicírculos de kDNA em elemento LINE-1 do <i>locus</i> preferencial de integração AL732374.14 do cromossomo X	80
2.4 Estrutura de sequências do DNA em mutações no gene do Receptor Olfatório <sup>1-17</sup>	86
2.5 Tipologia específica numa série de minicírculos encontrados em mais de um evento de integração do kDNA no genoma humano	92
<b>V DISCUSSÃO</b>	96
<b>1. ASPECTOS GERAIS</b>	96
<b>2. MAPEAMENTO DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE kDNA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> NO GENOMA HUMANO</b>	97
2.1 Eventos de integração de minicírculos de kDNA em regiões gênicas	102
<b>3. VARIABILIDADE DE MINICÍRCULOS DE kDNA ENVOLVIDOS NOS EVENTOS DE INTEGRAÇÃO</b>	104
<b>4. ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA VERTICAL E FIXAÇÃO DO kDNA</b>	106
<b>5. ASPECTOS DA HERANÇA NÃO MENDELIANA</b>	111
<b>VI CONCLUSÕES</b>	113
<b>VII PERSPECTIVAS</b>	115
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	116
<b>ANEXO 1</b>	135
<b>ANEXO 2</b>	151



# I INTRODUÇÃO

## 1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, foi descoberta no período de 1907 a 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Durante aquele período, Doutor Chagas trabalhava em uma campanha de controle da Malária, que dificultava a construção de uma estrada de ferro no interior de Minas Gerais, tendo como consultório e laboratório um vagão de trem estacionado no município de Lassance. Ouvindo os habitantes locais, ele soube que um inseto popularmente conhecido como “barbeiro”, era frequentemente encontrado nas residências precárias daquela região. O tal inseto era hematófago, notívago, que picava, principalmente, a face de crianças adormecida e indefesas. O médico estudioso sabia que a Tripanossomíase Africana, ou doença do sono, era transmitida pela mosca tse-tsé e, talvez, isto o tivesse feito pensar que o “barbeiro” poderia ser vetor de doença. Ao dissecar o inseto e examiná-lo ao microscópio Chagas encontrou um protozoário flagelado no sistema digestivo do inseto (Chagas, 1909). Curioso e inteligente, Carlos Chagas enviou barbeiros contaminados para o Instituto Manguinhos (atual Instituto Oswaldo Cruz), no Rio de Janeiro. Seguindo sua recomendação, o conteúdo fecal do intestino do inseto foi inoculado em cobaias, e aquele protozoário flagelado do intestino do inseto foi reencontrado no sangue do animal inoculado, semanas depois. Entrementes, formas flageladas do protozoário foram encontradas em lâminas com o sangue de uma criança febril, a menina Berenice, e, então, documentou-se o primeiro caso agudo da doença que mais tarde recebeu o nome do seu descobridor. A vasta pesquisa feita pelo Dr. Carlos Chagas sobre essa “Nova entidade mórbida do homem” resultou em um dos maiores feitos da história da medicina. Doutor Chagas identificou o inseto-vetor, o protozoário designado com o nome de *Trypanosoma cruzi* (homenagem ao seu orientador, o eminente sanitarista Oswaldo Cruz), descreveu os ciclos de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados (Hemiptera: Triatominae) e vertebrado (mamíferos de várias classes), e, ainda, documentou as manifestações clínicas na fase aguda e na fase crônica da doença (Chagas, 1909; Chagas, 1916; Tanowitz e cols, 2009). Pela

sua notável contribuição científica, Carlos Chagas teria sido indicado ao prêmio Nobel de medicina em 1913 e 1921. Dizem os biógrafos (revisto em Teixeira, 2007) que a ferrenha oposição de seus pares na Academia Nacional de Medicina à nova entidade mórbida teria dificultado a apreciação do valor de sua obra. A infecção humana pelo *T. cruzi* pode ocorrer por diferentes vias de transmissão. As vias mais observadas são a vetorial (70 a 90%), a transfusional (1 a 20%) e a transplacentária (0,5 a 10%) (Coura e cols, 2012). A aquisição do parasito pela ingestão de alimentos contaminados, transplante de órgãos, e acidentes em hospitais e laboratórios de pesquisa também ganham importância crescente.

O trabalho seminal do Dr. Carlos Chagas gerou conhecimento essencial para a prevenção da Tripanossomíase Americana à medida que identificou o inseto vetor que se alimenta de sangue de mamíferos, aves, e outros animais de sangue frio. A esse respeito, insetos ancestrais e ubituosos, vicejando no continente Americano há mais de 90 milhões de anos, podem ser encontrados sempre próximos a sua fonte de alimento, sem obstáculos supostos como fronteiras geopolíticas. Por exemplo, as espécies de barbeiros que se alimentam de sangue humano tendem à domiciliar nas choupanas de pobres camponeses, nos países da América Latina. Essas espécies (*Triatoma infestans*, *T. sordida*, *T. braziliensis*) foram desalojadas do domicílio com inseticidas durante campanhas conduzidas com sucesso pelo Ministério da Saúde, particularmente, no Brasil (Teixeira e cols, 2006b).

Passados mais de 100 anos da sua descoberta, a doença de Chagas ainda é considerada uma doença negligenciada (WHO, 2013). Na maioria dos casos, as pessoas acometidas com a doença são provenientes de populações de baixa renda, motivo pelo qual não se percebe grandes interesses em investir dinheiro público e privado para o tratamento e desenvolvimento de novas drogas efetivas na eliminação do parasito e cura da doença. Das doenças parasitárias, ela é considerada a que provoca o maior impacto sócio-econômico na América Latina, sendo responsável pela perda de produtividade estimada em US\$ 1.2 bilhão por ano (WHO, 2012).

Muitas questões acerca da patogênese, das manifestações clínicas e do tratamento da doença ainda não foram esclarecidas, e é exatamente a busca de

conhecimento novo que confere a doença de Chagas um apelo ao desafio intelectual presente na ciência pragmática (Biolo e cols, 2010).

## 1.1 Epidemiologia

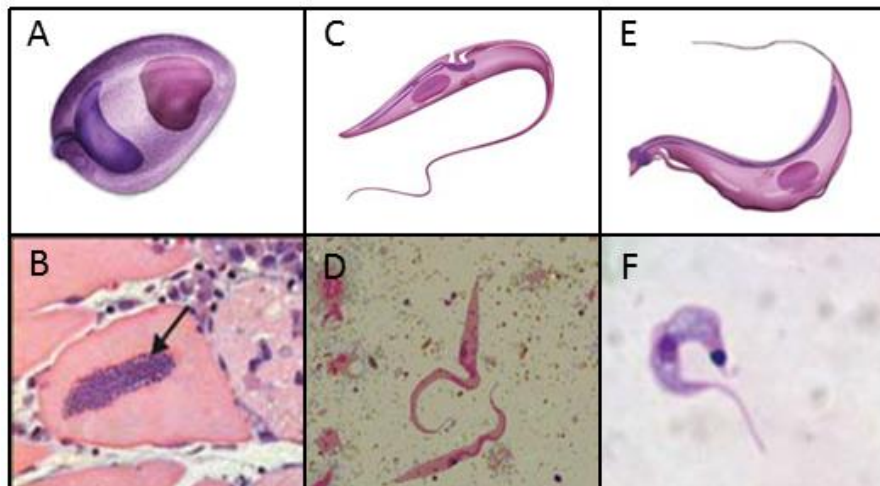
Inicialmente, a doença de Chagas era encontrada em habitantes de áreas rurais onde a população humana habitava cafuas cobertas de palha, com paredes de barro sustentadas por paus a pique. As cafuas eram mais adequadas aos barbeiros que aos humanos que ali coabitavam. No pequeno espaço ocupado por famílias de muita gente, os barbeiros formavam colônias com crescimento estimulado pela abundância de alimento. Durante o repasto de sangue, a população naquelas choupanas eram infectadas pelo *T. cruzi* presente nas fezes do inseto contaminado (ver descrição do ciclo do *T. cruzi* no item 1.2). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), no período de 1981 a 2009, o total de pessoas infectadas no mundo caiu de 20 milhões para aproximadamente 10 milhões, estimando-se que atualmente existam de 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, distribuídas em 21 países da América Latina (WHO, 2012). As estimativas sugeriram que no Brasil o total de pessoas infectadas entre os anos de 1975 a 2005 decresceu de 4.5 milhões para 1.9 milhões (Schmunis, 2007). Essa drástica redução tem sido associada à implementação de campanhas de controle vetorial nas áreas endêmicas e de triagens nos bancos de doação de sangue, possibilitando a exclusão de sangue contaminado pelo *T. cruzi*, nos últimos 25 anos (Lascure e cols, 2010).

O êxodo rural e a constante mobilidade da população mundial alterou o panorama da epidemia chagásica, agora presente em regiões não endêmicas (Schmunis, 2007; Castro, 2009; WHO, 2012). Estima-se que 100 milhões de pessoas estão sobre risco de contrair a infecção pelo *T. cruzi* (Moncayo e Silveira, 2009) e que ocorrem cerca de 300.000 novos casos por ano no mundo (Gutierrez e cols, 2009). Em países como Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, Bélgica, França, Itália, Portugal, Alemanha, Holanda, entre outros países europeus, já foram relatados casos de pessoas contaminadas com o *T. cruzi* (WHO, 2010). A transfusão sanguínea, a transmissão congênita e a contaminação via oral (ver item 1.3) são as

principais formas de infecção associadas aos novos casos de infecção da doença em áreas não endêmicas (Castro, 2009; Schmunis e Yadon, 2010).

## 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae, que tem ciclo de vida heteroxênio. No hospedeiro mamífero e no inseto vetor observam-se diferentes estádios morfológicos e funcionais (Figura 1). As principais formas de desenvolvimento são amastigotas (Fig 1.A e B), epimastigotas (Fig 1.C e D) e tripomastigotas (Fig 1.E e F).



**Figura 1 – Diferentes estádios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*. A, C e E) Esquema das formas do *Trypanosoma cruzi*: amastigota, epimastigota e tripomastigota, respectivamente. B, D e F) Imagens do desenvolvimento do *T. cruzi*: ninho de amastigotas (seta), epimastigotas e tripomastigotas. (Adaptado de Coura, 2012).**

O ciclo de vida do *T. cruzi* relacionado à transmissão vetorial em mamíferos está representado na Figura 2. No intestino médio do triatomíneo infectado ocorre a multiplicação dos epimastigotas por divisão binária, em seguida, os parasitas se locomovem para a porção posterior do intestino e para o reto onde sofrem transformação para a forma infectante tripomastigota metacíclica. No momento do repasto sanguíneo os barbeiros liberam as suas excretas na pele do hospedeiro. Uma vez ocorrendo o contato dos dejetos contaminados com a região da picada ou com alguma mucosa, as formas tripomastigotas infectantes entram na corrente sanguínea e infectam diversos tipos celulares por processos como

fagocitose, endocitose ou penetração ativa, sendo englobadas por um vacúolo parasitóforo. Após vários ciclos de replicação, os amastigotas se transformam em tripomastigotas circulantes e rompem as células hospedeiras gerando um extravasamento de parasitos na corrente sanguínea. Com essa liberação, os protozoários infectam outras células do hospedeiro gerando uma grande propagação da infecção. O ciclo retoma a sua origem quando um inseto vetor não contaminado se alimenta do sangue infectado com tripomastigotas circulantes. Após passar pelo intestino anterior do barbeiro, o *T. cruzi* na forma tripomastigota se transforma em epimastigota (Garcia e cols, 2007; Rassi Jr e cols, 2010; Barrias e cols, 2013).

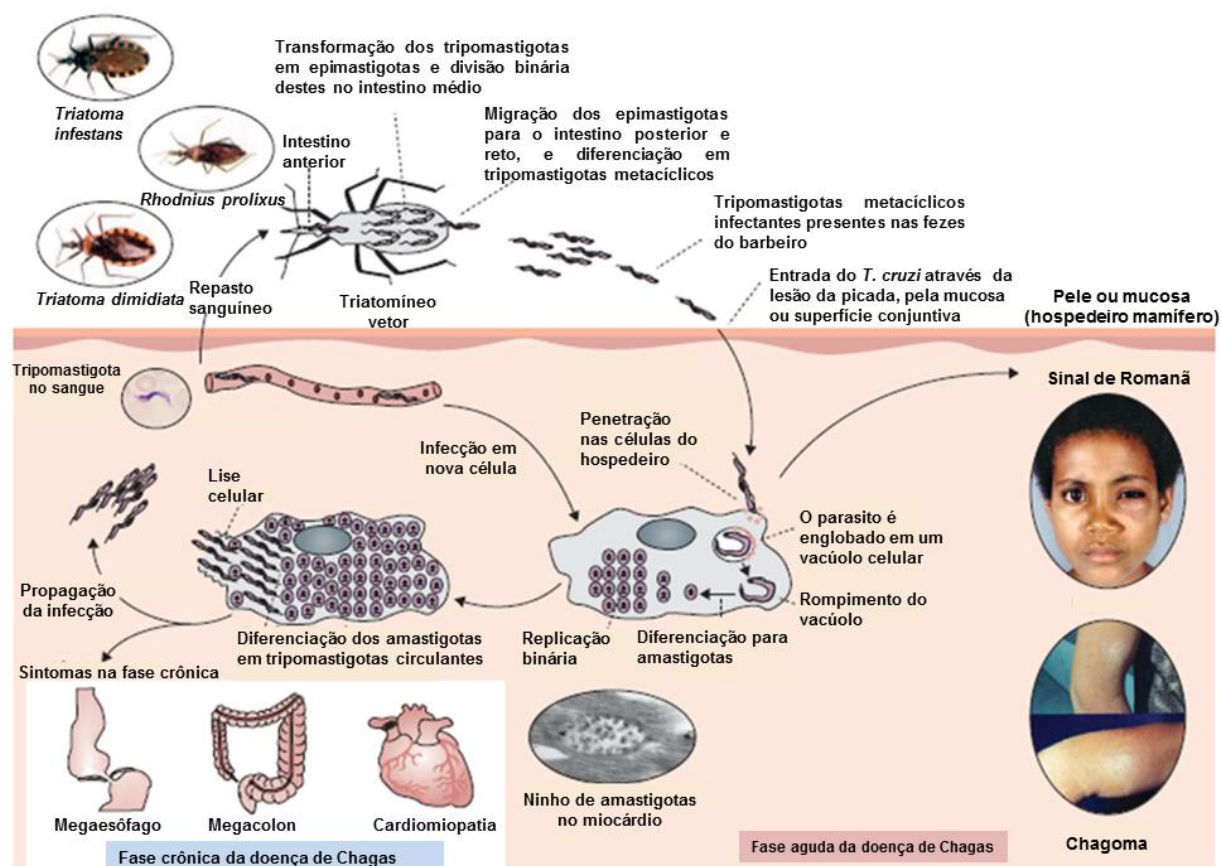


Figura 2 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e transmissão vetorial para hospedeiro mamífero. (Adaptado de Rassi Jr e cols, 2010).

### 1.3 Vias de transmissão

Em áreas endêmicas, a principal forma de transmissão do *T. cruzi* é através de um inseto vetor. A transmissão vetorial ocorre pelo contato do hospedeiro com as fezes ou urina contaminadas com o parasito como descrito no item 1.2. Apesar da transmissão vetorial ser um evento característico de áreas endêmicas foram relatados na bibliografia casos de infecção autóctone em países não endêmicos como nos Estados Unidos (Navin e cols, 1985; Dorn e cols, 2007), sendo recentemente detectados triatomíneos infectados com *T. cruzi* em áreas domiciliares e peridomiciliares (Kjos e cols, 2013).

A doença que primariamente era uma infecção rural passou a ser uma doença urbana também transmitida por transfusão sanguínea. No mundo, a transmissão via transfusão pode ser considerada a segunda forma mais frequente de contaminação pelo *T. cruzi* (Schmunis, 2007). No Brasil, desde a década de 80 ocorre uma triagem dos doadores de sangue que podem estar contaminados com o objetivo de reduzir os índices de transmissão por esta via (Kirchhoff, 1993). Com a migração urbana e a imigração de latino-americanos para diversos países não endêmicos essa via se tornou um risco iminente de contágio (Grant e cols, 1989; Nickerson e cols, 1989; Castro, 2009; Strasen e cols, 2013).

A ocorrência de casos de infecção da doença de Chagas via placenta não se restringe apenas às mulheres da zona rural de áreas endêmicas. Jackson e cols (2009) relataram casos de transmissão congênita na Suíça e Lazarte e cols (2012) descreveram o primeiro caso nos Estados Unidos. Apesar dos relatos, não há uma avaliação da incidência da transmissão congênita em áreas não endêmicas, contudo, na América Latina estima-se que a contaminação ocorra em mais de 15.000 nascidos por ano (Carlier e cols, 2011). Em geral, as gestantes chagásicas são crônicas e assintomáticas, contudo, podem apresentar um aumento no risco de parto prematuro, de bebê com baixo peso ou de natimorto (Howard e cols, 2013).

Desde a década de 30, diversos estudos experimentais vêm demonstrando a transmissão do *T. cruzi* para animais onívoros ou insetívoros que se alimentam de barbeiros infectados ou que ingerem comida contaminada com o parasito (Pereira e cols, 2010). Suspeita-se que o primeiro caso descrito de transmissão oral tenha ocorrido ainda durante os estudos de Carlos Chagas,

juntamente com o Dr. Oswaldo Cruz ao verificar a presença de *T. cruzi* no sangue periférico de saguis *Callithrix* que foram expostos a triatomíneos infectados e, possivelmente, se alimentaram dos insetos (Coura, 2013). A partir dos resultados dessas pesquisas, a transmissão via oral começou a ganhar merecida atenção.

No Brasil, até o ano de 2004 pouco se conhecia sobre casos de infecção aguda decorrente de contaminação via oral. Registros de surtos de contaminação foram feitos no Rio Grande do Sul e na Paraíba (ANVISA, 2008). Casos recentes de contaminação pela via oral ocorreram em Santa Catarina, em 2005, pela ingestão de caldo de cana de açúcar, e outros dois eventos ocorreram na região Amazônica, no Pará em 2006, e em Amazonas em 2007, pela ingestão de sucos de açaí e de bacaba (ANVISA, 2008; Yoshida, 2008). Surtos de doença de Chagas aguda por ingestão de alimentos contaminados já foram descritos em outros países como Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela, sendo que neste último ocorreu o maior surto de contaminação oral já descrito, com um total de 103 pessoas infectadas (Munõz-Calderón e cols, 2013; Ramírez e cols, 2013).

O transplante de órgãos de doadores infectados é mais uma via de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Em geral, foram relatados casos de contaminação mediante transplantes de coração, pâncreas, fígado e, principalmente, de rins. (Chin-Hong e cols, 2011; Marquéz e cols, 2013). Por estarem imunossuprimidos, os pacientes que recebem transplantes de órgãos de doadores chagásicos devem ser monitorados regularmente e tratados de forma apropriada para prevenir a contaminação ou a reativação da doença (WHO, 2002).

Casos de transmissão do *T. cruzi* via aleitamento materno já foram descritos, contudo, como a grande maioria das mães já se encontram na fase crônica e apresentam baixa parasitemia, o aleitamento não deve ser proibido, em decorrência do seu extremo benefício quanto a saúde geral do bebê. É importante ressaltar que sangramento de mamilos durante amamentação pode indicar suspensão da amamentação (Norman e López-Vélez, 2013).

A contaminação acidental de pessoas em jornada de trabalho já foi descrita tanto em países endêmicos como não endêmicos e, em geral, se resume a infecção de técnicos, médicos ou pesquisadores que lidam com material contaminado, tais como meio de cultura do parasito, sangue de pacientes e animais infectados (WHO, 2002).

Outras formas excepcionais de transmissão têm sido sugeridas, às vezes com respaldo experimental. A possibilidade de transmissão do *T. cruzi* via picada de outros artrópodes, tais como culicíneos, flebotomíneos e anoplura (piolho), que sugam hospedeiros contaminados; e, por último, existe possibilidade de transmissão pela via sexual (Dias e Amato Neto, 2011), já demonstrada em camundongos (Rios, 2013).

#### **1.4 Manifestações clínicas**

A infecção pelo *T. cruzi* tem duas fases separadas pelas manifestações clínicas distintas - a fase aguda e a fase crônica. Entretanto, na grande maioria dos casos a infecção permanece assintomática ao longo da vida do paciente, sendo diagnosticada apenas ocasionalmente pelo exame médico ou pela triagem em banco de sangue (Prata, 2001).

Na fase aguda, cerca de 95% dos pacientes não apresentam sintomas clínicos e a infecção subclínica assintomática pode não ser diagnosticada, gerando subnotificação de novos casos. Nos demais casos, os sintomas observados vão de febre, dores musculares e articulares, mal estar, diarreia, distúrbios respiratórios, cianose, coma, podendo culminar em morte, em menos de 5 % dos casos, por miocardite ou meningoencefalite. Nesses casos pode ser observado sinal de porta de entrada do *T. cruzi*, o chagoma na pele ou sinal de Romaña com edema endurecido, bipalpebral, unilateral (Figura 2). No início da infecção aguda altos níveis de parasitemia são detectados pelos testes parasitológicos, e os testes sorológicos mostram anticorpos IgM anti-*T. cruzi*. Raramente fatal, os sintomas da fase aguda desaparecem ao longo de quatro a oito semanas e a partir de então os pacientes entram na fase crônica da infecção, clinicamente indeterminada (Teixeira e cols, 2006b).

Durante a fase crônica, dois terços das pessoas infectadas com *T. cruzi* permanecem assintomáticas ao longo da vida, o que as caracterizam na forma crônica indeterminada da doença. Passadas duas a três décadas pós infecção inicial, um terço dos indivíduos desenvolvem sintomatologia. Em 94,5 % dos casos ocorrem lesões graves no coração, e os 4,5 % remanescentes desenvolvem a síndrome dos megas, megaesôfago e megacólon, que afeta o sistema digestivo



(Teixeira e cols 2006b). As manifestações mais severas da doença são insuficiência cardíaca (IC), arritmias e tromboembolia (Biolo e cols, 2010). No Brasil, a doença de Chagas é responsável pela quinta maior frequência (6%) de diagnóstico de IC, e no Estado de São Paulo no ano de 2006, Chagas foi a responsável por 8% das mortes relacionadas a IC (Bocchi e cols, 2013).

Por apresentar altas taxas de parasitemia na fase aguda, o diagnóstico da infecção pode ser feito com maior facilidade já que é comum encontrar a presença do *T. cruzi* na circulação sanguínea assim como vários ninhos de amastigotas nos tecidos infectados. Em detrimento da infecção na fase crônica ser geralmente críptica, em geral, só é possível a demonstração direta de ninhos de amastigotas nos tecidos em apenas 10 a 20% dos chagásicos (Teixeira e cols, 2007).

### **1.5 Diagnóstico**

Diferentes estratégias foram desenvolvidas para o diagnóstico da doença de Chagas e os métodos podem ser divididos em parasitológicos, sorológicos ou moleculares. A escolha do método diagnóstico apropriado leva em consideração a fase da doença em que o paciente se encontra.

Durante a fase aguda, observa-se a presença de muitos parasitas circulantes no sangue sendo possível detectá-los através de testes parasitológicos diretos com a observação em microscópio óptico. As metodologias mais empregadas são gota de sangue a fresco, gota espessa e métodos de concentração do parasito. Os testes parasitológicos indiretos são apropriados para diagnósticos na fase crônica da doença devido a difícil detecção dos parasitos diretamente na amostra, o xenodiagnóstico, a hemocultura e a inoculação em animais de laboratório são os métodos comumente utilizados. Para o diagnóstico molecular podem ser empregadas tanto a PCR qualitativa quanto a quantitativa, sendo possível detectar DNA ou RNA do parasito e certificar a presença do *T. cruzi* no fluido biológico. Os testes sorológicos são indiretos e baseados na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Pela sorologia é possível detectar a fase da doença que o paciente se encontra, pois a fase aguda é caracterizada por altos níveis de IgM anti-*T. cruzi* e a fase crônica por altos índices de IgG anti-*T. cruzi*. Os diagnósticos mais utilizados são

imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA. (WHO, 2002; Coura e cols, 2012 – PAHO).

Para a confirmação do diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* é indicada a realização de pelo menos dois testes diferentes combinados. A utilização do diagnóstico molecular para complementar outros diagnósticos vem aumentando desde que tem sido demonstrado na literatura que a sensibilidade da PCR é superior à da hemocultura e a do xenodiagnóstico (Ministério da Saúde, 2005, Martínez e cols, 2013).

## 1.6 Tratamento

O tratamento para a doença de Chagas visa a eliminação do parasito e a redução da probabilidade de desenvolvimento dos sintomas. As drogas registradas para o tratamento são o Nifurtimox e o Benzonidazol, nitroderivados com ação anti-tripanosoma. A eficiência de ambas no tratamento de recém-nascidos e durante a fase aguda, tem sido relatada pela Organização Mundial de Saúde, enfatizando o limitante do tratamento durante a fase crônica (WHO, 2012).

Atualmente no Brasil, a única droga utilizada para o tratamento dos pacientes com doença de Chagas é o Benzonidazol que, apesar de reduzir a parasitemia na fase aguda da doença não apresenta efeito na redução da progressão das lesões patológicas (Lauria-Pires e cols, 2000). Dessa forma, o tratamento da doença de Chagas é um assunto bastante controverso, com duas vertentes opostas quanto a funcionalidade, a eficiência e os efeitos colaterais do tratamento.

Estudos que defendem o tratamento da doença de Chagas por esse nitroderivado relatam redução da parasitemia e melhora no prognóstico dos pacientes tratados precocemente, quando comparado com aqueles sem o tratamento, obtendo em alguns casos a conversão da sorologia para resultado negativo (Fernandes e cols, 2009; Machado-de-Assis e cols, 2013). Entretanto, menos de 6% dos pacientes com Chagas crônico apresentam resultados parasitológicos negativos.

Lauria-Pires e cols (2000) acompanharam pacientes chagásicos crônicos por 10 anos e verificaram que àqueles que fizeram o tratamento com benzonidazol,

por 30 ou 60 dias, permaneciam com a infecção crônica após tratamento e as alterações progressivas do Eletrocardiograma (ECG) desses pacientes não tinham diferenças estatísticas significativas quando comparados com os resultados dos infectados não tratados. Sendo assim, os autores não recomendam o uso do benzonidazol como tratamento da doença de Chagas, pois além dos efeitos colaterais severos, o tratamento não é eficaz. Em recente tese de doutorado, Souza (2012) empregou diferentes esquemas terapêuticos em camundongos (*Mus musculus*) BALB/c com infecção recente pelo *T. cruzi*. O tratamento com doses de benzonidazol quatro vezes acima da usada em tratamento humano, combinado ou não com inibidores zidovudina e ciprofloxacino não erradicaram as infecções nos camundongos, sendo observada a contínua progressão da rejeição destrutiva e não promovendo a erradicação da infecção.

Durante a fase crônica, onde a maioria dos infectados se encontram, o tratamento se mostra insatisfatório e deve ser tratado com bastante cautela pela sua ineficiência e pelos efeitos colaterais deste medicamento (Guedes e cols, 2012). É registrado na literatura que o uso deste composto acarreta diversos efeitos colaterais como dores de cabeça, anorexia, distúrbios visuais e mentais, linfadenopatia, hipersensibilidade, agranulocitose, trombocitopenia purpura, depressão da medula óssea e neuropatia periférica (Coura e Castro, 2002).

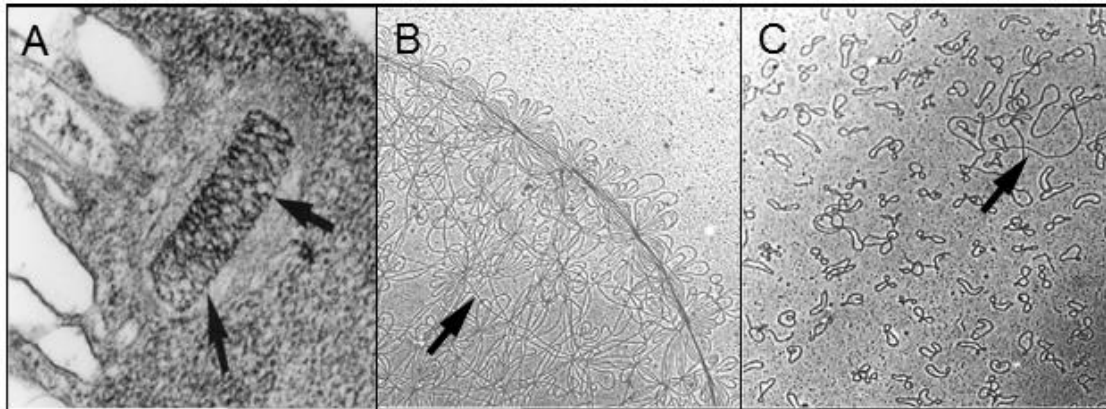
Apesar dos esforços feitos há décadas em busca de uma forma eficiente e segura de tratamento e de alguns trabalhos preconizarem que o uso do benzonidazol resulta na baixa de parasitemia e na conversão dos resultados sorológicos positivos para negativos, casos de reativação da doença associados à imunodeficiência já foram relatados, principalmente em pacientes com infecção concomitante por HIV (Cordova e cols, 2008; Pinto e cols, 2013). Atualmente, com a ausência de vacinas e de drogas eficientes, o controle e a redução da prevalência da doença dependem dos esforços dedicados aos programas de controle dos triatomíneos vetores e da triagem sorológica nos bancos de doação de sangue (Abad-Franch e Monteiro, 2005).

## 2. ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário unicelular, hemoflagelado e no hospedeiro invertebrado é intracelular obrigatório e, assim como os integrantes da ordem Kinetoplastida, possui uma mitocôndria diferenciada chamada cinetoplasto que abriga um DNA diferenciado, o kDNA. Baseado na genética molecular, em características eco-epidemiológicas e na patogenicidade, atualmente, foi reconhecido que as cepas de *T. cruzi* podem ser distinguidas em seis tipos discretos de unidade (DTUs – *discrete typing units*), que levam a nomenclatura TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales e cols, 2012). Em 2005 foi publicado o sequenciamento genômico da cepa de referência CL Brener do *T. cruzi*, classificada como TcVI, onde foi revelado que o genoma diploide do parasito possui aproximadamente 22.570 proteínas e que pelo menos 50% da sua composição consiste em sequências repetitivas, famílias de genes de proteína de superfícies e repetições teloméricas (El-Sayed e cols, 2005). Em estudo recente, foram comparados os estoques de *T. cruzi* CL Brener e Sylvio X10/1 (TcI), foram comparadas e mostraram diferenças entre elas, sendo a mais significativa, uma variação do tamanho de diversas famílias multigênicas que codificam importantes proteínas de superfície (Franzén e cols, 2011).

### 2.1 Organização e estrutura do cinetoplasto

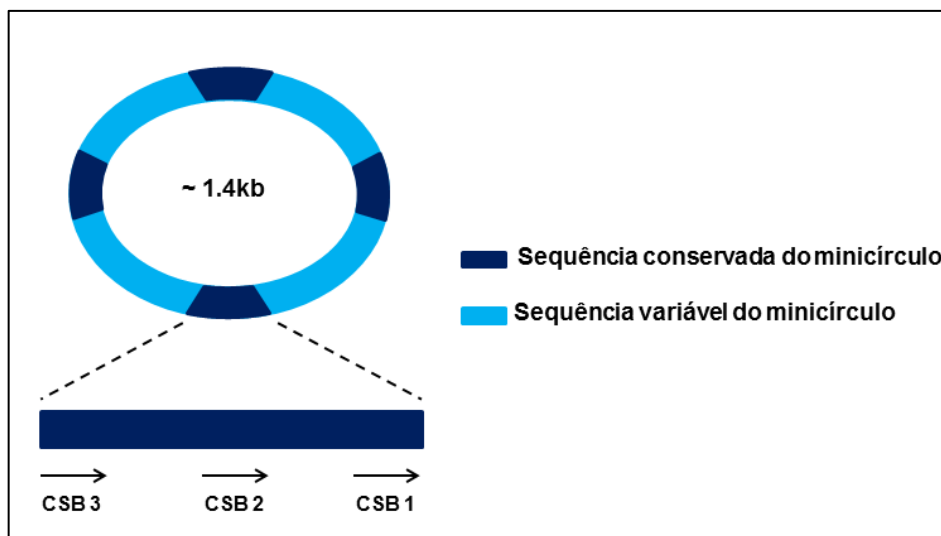
O cinetoplasto é uma mitocôndria única e diferenciada, localizada no citoplasma do *T. cruzi* e próximo ao corpo basal do flagelo, sendo a sua forma e estrutura variáveis de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito (Souza, 2009) como ilustrado na Figura 1. O kDNA dessa organela é complexo em sua organização e função, consistindo de uma grande rede entrelaçada de moléculas de DNA circular, os maxicírculos e minicírculos, que representam cerca de 20-25% do DNA total da célula (Ray, 1989; Westenberger e cols, 2006). A estrutura concatenada da rede de kDNA pode ser desfeita *in vitro* a partir de um tratamento com a enzima Topoisomerase II, possibilitando a visualização dos maxicírculos e dos minicírculos como demonstrado na Figura 3 (Klingbeil e cols, 2001).



**Figura 3 – Micrografia eletrônica do kDNA da *Crithidia fasciculata*. A)** Secção longitudinal da rede de kDNA (setas) (Lukes e cols, 2002). **B)** Rede concatenada de kDNA com a presença dos minicírculos e dos maxicírculos (setas). **C)** kDNA decatenado pela ação da Topoisomerase II. Vários minicírculos livres e um maxicírculo (seta) (Liu e cols, 2005).

Os maxicírculos estão distribuídos em dezenas de cópias e possuem entre 20 e 40 kb. Essas moléculas de DNA são funcionalmente análogas às mitocôndrias dos eucariotos e codificam os produtos gênicos típicos desta organela. Como produto da transcrição, os maxicírculos codificam dois rRNAs, RNAs guias (gRNAs) que editoram maxicírculos, cujos transcritos passam por modificações de seus RNAs mensageiros (mRNAs) funcionais. A editoração gRNA consiste na inserção ou deleção de resíduos de uridina em sítios específicos do transcrito, gerando a formação de novas fases de leitura aberta (ORFs – *Open Region Frames*) (Klingbeil e Englund, 2004; Westenberger e cols, 2006; Souza, 2009).

Os minicírculos de kDNA do *T. cruzi* estão representados em milhares de cópias com tamanho aproximado de 1.4 kb (Thomaz e cols, 2007). A sequência desses minicírculos é heterogênea, entretanto, apresenta em comum uma organização molecular peculiar com quatro regiões de DNA conservado, localizados a 90 ° de distância um do outro e intercalados por sequências de DNA variável (Figura 4). Nas porções conservadas existem três regiões com sequências em comum entre os minicírculos, os blocos de sequências conservadas (CSB, *conserved sequence blocks*) (Ray, 1989). Com a utilização de iniciadores específicos para a região conservada e para a região variável, diversos estudos demonstraram que o tamanho aproximado dessas sequências é de 120 bp e 330 pb, respectivamente (Junqueira e cols, 2005).



**Figura 4 – Esquema de um minicírculo de kDNA e os Blocos de sequências conservadas (CSBs).** O minicírculo de kDNA tem aproximadamente 1.4 kb e apresenta regiões de DNA conservado (azul escuro) intercaladas por DNA variável (azul claro). O esquema de uma região conservada demonstra a localização de cada um CSB (setas).

A função designada aos transcritos dos minicírculos é participar da editoração dos mRNAs dos maxicírculos. Cada minicírculo codifica de 3 a 5 gRNAs que, juntamente com os gRNAs dos maxicírculos, ancoram sua porção 5' terminal na porção 3' terminal dos transcritos não funcionais dos maxicírculos. Dessa forma, o gRNA ancorado serve como guia para a inserção ou deleção de resíduos de uridina em locais específicos do mRNA, gerando, após a editoração, a formação de novas ORFs e tornando os mRNAs funcionais (Ochsenreiter e cols, 2007).

O processo de replicação do kDNA tem sido amplamente estudado. Apesar da existência de milhares de minicírculos codificando centenas de gRNAs, alguns desses transcritos são provenientes de minicírculos raros e essenciais para a sobrevivência da célula. Para evitar qualquer erro mínimo na replicação e segregação dos minicírculos essenciais para as células filhas, o parasito desenvolveu uma maquinaria sofisticada para a replicação do DNA do cinetoplasto (Lukes e cols, 2005). A replicação dos minicírculos é unidirecional e se inicia na região conservada do CSB 3, contudo, é imprescindível que cada minicírculo seja previamente desprendido da rede pela ação da Topoisomerase II. Os minicírculos livres ficam localizados numa região entre o disco de kDNA e a membrana do cinetoplasto, próximo ao corpúsculo basal do flagelo, zona cinetoflagelar (Liu e Englund, 2007). A proteína universal de ligação à sequência do minicírculo (UMSBP), juntamente com a DNA primase e as DNA e RNA polimerases, se ligam

ao sítio de origem da replicação iniciando a duplicação. Para o início da replicação da fita contínua uma RNA polimerase mitocondrial sintetiza um oligonucleotídeo iniciador, já para a fita complementar, uma RNA primase vai sintetizando os iniciadores ao longo da replicação e em seguida, um conjunto de enzimas, como a endonuclease-I (SSE1), a DNA polimerase e a DNA ligase, vai substituindo os iniciadores e ligando os fragmentos de Okazaki sintetizados a partir da fita complementar. Após o processo de replicação, os minicírculos são novamente concatenados à sua rede de origem pela Topoisomerase II (Lukes e cols, 2005; Liu e Englund, 2007).

Existem poucas informações acerca da replicação dos maxicírculos do kDNA do *T. cruzi*, todavia, sabe-se que eles também possuem replicação unidirecional e, diferentemente dos minicírculos, não precisam se desprender da rede para ocorrer sua duplicação (Liu e cols, 2005). O sítio de início da replicação se localiza na região de DNA variável não codificador, entretanto, a sequência do sítio é desconhecida (Klingbeil e cols, 2001). Um estudo mais recente que trata da duplicação do kDNA do *T. brucei* demonstrou que a segregação dos maxicírculos replicados marca o estágio final da divisão do cinetoplasto (Gluezn e cols, 2011).

### **3. PATOGÊNESE**

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma inflamação cardíaca progressiva multifatorial e resulta num dano tecidual permanente. No infiltrado inflamatório das lesões do miocárdio são encontrados macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e, principalmente, uma alta concentração de linfócitos T com uma proporção de 3:1 linfócitos CD8+ para CD4+ (Bonney e Engman, 2008). Em decorrência da grande maioria das células do infiltrado inflamatório cardíaco serem células T e da demonstração da habilidade destas células em reagir contra o parasito, supõe-se que elas são as principais orquestradoras na resposta imune nesta doença (Dutra e cols, 2005). Na infecção crônica, o perfil de citocinas é de resposta Th1, combinado com supressão de citocinas de resposta Th2, havendo um aumento proeminente dos níveis de INF- $\gamma$  acompanhado de uma redução de IL-10,

assim como, um acentuado crescimento de TNF- $\alpha$  principalmente nos pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica severa (Cunha-Neto e cols, 2006).

A destruição do miocárdio resulta em sintoma clínico comum e grave nos pacientes com a doença de Chagas. Muitos esforços têm sido empregados na busca da compreensão acerca dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da resposta imune do hospedeiro na doença de Chagas crônica (Dutra e cols, 2005). As teorias vigentes que buscam explicar a origem das lesões características desta doença são bastante controversas e estão relacionadas com a persistência do parasito nos locais dos tecidos destruídos ou com a hipótese da origem autoimune da doença. A primeira teoria propõe que a presença do *T. cruzi* em tecidos específicos do hospedeiro resulta em uma reação inflamatória crônica, além do parasito também promover uma ação mecânica direta ao tecido, em contrapartida, a teoria mais recente defende que a infecção do *T. cruzi* induz uma resposta imune que tem como alvo o próprio tecido do hospedeiro e que é independente da permanência do parasito.

### **3.1 Persistência do parasito**

Durante a fase aguda, a carga parasitária pode produzir destruição mecânicas de fibras parasitadas no miocárdio e outros tecidos. Segundo Gutierrez e cols (2009) o dano gerado no tecido cardíaco nesta fase estaria relacionado ao desenvolvimento ou não da cardiomiopatia crônica. Não obstante, a cardiomiopatia ocorre geralmente várias décadas depois da infecção aguda, e, também, sabe-se que indivíduos com miocardite severa passam a fase indeterminada sem qualquer manifestação de doença clínica.

A Teoria da persistência do parasito tem como base a relação entre a inflamação do miocárdio concomitante à presença do *T. cruzi*, ao passo que nas regiões preservadas do miocárdio não se encontra parasito (Gutierrez e cols, 2009). Essa Teoria sugere que as lesões encontradas do tecido cardíaco são resultantes da ação mecânica do parasito e da resposta inflamatória das células de defesa contra os antígenos do *T. cruzi* liberados após o rompimento das células infectadas (Teixeira e cols, 2011b). É proposto então, que quanto maior a resposta imune do



hospedeiro mais eficiente será a eliminação do parasita e, como consequência, haverá uma redução na severidade dos sintomas (Tarleton, 2001).

O uso da técnica PCR tem se tornado um advento favorável a esta teoria. Em meio a resultados negativos de testes sorológicos, a sensibilidade desta técnica tem demonstrado a presença de DNA do *T. cruzi* em pacientes chagásicos crônicos com miocardite, indicando a persistência do parasito (Benvenuti e cols, 2008). Entretanto, uma das contradições desta teoria é que mesmo na ausência de parasitos as lesões continuam progredindo. Estudos mostram que após tratamento com medicamentos anti-*T. cruzi* que tem como princípio eliminar o parasito, as lesões no coração, no esôfago e/ou no colón, continuam a progredir (Lauria- Pires e cols, 2000, Gironès e cols, 2007) em cerca de um terço dos chagásicos (Prata, 2001).

Outros questionamentos dessa teoria envolvem os paradoxos da presença do parasito em indivíduos crônicos assintomáticos e da alta parasitemia dos casos agudos que em sua maioria são assintomáticos. O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis como ELISA, imunofluorescência indireta, teste de hemaglutinação e PCR permitiu detectar um número maior de pessoas infectadas com *T. cruzi*, principalmente aquelas que nunca apresentaram qualquer sintoma. Já que a teoria defende que as lesões teciduais severas são decorrentes da presença do *T. cruzi* no local degradado, como explicar a ausência de sintomas em dois terços dos infectados crônicos? E por que na fase aguda da doença, período de maior parasitemia, não é observada altas taxas de mortalidade? (Teixeira e cols, 2011b).

O baixo parasitismo durante a fase crônica da doença de Chagas contrasta com a severidade da cardiomiopatia chagásica observada nos pacientes crônicos, sugerindo que outros fatores além da resposta direta do parasito podem estar envolvidos no desenvolvimento da patologia chagásica (Dutra e cols, 2005). A resposta do hospedeiro a antígenos próprios, resposta autoimune, tem sido associada à patogênese da doença de Chagas (Gironès e cols, 2007). No início da década de 70, Santos-Buch e Teixeira (1974) demonstraram *in vitro* que linfócitos sensibilizados com *T. cruzi* promoviam uma ação citotóxica contra células cardíacas alogênicas não parasitadas. A reação citotóxica contra células próprias na ausência do parasito levaram os autores a sugerirem que a patogênese da doença de Chagas resulta de um fenômeno autoimune. A partir desta publicação diversas pesquisas

vêm sendo feitas para elucidar quais os mecanismos envolvidos na autoimunidade da doença de Chagas.

### 3.2 Autoimunidade

A resposta autoimune é caracterizada pelo reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos auto-reativos que se diferenciam em células efetoras, proliferam e atacam células próprias gerando dano tecidual (Abbas e Lichtman, 2005). Essa interação citotóxica foi observada, experimentalmente, por Santos-Buch e Teixeira (1974) em linfócitos de coelhos chagásicos crônicos que rejeitavam e destruíam rapidamente células embrionárias alogênicas de coração de coelho não parasitadas.

Diversos mecanismos têm sido descritos na literatura para tentar compreender o papel do parasito no início e na progressão da doença autoimune (Teixeira e cols, 2011b). Os organismos imunocompetentes possuem populações circulantes de células B e T potencialmente auto-reativas, mas que são normalmente tolerantes a antígenos próprios. Os mecanismos envolvidos na patogênese possivelmente estão relacionados à perda da tolerância a esses autoantígenos por influência do patógeno. A indução da resposta autoimune pode estar associada à ativação direta das células T auto-reativas ou a um mecanismo citotóxico dependente de anticorpo (Bonney e Engman, 2008). Os primeiros estudos envolvendo a resposta imune de pacientes chagásicos avaliavam a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos indivíduos infectados, entretanto, além de promover uma resposta protetora ao organismo, percebeu-se que alguns anticorpos também poderiam estar relacionados a respostas patogênicas (Dutra e cols, 2005).

Um mecanismo dependente de anticorpo específico é o mimetismo molecular e, segundo ele, o *T. cruzi* provoca uma resposta específica de células B e/ou T contra antígenos próprios em decorrência de reação cruzada (Gironèz e cols, 2007). A reação cruzada com antígenos do parasito estimula células imunocompetentes a conduzirem uma resposta efetora contra proteínas próprias que supostamente possuem motivos similares nas sequências dos aminoácidos ou nos epítomos das estruturas tridimensionais. Dessa forma, linfócitos que reconhecem algum componente estrutural do tecido cardíaco semelhante a antígenos do *T. cruzi*

podem produzir uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (Teixeira e cols, 2011b).

Um exemplo de mimetismo molecular é o evento de reação cruzada entre o antígeno B13 do *T. cruzi* e a miosina cardíaca de humanos. A homologia existente entre a cadeia pesada da miosina e um epítopo da proteína B13 promove uma resposta celular efetora contra o antígeno próprio resultando em lesões cardíacas semelhantes às observadas em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica. Anticorpos que produzem essa reação cruzada estão presentes em 100 % dos chagásicos com insuficiência cardíaca e em 14 % dos assintomáticos, no entanto, os soros de ambos reconhecem a miosina cardíaca (Cunha-Neto e cols, 2006). Vicco e cols (2013) detectaram a presença de anticorpos anti-miosina cardíaca em todos os indivíduos do estudo com sorologia positiva para o *T. cruzi* e demonstraram uma correlação direta do nível de anticorpos anti-B13 com insuficiência cardíaca e alterações ecocardiográficas, sugerindo que esses anticorpos estariam envolvidos na progressão da doença. Os pacientes desse estudo que obtiveram os maiores níveis de anticorpos contra a miosina cardíaca apresentaram elevado risco de mortalidade. Reações cruzadas também foram observadas, experimentalmente, entre a proteína calreticulina de *T. cruzi* e de humano (Ribeiro e cols, 2009).

Um mecanismo de ativação policlonal capaz de disparar a resposta autoimune sem a indução de um antígeno específico é a ativação *bystander*. O início da resposta autoimune pode ser engatilhado pela redução do limiar de ativação de células T potencialmente auto-reativas, gerando a perda da tolerância imunológica. A destruição tecidual provocada pela infecção do patógeno promove a liberação de grande quantidade de autoantígenos e os expõe a um ambiente rico em mediadores inflamatórios. Em decorrência dessa exposição, os antígenos próprios são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno, ativando a ação das células T efectoras auto-reativas. Na doença de Chagas a ativação *bystander* pode ser induzida em decorrência da exposição de antígenos próprios liberados após citólise do miocárdio devido à infecção pelo *T. cruzi* (Bonney e Engman, 2008; Teixeira e cols, 2011b). Apesar de este mecanismo estar possivelmente associado à patogênese de doença de Chagas, ele encontra barreiras na contradição existente entre a alta parasitemia na fase aguda, com alto

nível de liberação de autoantígenos por ação direta do parasito, e a inexistência de sintomas na grande maioria dos infectados (Teixeira e cols, 2011b).

É amplamente aceito que a persistente e progressiva inflamação crônica causada pela resposta autoimune pode resultar na cardiomiopatia chagásica crônica levando à insuficiência cardíaca (Ribeiro e cols, 2009). A patogênese da doença de Chagas é complexa e multifatorial, sendo a presença do parasito fundamental para desencadear respostas protetoras ou patológicas contra o *T. cruzi*. As respostas imunológicas envolvendo diretamente o parasito ou a auto-reatividade não são excludentes entre si. É proposto que a combinação dos dois mecanismos esteja envolvida no estabelecimento da patologia (Dutra e cols, 2005; Vicco e cols, 2013).

### **3.2.1 Autoimunidade e integração de kDNA**

Ainda dentro do contexto da autoimunidade, os pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC/UnB-DF) vêm buscando há décadas compreender o papel da autoimunidade no mecanismo patológico que provoca a ação citotóxica das células T e a progressão das lesões severas que desencadeiam a cardiomiopatia e a síndrome dos megas. Os achados experimentais ao longo das diversas investigações realizadas pelo LMPDC geraram a hipótese de que a ocorrência de transferência lateral (TL) e integração de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro resultariam em alterações na expressão gênica e induziriam uma resposta autoimune.

A transferência lateral ou horizontal (TH) tem sido amplamente descrita como um mecanismo de ganho de material genético exógeno entre espécies distantes. É principalmente observada entre procariotos, porém, mais recentemente, evidências substanciais vêm demonstrando a sua ocorrência envolvendo eucariotos (Andersson, 2005; Huang, 2013).

Os trabalhos pioneiros realizados pelo LMPDC na década de 90 começaram a supor que o *T. cruzi* teria o potencial de reter o seu DNA nas células hospedeiras. Os primeiros experimentos *in vitro* utilizaram cultura de macrófagos já que essas células de defesa mantêm um contato íntimo com o parasito devido ao potencial de internalizar os parasitos por fagocitose. Inicialmente, verificou-se por técnicas de citogenética e hibridização *in situ* a presença do DNA do flagelado

associado a cromossomos metafásicos de macrófagos de camundongos infectados (Teixeira e cols, 1991). Em outro momento foi realizado *Southern blot* do DNA de macrófagos humanos infectados e livres de parasitos e constatou-se que o DNA integrado no genoma da célula hospedeira hibridizava com sonda específica para kDNA, surgindo que o DNA exógeno era originado de minicírculos de kDNA (Teixeira e cols, 1994). Utilizando as técnicas de *Southern blot* e PCR, Simões-Barbosa e cols (1999) demonstraram a TL de sequências de kDNA em macrófagos murinos infectados e verificaram que a integração se mantinha mesmo após 38 meses de sucessivas passagens das culturas. Neste mesmo trabalho foi sugerido que as integrações de kDNA alteravam a expressão gênica das células do hospedeiro, visto que testes de imunofluorescência constataram a ligação de autoanticorpos do soro de pacientes chagásicos com a membrana dos macrófagos que continham a integração, ligação esta que não ocorria com os macrófagos controles não infectados.

Com a utilização de técnicas mais modernas de biologia molecular foi possível obter as primeiras sequências de integração do kDNA no genoma do hospedeiro e evidenciar a ocorrência da transferência de material genético entre diferentes filos de eucariotos. Nitz e cols (2004) documentaram a transferência lateral de sequências de minicírculos de kDNA (LkDT) do *T. cruzi* no genoma de humanos naturalmente infectados, e encontraram fragmentos integrados, frequentemente, em elementos LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element* – elemento nuclear inter espaçado longo). Após infecção pelo *T. cruzi* reproduzida em laboratório, integrações das sequências de kDNA também foram encontradas no genoma dos modelos experimentais de coelhos e galinhas.

A utilização de *Gallus gallus* como modelo experimental “limpo” para a doença de Chagas permite abordar um contexto interessante acerca das consequências da integração dos minicírculos de kDNA e o desenvolvimento da rejeição autoimune observada nos pacientes com Chagas. As galinhas são refratárias à infecção pelo *T. cruzi*, conseguindo eliminá-los precocemente através da resposta imune inata. Consequentemente, a presença das lesões patológicas, semelhantes às observadas nos pacientes chagásicos, encontradas em alguns animais que retiveram o kDNA no genoma (kDNA-positivos), exclui a persistência do parasito como responsável progressão da patologia (Nitz e cols, 2004; Teixeira e

cols, 2006a; Teixeira e cols, 2011a). A integração de kDNA no *locus* do gene da distrofina foi documentada em galinhas que apresentavam fraqueza muscular, cardiomegalia e insuficiência cardíaca (Teixeira e cols, 2011a).

Simões-Barbosa e cols (2006) confirmaram a integração do minicírculo de kDNA em LINE-1 (L1) ativo do genoma de macrófago humano em cultura e demonstraram sua mobilização, caracterizando o *hitchhiking* da sequência quimera para um *locus* em outro cromossomo. O trabalho supõe que os rearranjos promovidos pela inserção do kDNA e o acúmulo de múltiplas integrações kDNA/L1 ativo no genoma do hospedeiro podem induzir as lesões autoimunes da doença de Chagas sem a necessidade da presença persistente do parasito (Simões-Barbosa, 2006). A integração do kDNA no genoma do hospedeiro pode apresentar diferentes consequências funcionais em nível de expressão gênica a depender do ponto de inserção da mutação, podendo ser benéfica, neutra ou prejudicial. Presume-se que as proteínas quimeras resultantes das novas ORFs formadas pela integração kDNA-DNA do hospedeiro e as mudanças fenotípicas detectadas nas células mutadas contribuem potencialmente na indução de uma resposta autoimune (Nitz e cols, 2004).

Sabendo que os sítios preferenciais de integração do kDNA eram os elementos retrotransponíveis L1, Hecht e cols (2010) modificaram a *tpTAIL-PCR* (*target primer*), a partir da TAIL-PCR desenvolvida por Liu e Whittier (1995), visando ao mapeamento das regiões flangeadoras no sítio da integração. No estudo foi verificado que 65 % dos eventos de LkDT descritos ocorriam em LINEs. Também foi observado mosaicismos em evento de integração seguido de recombinação envolvendo dois ou mais trechos de DNA de diferentes *loci* e a mobilização por *hitchhiking* do kDNA ligado a elementos LINE ativos, causando ruptura e disfunção de ORFs. Em sua tese de doutorado, Sousa (2012) utilizou a *tpTAIL-PCR* para mapear possíveis sítios de integração de minicírculos de kDNA no genoma de camundongos (*Mus musculus*) infectados experimentalmente. Com esse trabalho foi possível verificar que sequências de minicírculos de kDNA também se integram em retroelementos de células somáticas de murinos. Em 83 % dos eventos as integrações ocorreram em elementos L1.

Tendo documentada a presença de ninhos de amastigotas em células humanas da teca de ovário e em células dos túbulos seminíferos (Teixeira e cols,

2006a) e diante da constatação da ocorrência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma dos hospedeiros, a investigação dos pesquisadores do LMPDC passou também a focalizar na possibilidade das progênes herdarem as mutações adquiridas pelos parentais. A transferência vertical (TV) é resultante da passagem de material genético de um parental para a sua prole. A evidência da possível herança dos minicírculos surgiu com a observação de que o kDNA se integrava no genoma de células somáticas e, também, em células germinativas. A presença de integrações de minicírculos de kDNA foi detectada em gametas de galinhas e em suas progênes, indicando que as integrações foram herdadas. Vale ressaltar que nos experimentos com galinhas os descendentes nunca foram expostos ao parasito, confirmando que a presença de kDNA integrado no genoma das gerações posteriores foi proveniente, unicamente, da transferência vertical de kDNA (VkDT) (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2011a). Hecht e cols (2010) constataram a integração de minicírculos nos gametas masculinos e demonstraram a VkDT em descendentes de cinco famílias com genitores positivos para a infecção chagásica. Em contraste com os resultados que demonstraram as ausências de nDNA e anticorpos específicos para o *T. cruzi*, alguns descendentes tinham testes PCR positivos para o kDNA, e as sequências quimeras (kDNA-DNA do hospedeiro) foram confirmadas em plataformas com algoritmos específicos para análises bioinformáticas.

É de grande importância destacar que nos eventos de integração foi observado o compartilhamento de uma pequena região de 6 a 22 nucleotídeos entre o kDNA e o LINE do hospedeiro. Esse alinhamento entre nucleotídeos similares é conhecido como micro-homologia e, geralmente, esta justaposição é rica em nucleotídeos Adenina e Citosina (A/C) (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a; Sousa, 2012). As CSBs das quatro regiões conservadas dos minicírculos são trechos ricos em A/C e estão, possivelmente, envolvidas no mecanismo que promove a integração do DNA exógeno no genoma do hospedeiro. A decatenação dos minicírculos antes do processo de divisão celular promove a exposição desses blocos conservados, proporcionando a junção por complementariedade do CSB com a micro-homologia rica em A/C no DNA do hospedeiro (Hecht e cols, 2010).

A hipótese da integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro correlaciona a ocorrência da longa fase assintomática apresentada pela grande maioria dos infectados à possibilidade de mutações neutras no genoma. A variabilidade das manifestações clínicas observadas nos pacientes chagásicos pode ser explicada pelas mobilizações das mutações via mecanismo de retrotransposição em elementos L1 ativos (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006). Atualmente, a doutoranda Adriana Benevides está desenvolvendo no LMPDC um estudo para verificar se há alguma relação das manifestações clínicas com os sítios de integração do kDNA em pacientes chagásicos e seus descendentes. Diferentes *loci* de integração de minicírculos em diferentes cromossomos já foram demonstrados no genoma dos hospedeiros analisados em diversos estudos. Apesar da maioria dos eventos de inserção ocorrer em L1, outros elementos retrotransponíveis como SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements* – elementos nucleares entrecortados curtos) e retrovírus endógeno (ERV) também representam sítios de inserção em humanos (Hecht e cols, 2010). Em galinhas já foram documentadas inserções em elementos transponíveis como transposons Hitchcock e retrotransposons não-LTR (*Long Terminal Repeat* – longas repetições terminais) CR-1 (*Chicken retrotransposon* – retrotransposon de galinha) (Teixeira e cols, 2011a). Nos camundongos, além da predominante presença de integração em L1, outros sítios em elementos transponíveis como ERV e retroelementos LTRs não autônomos também foram descritos (Souza, 2012).

A integração do kDNA representa uma provável causa da resposta autoimune observada nos casos de doença de Chagas e pode ser o ponto crucial na compreensão acerca das manifestações clínicas da doença crônica (Nitz e cols, 2004).

#### **4. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS**

Muitas das variações genéticas no genoma de diferentes organismos são resultantes da ação de segmentos distintos de DNA que se deslocam de um local para outro do genoma. Aos elementos de DNA que têm o potencial de se locomover dá-se o nome de Elementos Transponíveis (*Transposable Elements* - TEs). A



aptidão do DNA mover-se ou transportar-se potencia a capacidade de gerar mutações no genoma do organismo hospedeiro com múltiplas consequências (Kidwell, 2005). A maioria das inserções de TEs são neutras ou deletérias, e já foram descritas diversas doenças resultantes da mobilização desses elementos. Estudos vêm comprovando um impacto relevante dessa mobilização para a evolução do genoma, demonstrando casos em que o novo posicionamento do TE repercutiu em uma variação fenotípica vantajosa. Descobertas importantes sobre este tema englobam a criação de novas variedades de uvas, a geração de novas famílias gênicas funcionais, e a restrição à infecção pelo vírus HIV observada nos macacos-da-noite (*Aotus sp*) (Belancio e cols, 2008).

Os tipos e os números de cópias de TEs variam entre as espécies podendo chegar a compor mais de 50 % do DNA genômico. Aproximadamente 5 % do genoma haploide do *T. cruzi* é composto por retroelementos LTR e não-LTR (El-Sayed e cols, 2005). Análises comparativas mostraram que os vertebrados são os que apresentam maiores quantidades de TE quando comparados a outros organismos. Os mamíferos apresentam uma tendência de acumular esse tipo de DNA, tendo como consequência um genoma extremamente rico em elementos móveis. O genoma da espécie humana tem 40 % do seu total constituído de elementos transponíveis, sendo retrotransposons L1 os maiores representantes deste montante, perfazendo, aproximadamente, 17 % do DNA total humano, com cerca de 520.000 cópias (Böhne e cols, 2008).

#### **4.1 Tipos de elementos transponíveis no genoma humano**

Existem duas maneiras gerais de classificar os TEs. Uma delas os divide de acordo com o potencial de se transpor utilizando maquinaria enzimática própria. Quando os TEs possuem genes que codificam as enzimas necessárias para a sua mobilização e são inteiramente independentes para tal mecanismo são chamados de elementos autônomos, um exemplo é o retrotransposon LINE-1. Em contrapartida, quando o TE não codifica o aparato proteico e depende de algumas proteínas ou de outro TE para se mover, ele é considerado não autônomo. A segunda forma de classificação os distingue de acordo com o mecanismo utilizado para se deslocar de um local para outro dentro do genoma. O mecanismo pelo qual

o TE se transpõe e se divide em Classe I, composta pelos elementos retrotransponíveis, e em Classe II, que engloba os transposons de DNA (Kidwell, 2005).

Os retrotransposons, ou retroelementos, se movem via RNA intermediário por transcrição reversa. Quando autônomos, eles codificam uma transcriptase reversa que reverte o transcrito de RNA do elemento em cDNA produzindo uma nova cópia do retroelemento que é integrada em um novo sítio do genoma por ação da enzima integrase, também codificada pelo elemento. A transposição por essa maquinaria é uma duplicação análoga ao “copia e cola” e mantém o elemento fixo no sítio de origem. Por ser um mecanismo que adiciona material genético, a retrotransposição é responsável por um alto número de cópias de retroelementos no genoma. Fazem parte da Classe I elementos como os LTRs e não-LTR e os ERVs. Os elementos da Classe II, ou transposons de DNA, não se locomovem via RNA intermediário. Os transposons autônomos codificam uma DNA transposase que é responsável tanto pela excisão do elemento como pela sua integração em um novo ponto do genoma. Dessa forma, a mobilização dos elementos da Classe II ocorre por um mecanismo equivalente ao “corta e cola”, retirando o DNA do local original e transpondo-o para outro, não havendo duplicação (Böhne e cols, 2008; Relobo e cols, 2012).

Os transposons de DNA compõem cerca de 3% do genoma humano e ainda não foi identificado nenhum elemento ativo desta classe no genoma de mamíferos. Esses TEs podem ser subdivididos em duas famílias, a MER1, que representa a maioria dos transposons do genoma humano, e a MER2 (Prak e Kazazian, 2000; Goodier e Kazazian, 2008). Os retrotransposons LTRs são caracterizados por possuírem longas repetições terminais flanqueando a região codante e por apresentarem estrutura e capacidade codificadora semelhantes aos retrovírus, possuindo em comum os genes *gag* (*specific group antigen*) e o *pol* (polimerase) (Kidwell, 2005). Os retrovírus endógenos humanos (HERVs) compõem 7 % do genoma total da espécie humana e são elementos próximos aos LTRs, apresentando, assim como os retrovírus, os genes *gag*, *pol* e o *env* (envelope) (Prak e Kazazian, 2000). Os LTRs e os ERVs foram originados de infecções virais, em que o patógeno perdeu a capacidade de reinfecção e permaneceu com seu material genético integrado no genoma do hospedeiro (Goodier e Kazazian, 2008).

Os elementos não-LTRs são exemplificados pelos SINEs e LINEs. As sequências não-autônomas SINEs utilizam a maquinaria codificada pelos LINEs para se movimentarem ao longo do genoma. O elemento Alu é o SINE de maior representatividade e importância no genoma humano, apresentando mais de um milhão de cópias distribuídas em cerca de 11 % do DNA total. Esse SINE tem aproximadamente 280 bases e, assim como todos os elementos deste grupo, apresentam em sua estrutura dois monômeros conectados por uma pequena região rica em adenina. O Alu é um elemento ativo no *Homo sapiens*, promovendo mutações em células somáticas, criando diversidade genética e causando importantes doenças genéticas (Deininger, 2011).

Os únicos elementos transponíveis autônomos ativos no genoma humano fazem parte da família do LINE-1. O retroelemento L1 tem em torno de 6 kb e sua estrutura possui uma extremidade 5' UTR longa (*Untranslated Region* – região não-traduzida) com função promotora, duas ORFs e uma extremidade 3' UTR curta que termina em uma calda poli(A) (Goodier e Kazazian, 2008). A ORF1 codifica uma proteína que tem uma provável ação vinculada a ácido nucleico e a ORF2 codifica uma proteína com função de endonuclease e transcriptase reversa, e, a partir da ação desse complexo enzimático, o L1 consegue se mobilizar via RNA intermediário (Ray e cols, 2007). A grande maioria dos L1 do genoma humano está truncada ou rearranjada, apenas, aproximadamente três a quatro mil elementos, dos mais de 500 mil existentes, apresentam-se estruturalmente intactos. Destes, apenas uma pequena parcela inferior a 150 retrotransposons L1 está realmente ativa, sendo esta ínfima fração responsável por 0,07% das mutações espontâneas no genoma humano (Prak e Kazazian, 2000; Böhne e cols, 2008).

A grande quantidade de cópias de retroelementos no genoma, a alta semelhança entre as suas sequências e a habilidade de se transpor podem gerar instabilidade genômica pelo potencial dessas sequências causarem rearranjos, translocações, inserções e deleções, resultando em mudanças estruturais e funcionais dos genes. A mobilização desses elementos tem influência significativa na regulação de genes vizinhos, no fenótipo do indivíduo, na evolução do genoma e no desencadeamento de várias doenças genéticas (Jung e cols, 2013).

## 4.2 Mobilização e rearranjos em retroelementos e associação com doenças genéticas

O comportamento dos elementos transponíveis de “saltarem” de um sítio para o outro tem um papel fundamental na evolução estrutural e funcional de genes e genomas em diversos organismos. Ao longo da evolução, o mecanismo de transposição desses elementos esculpiu múltiplos genomas, culminando no surgimento de sequências reguladoras de genes, sinais de poliadenilação, novos éxons, ORFs e até genes inteiros. Como consequência, sugere-se que os TEs contribuíram, significativamente, com a complexidade observada nos proteomas e transcriptomas dos vertebrados. Esses elementos tiveram grande influência na modelagem e constituição do genoma humano durante o processo evolutivo, pois, sequências derivadas de TE foram encontradas em cerca de 25 % das regiões promotoras e em regiões codificadoras de proteínas, em 4 % dos genes (Böhne e cols, 2008).

Eventos de transposições recentes continuam contribuindo para a diversidade genética humana. Mais de 11 mil inserções de TEs diferenciam os genomas do *Homo sapiens* do *Pan troglodytes* (chimpanzé), sendo que a maioria dessas integrações ocorreu depois da divergência do último ancestral comum. Eventos de transposição e rearranjos genômicos resultantes da ação de TEs associados ou posteriores a eventos de especiação têm sido observados em diferentes linhagens de vertebrados, crescentemente utilizados para solucionar dúvidas filogenéticas (Böhne e cols, 2008). Alguns elementos LINE e SINE têm sido empregados como ferramentas para analisar taxas de polimorfismo populacional e para elucidar questões relacionadas à filogenética. O polimorfismo resultante da presença ou ausência de inserções de elementos móveis tem potencial de influenciar a carga de mutações do genoma de um indivíduo, não se sabendo ao certo qual a capacidade de variação dos retrotransposons na população mundial (Deininger e cols, 2003).

Além do potencial mutagênico das inserções em si, os L1s apresentam habilidade de carregar consigo partes do DNA que flanqueiam as suas regiões 5' e 3' levando-os para um novo sítio do genoma. Esse fenômeno é conhecido como transdução mediada por L1 e é mais um mecanismo descrito que demonstra a

capacidade de embaralhar o genoma causando variabilidade e mudança funcional de genes (Deininger e cols, 2003).

Os retrotransposons e outros TEs podem servir de substrato para eventos de recombinações homólogas e não-homólogas, assim como, na conversão gênica. Estudos evidenciaram que a conversão gênica por retrotransposons pode criar elementos quimeras compostos por diferentes subfamílias ou até substituir uma subfamília de um elemento por outra. Outro importante potencial desse mecanismo de conversão é a possibilidade de reativação de L1 ou Alu, tornando-os capazes de se retrotranspor (Deininger e cols, 2003).

Em humanos, frequentemente, as inserções de L1 ocorrem em regiões do DNA ricas em nucleotídeos A/T. Como as regiões codificadoras do genoma tendem a apresentar mais nucleotídeos G/C, as integrações de L1 possivelmente ocorrem, em sua maioria, em sítios de DNA não codificadores, o que proporciona um número maior de inserção sem causar muitos danos ao genoma, ainda que esses retrotransposons podem inserir-se em regiões gênicas (Prak e Kazazian, 2000). O alto número de cópias resulta em instabilidade genética através de deleções e duplicações causadas por recombinação homóloga. Inserções mutagênicas de L1 e Alu, próximas ou dentro de genes, eventos de recombinação entre L1s não alélicos ou entre duas sequências Alu podem induzir o desencadeamento de doenças genéticas. Foram descritas na literatura 96 doenças causadas por inserções de retrotransposons, sendo que 25 são provocadas diretamente por L1, enquanto as outras 71 são mediadas por esse elemento. Em geral, estima-se que 1 em cada 250 (0,4%) doenças resultantes de mutações ocorrem em consequência da mobilização e inserção de retroelementos (Solyom e Kazazian, 2012; Jung e cols, 2013).

Há 25 anos foi descrito o primeiro relato de doença genética subsequente à movimentação de retrotransposons no genoma humano. Kazazian e seus colaboradores documentaram um caso de Hemofilia A resultante do rompimento do gene do fator de VIII por dois eventos de inserção de L1. No mesmo ano, mais seis eventos de doenças desencadeadas por inserção de L1 foram observados, três casos no gene da distrofina, mais um caso no gene do fator VIII, um no gene APC e um caso no gene da  $\beta$ -globina (Kazazian, 1988). A maioria desses eventos descritos ocorreu em fases iniciais do desenvolvimento, ainda em célula germinativa ou durante o estágio de divisão inicial do indivíduo, excetuando o caso no gene APC

onde a inserção foi detectada em células de tumor de colón. indicando que essas mutações ocorrem tanto em células somáticas como em germinativas.

O grande tamanho dos elementos L1 e sua capacidade em dar suporte à transposição de outros elementos os tornam potenciais agentes causadores de doenças genéticas. Não há uma tendência para que esses eventos ocorram em éxons ou íntros, mas observa-se que inserções induzem a formação de transcritos atípicos resultando em doenças geralmente não fatais. Doenças decorrentes de deleção por retrotransposição podem ser exemplificadas pela distrofia muscular de Duchenne, resultante da perda de apenas um par de base no gene DMD, e pela distrofia muscular congênita de Fukuyama, ocasionada pela deleção de 6 pb (Jung e cols, 2013).

Outro retrotransposon com ação mutagênica de importância médica é o elemento Alu. Esses SINEs contribuem com muitas doenças através de rupturas de regiões codificadoras do genoma ou de regiões de sinal de *splicing*, e por eventos de recombinação homóloga não-alélica entre eles. Muitas doenças genéticas conhecidas são decorrentes das inserções de Alu em variados cromossomos, contudo, o cromossomo X demonstra uma propensão a esse tipo de mutação. A hemofilia A e B, a doença de Menkes e a agamaglobulinemia ligada ao X são exemplos de patologias que podem ser causadas pela transposição do elemento Alu para genes do cromossomo X. Outras doenças como câncer de mama, resultante de inserções no *locus* BRCA1 ou BRCA2, deficiência do sistema complemento, anemia hemolítica crônica, deficiência em colinesterase e algumas leucemias estão associadas com o potencial mutagênico da inserção de Alu (Deininger, 2011).

Apesar das consequências negativas da transposição existem estratégias do genoma para inibir a ação de retroelementos. Em células somáticas e germinativas maduras é observada a supressão de retrotransposição e da atividade transcricional dos retroelementos por metilação ou mudanças na estrutura da cromatina. Muitos eucariotos utilizam esses mecanismos epigenéticos para controlar a atividade dos retrotransposons e manter uma interação estável entre o retroelemento e o hospedeiro (Jung e cols, 2013).

As mutações que ocorrem em decorrência da mobilização dos elementos transponíveis podem ser herdadas via TV, ou seja, quando essas alterações ocorrem em células germinativas podem ser passadas do parental para a sua prole.

Todavia, crescentes evidências sugerem que a transmissão desses elementos não está restrita a hereditariedade, pois são capazes de se mover horizontalmente entre organismos de espécies diferentes (Ivancevic e cols, 2013).

## 5. TRANSFERÊNCIA LATERAL DE DNA ENTRE ESPÉCIES DIFERENTES

O advento da tecnologia de sequenciamento do genoma tem contribuído com o aumento de informações e, conseqüentemente, com a crescente compreensão acerca da importância dos eventos de TL. Esses eventos contribuem com o crescimento, a variabilidade e funcionalidade dos genomas, e podem implicar ainda em modificações das interações biológicas. Apesar da grande maioria do conhecimento acerca deste contexto estar relacionada à transferência de DNA entre bactérias, TL entre os diferentes domínios, Archaea, Eubacteria e Eukaryota têm sido documentadas (Hotopp, 2011).

A transferência lateral entre procariontes pode ocorrer via elementos móveis utilizando plasmídeos ou transposons como veículos de transferência. Em eucariotos, evidências de transferência horizontal são mais raras e, em geral, os casos de aquisição de DNA envolvem a transferência de material genético de origem procariota ou endossimbionte (Pace e cols, 2008). Um dos eventos mais clássicos de TL é a passagem de genes do genoma de organelas endossimbiontes para o genoma nuclear de células hospedeiras como ocorreu com as  $\alpha$ -proteobactérias, precursoras das mitocôndrias em todos os eucariotos, e com cianobactérias simbiotes, os cloroplastos das plantas (Koonin e cols, 2001). Esses episódios de transferência tiveram um papel de fundamental importância na evolução dos eucariotos. Os eventos de TL não são obrigatoriamente recíprocos, tendo em vista a observação de uma maior predominância de transferência unilateral de origem bacteriana nos casos envolvendo bactérias e eucariotos (Hotopp, 2011). Um dos exemplos mais estudados de transferência de DNA entre procariontes e eucariotos é entre *Agrobacterium* e plantas (Aoki, 2004; Matveeva e cols, 2012).

Diversos vetores como elementos transponíveis de diferentes origens, bactérias, vírus e eucariotos invertebrados, como artrópodes e moluscos, podem estar relacionados à transmissão de DNA (Ivancevic e cols, 2013). A literatura tem

evidenciado uma possível origem procariota de alguns genes presentes no genoma eucarioto. A bactéria endossimbionte *Wolbachia* tem sido amplamente estudada pelo seu potencial de transferência para diversos invertebrados, como moscas, besouros e nematódeos. No exemplo do besouro *Callosobruchus chinensis* sabe-se que, aproximadamente, 30 % do genoma da *Wolbachia* está contido no cromossomo X do inseto (Hotopp, 2011).

Existem poucos relatos a respeito da funcionalidade das cópias de genes transferidos por TL. Baixos níveis ou valores residuais de expressão gênica foram detectados em alguns genes resultantes de transferência, entretanto, estudos recentes têm demonstrado casos de genes ativamente expressos nos recipientes eucariotos. Um exemplo é o caso em que pulgões-de-ervilha adquiriram dois genes resultantes de TL, um deles originário da *Wolbachia* e o outro de uma espécie próxima a essa bactéria, que apresentam alta taxa de expressão (Ros e Hurst, 2009).

A habilidade inerente dos TEs de se mobilizarem e aumentarem suas cópias no genoma, possivelmente, os tornam propensos a transferência horizontal (Gilbert e cols, 2010). Essa capacidade de “atravessar” barreiras e invadir um novo sítio permitiu a manutenção dos TEs em diversos genomas ao longo do processo evolutivo, mesmo sem proporcionar um benefício direto ao hospedeiro (Loreto e cols, 2008; Schaack e cols, 2010). Praticamente todos os tipos de TEs estão sujeitos a TL tendo essa mobilização entre genomas uma possível facilitação através de vírus ou parasitos (Schaack e cols, 2010). Diversas evidências bibliográficas vêm corroborando a colaboração recíproca entre os elementos móveis e os eventos de TL. A passagem de segmentos de DNA entre diferentes espécies em conjunto com a habilidade de movimentação dos TEs, contribui de maneira significativa com a diversificação dos genomas (Gilbert e cols, 2010). Já que os TEs têm a capacidade de causar duplicações e rearranjos no DNA, e o evento de transferência lateral aumenta a frequência relativa desses elementos no genoma, a TL pode ser considerada uma catalisadora da transformação ativa da estrutura do genoma e da informação biológica (Ivancevic e cols, 2013).

Em recente revisão sobre a transferência lateral de DNA móvel, Ivancevic e cols (2013) reuniram diversas evidências de troca de material genético entre eucariotos. Como exemplo, foi descrito caso dos transposons SPIN e OC1, presente



em diferentes vertebrados e que apresentam mais de 98 % de identidade com os mesmos elementos encontrados no barbeiro *Rhodnius prolixus*, sugerindo que o inseto hematófago seria o vetor responsável pela transferência lateral desses elementos durante o repasto sanguíneo. Outro caso é representado pela presença em comum do retroelemento não-LTR, BovB, entre vertebrados de grupos filogeneticamente distantes, tendo, possivelmente, duas espécies distintas de carrapatos como vetores desse retrotransposon via TL.

Relatos da literatura também abrangem evidências acerca de transferência de material genético em espécies do reino Plantae. Em 2004, um caso interessante de transferência de DNA foi descrito por Mower e cols em que se constatou a ocorrência de TL de uma espécie de planta parasita para uma planta hospedeira. A troca, possivelmente, seria decorrente do contato íntimo entre as duas espécies de plantas. Já existe uma vasta literatura corroborando a existência da troca de DNA entre organismos eucariotos que apresentam o advento da carioteca como possível empecilho aos eventos de transferência de DNA. Apesar dos mecanismos envolvidos nas transmissões de DNA entre os eucariotos ainda não estarem elucidados, os estudos parecem demonstrar a importância fundamental da interação parasita-hospedeiro na promoção e facilitação da TL.

O estudo da TL e a sua importância na manutenção de diversos TEs têm sido fundamentais para a compreensão dos impactos desse fenômeno na evolução do genoma do eucarioto. Os mecanismos que permitem e controlam essa transmissão de material genético ainda não foram totalmente elucidados. Para que a TL seja bem sucedida é necessário que o DNA seja transportado de um doador para uma célula somática ou germinativa de organismos multicelulares, finalmente ficando integrado no genoma (Ivancevic e cols, 2013).

## **6. TRANSFERÊNCIA VERTICAL DE DNA**

A herança do DNA proveniente da TL ocorre mediante sua transferência vertical para a progênie. O material genético herdado pela prole através dos seus precursores é a forma mais comum de aquisição de DNA por um indivíduo. Quando eventos mutagênicos ocorrem em células germinativas, estes podem ser herdados

pelos descendentes e, dependendo dos efeitos biológicos dessas mutações, a prole mutada pode apresentar variações fenotípicas e polimorfismos genéticos numa população ao longo do tempo.

Os conhecimentos iniciais acerca da hereditariedade surgiram em decorrência do estudo do mais famoso monge, Gregor Johann Mendel (1822-1884), já no final do século XIX. Após os experimentos com cruzamentos de ervilhas, Mendel calculou as proporções entre fenótipos característicos dos grãos, e propôs conceitos com base na transmissão daqueles caracteres herdáveis. Suas conclusões são conhecidas desde então como os princípios básicos da herança clássica ou 'Herança Mendeliana'. Um dos seus postulados resultou nos princípios da segregação e da dominância, que propõem que cada característica de um indivíduo diploide é determinada por um par de fatores (alelos), herdados em proporção igual (gametas) de cada parental. Na situação de composição diferente, um fator pode sobrepor a sua presença ao outro, gerando dominância de um e recessividade do outro. Outra contribuição do seminarista foi o princípio da segregação independente que postula que alelos de cromossomos diferentes se distribuem durante a meiose, de maneira independente um do outro (Pierce, 2004; Snustad e Simmons, 2001). Neste contexto, para Mendel, a prole era constituída por uma combinação de 50 % de herança materna e 50 % de herança paterna, sendo possível prever as possíveis frequências esperadas na prole baseada no conhecimento prévio dos fatores determinantes dos parentais.

Quando ocorre mutação no genoma de uma célula germinativa, sendo ela vantajosa, neutra ou negativa, ela pode ser herdada pela geração seguinte. Em longo prazo, a mutação pode sofrer um processo adaptativo provocando um efeito sobre a população. Havendo a formação de novos alelos de um gene, a possibilidade de substituição em uma população ocorre após a ação da deriva gênica e da seleção natural que definem a distribuição de caracteres numa população. Mutações com efeitos deletérios letais geralmente têm sua frequência reduzida devido à ação da seleção natural, diminuindo a presença desse alelo dentro da população (Futuyma, 2009).

Diversas doenças genéticas resultantes de mutações *de novo* e doenças hereditárias autossômicas ou ligadas aos cromossomos sexuais estão bem estabelecidas na literatura. Além da variação de cromossomos, *locus*, alterações

fenotípicas, características clínicas e potencial de letalidade, peculiares de cada doença, também é importante salientar a influência das gerações de descendentes sobre os efeitos patológicos em algumas doenças. A doença de Huntington, por exemplo, é uma doença genética hereditária autossômica dominante neurodegenerativa resultante da expansão de repetições de um trinucleotídeo no gene da Huntintina. Ao longo das gerações sucessivas, o aumento dessas regiões repetidas provoca o desencadeamento, cada vez mais precoce, dos sintomas da doença (Pouladi e cols, 2013). O oposto foi verificado em estudos do LMPDC utilizando o modelo *Gallus gallus* onde verificou-se que galinhas kDNA positivas, com lesões patológicas semelhantes às chagásicas, geravam progênes kDNA positivos com diminuição da frequência da patologia. Considerando que na cadeia de gerações sucessivas os efeitos patológicos se diluem até, possivelmente, desaparecer ao longo do processo de adaptação seletiva (Teixeira, 2007).

Com o desenvolvimento de diversos estudos acerca da herança e das manifestações fenotípicas dos alelos fixos em *loci* definidos tem sido observado eventos na natureza que não podem ser explicados apenas pelo tipo de herança proposto por Mendel. Diante de variações de tipos de heranças reconhecidas, foram introduzidos novos conceitos como fixação de mutações, penetrância e expressividade para explicar os casos em que o genótipo não reproduz o fenótipo esperado. Doenças com consequências diretamente influenciadas pela origem parental do alelo já foram descritas. Fatores epigenéticos e ambientais também influenciam a expressão gênica. Todos estes conhecimentos posteriores às leis de Mendel demonstram que os caracteres herdados podem não obedecer aos padrões propostos pelos modelos de herança clássica ou Mendeliana.

## **7. JUSTIFICATIVA**

Diante do exposto, pode-se verificar que as integrações do kDNA podem ser transmitidas através da transferência vertical para sucessivas gerações familiares do paciente infectado pelo *T. cruzi*. Os possíveis efeitos da presença do kDNA, assim como o padrão de herança desse DNA exógeno, ainda não foram elucidados.

A avaliação da fixação da mutação herdada é de suma importância para auxiliar na compreensão do potencial efeito do kDNA no genoma desses indivíduos, no esclarecimento de possíveis regiões gênicas preferenciais de integrações sujeitas ao evento de fixação, assim como, na compreensão acerca de variações dos tipos de herança dessas mutações. O estudo desses eventos contribuirá também para estender o conhecimento acerca da evolução do genoma humano decorrente de mutações provocadas pela transferência lateral de DNA entre eucariotos.

## II OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GERAL

Mapear os *loci* das integrações dos minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma de genitores chagásicos ou com suspeita clínica de doença de Chagas e dos seus descendentes, com a finalidade de verificar a fixação dessas mutações nas progênies.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de nDNA e kDNA do *T. cruzi* nos pacientes chagásicos e seus familiares utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Amplificar regiões flangeadoras do kDNA integrado a partir da técnica de *tpTAIL* (*targetted-primer specific Thermal Asymmetric Interlaced*) PCR
- Mapear e identificar sítios de integração do kDNA nas sucessivas gerações dos pacientes chagásicos mediante análise do sequenciamento dessas regiões.
- Verificar a presença de sítios de integração de kDNA compartilhados pelos indivíduos de uma mesma família.
- Definir os tipos de herança presentes nas diversas mutações transferidas verticalmente em indivíduos das famílias do estudo.

### **III MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1 - GRUPO AMOSTRAL ESTUDADO**

O grupo estudado consistiu de um total de 26 indivíduos pertencentes a quatro famílias: A, B, C e D. Atualmente as famílias residem na cidade de Brasília ou entorno do Distrito Federal (DF), em cujas áreas considera-se que estejam livres de triatomíneos vetores do *T. cruzi*. Contudo, os parentais nas famílias estudadas são procedentes de vários Estados do Brasil, considerados regiões endêmicas. Em cada uma das famílias pelo menos um dos parentais tinha diagnóstico prévio da infecção pelo *T. cruzi*, ou apresenta manifestações clínicas semelhantes às encontradas em chagásicos crônicos.

A Família A, composta por indivíduos de três gerações sucessivas, era procedente do interior de Minas Gerais, onde a genitora relatou ter convivido com triatomíneos em sua residência. Os genitores da Família B, composta por nove integrantes, viveram em áreas rurais antes de migraram para o DF onde geraram a sua família. Esses familiares estão distribuídos em três gerações e o cônjuge da geração F1 também é proveniente de áreas endêmicas. A Família C, com sete participantes no estudo, foi distribuída em três gerações de descendentes. A Família D foi a única a possuir quatro gerações, num total de sete indivíduos.

Todos os indivíduos nas famílias do estudo foram devidamente informados sobre os aspectos da pesquisa a ser desenvolvida. A participação voluntária foi documentada no consentimento assinado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP/FM) da Universidade de Brasília (UnB) e aprovado com o número de registro CEP-FM 083/2005.

#### **2 - COLHEITA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO**

Inicialmente, cada participante voluntário foi devidamente cadastrado e identificado com um código de registro específico e individual do laboratório. Em

seguida, amostras de 14 a 20 mL de sangue periférico de cada participante foram identificadas com o código de registro respectivo. O material coletado foi armazenado em tubo VACUETTE® contendo 7.2mg de EDTA e estocado à 4 °C até o procedimento de extração de DNA.

### **3 - EXTRAÇÃO DE DNA**

#### **3.1 – De células mononucleares do sangue periférico de humanos**

Para a extração de DNA genômico foi coletado sangue periférico de cada voluntário. O método empregado para o isolamento do material genético foi o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit/Promega (Cat#1125)* que proporcionou a obtenção de amostras com alta qualidade e integridade.

Para a lise inicial das membranas plasmáticas das células do sangue periférico foi adicionado 10mL de sangue em um tubo plástico estéril contendo 30mL de *Cell Lysis Solution*. Após ser misturado por inversão, o material foi incubado em temperatura ambiente (TA) por 10 min e, em seguida, o lisado sofreu centrifugação a 2.000 × g por 10 min. Depois de descartar o sobrenadante, o sedimento gerado foi ressuspenso vigorosamente em um vórtex. Posteriormente, para promover a lise da membrana nuclear das células brancas, foram adicionados 10 mL de *Nuclei Lysis Solution* e, então, foi feita a homogeneização com auxílio de uma pipeta. A enzima RNase foi acrescentada nessa etapa para uma concentração final de 20 µg/mL. O material foi incubado a 37 °C por 15 minutos.

Com o objetivo de eliminar as proteínas da amostra foram acrescentados 3,3 mL de *Protein Precipitation Solution*. Depois de homogeneizada no vórtex por 20 seg a amostra foi centrifugada a 2.000 × g por 10 min. O sobrenadante contendo o material genético foi transferido para um novo tubo estéril. Para a precipitação do DNA foi acrescentado 10 mL de Isopropanol a TA. A amostra foi centrifugada a 2.000 × g por 1 min e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Para lavar o sedimento de DNA genômico foi adicionado 10 mL de Etanol 70%. Em seguida, novamente foi centrifugado a 2.000 × g por 1 min. Após aspirar todo o Etanol o tubo foi mantido aberto de um dia para o outro para a total evaporação do álcool. Por fim,

para a ressuspender o DNA foi acrescentado 800 µl de DNA *Rehydration Solution* deixando reidratar a 4°C, por 24 h. O DNA foi armazenado em tubo Eppendorf a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE). Para atestar a qualidade da extração e a integridade do DNA foi feita análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio (0,5 mg/mL) e, em seguida, PCR padrão para a amplificação do gene constitutivo da β-actina.

### **3.2 – De formas epimastigotas de cultivo do *Trypanosoma cruzi***

Formas epimastigotas do *T. cruzi* cultivadas em meio LIT foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 min e o sedimento foi lavado e centrifugado duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) a 1.500 x g por 15 min. Em seguida, foi ressuspensão em tampão de extração na concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL de solução e mantido a 37 °C. Após 1 h de reação foi adicionada Proteinase K na concentração final de 100 µg/mL e incubado por 12 h a 37 °C. Dando continuidade foram feitas duas extrações com clorofane e uma com clorofil, respectivamente. Para a precipitação do DNA foi utilizado Etanol absoluto 100% (2,5V) e acetato de sódio 3M pH 4,7 (0,1V). Após precipitação, o DNA foi lavado duas vezes com Etanol 70% gelado, e depois de seco, foi ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) e armazenado a -20 °C, conforme a descrição de Sambrook e Russel (2001).

### **3.3 – De kDNA das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Para a extração do DNA apenas do cinetoplasto foi feita uma adaptação da técnica de extração descrita por Pérez-Morga e Englund (1993). Inicialmente, um concentrado de  $1-3 \times 10^7$  formas epimastigotas de cultivo do *T. cruzi* foi centrifugado a 5.000 x g por 15 min e, em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com PBS 1x em centrifugações de 5.000 x g por 15 min. As células foram ressuspensas em 630 µl de tampão NET 100 (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 100 mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl) e lisadas com 71 µl de SDS 10%. Foram adicionados 7 µl (20 µg/mL) de proteinase K ao lisado. Para desfazer as redes concatenadas de kDNA, passar o



lisado 10 vezes através de uma seringa, e incubar a 37 °C por 12 h. Após o período de incubação, a mistura foi gentilmente homogeneizada com uma pipeta, e acrescentou-se 690 µl de tampão NET 100 com sacarose 20%, sendo então centrifugada nas mesmas condições anteriores. Após retirar cuidadosamente o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 680 µl de NET 100. Em seguida, foi acrescentado mais 690 µl de sacarose 20% em NET 100. A mistura foi novamente centrifugada a 16.000 g por 15 min. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 50 µl do sobrenadante remanescente. Dando continuidade, foi adicionado 1 mL de água MiliQ, e feita uma extração com clorofane, seguida de outra com clorofil. Para precipitar o kDNA foi utilizado 3V de Etanol 100% gelado e 0,1V de acetato de sódio 3 M pH 4,8. Após homogeneizar, a mistura foi mantida a -80 °C por 12 h. Dando prosseguimento, a amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 15 min à 4 °C. Para finalizar, o kDNA foi lavado duas vezes com Etanol 70% gelado e, após secar, foi ressuspensão em 200 µl de tampão TE . O armazenamento ocorreu a -20 °C.

#### **4 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Com o objetivo de detectar a presença do DNA nuclear e do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* no material genético extraído de cada voluntário foram realizadas PCRs em triplicata para esses marcadores. Para cada uma das regiões de interesse foi utilizado um par de iniciadores específicos (Tabela 1).

##### **4.1 – Amplificação do DNA nuclear (nDNA) do *Trypanosoma cruzi***

A aplicação da reação de PCR com marcador molecular específico para a detecção do nDNA do parasito visa verificar a presença da infecção ativa. O par de iniciadores Tcz 1 e Tcz 2 utilizados para a amplificação dessa região foi desenhado a partir de uma sequência de DNA nuclear repetitivo do *T. cruzi*, e produzem amplicons com aproximadamente 188 pb de tamanho (Moser e cols, 1989).

A amplificação dessa região do nDNA do parasito requer 200 ng do DNA molde humano e reagentes nas seguintes condições: tampão de reação 10X (50 mM

de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,05 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada de acordo com a seguinte padronização: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 68 °C por 30 seg, extensão a 72 °C por 30 seg; uma extensão final de 5 min a 72 °C; 4 °C por ∞.

**Tabela 1 - Iniciadores específicos para *Trypanosoma cruzi* utilizados nas PCR e *tpTAIL-PCR***

INICIADOR	SEQUÊNCIA	DNA alvo	T <sub>m</sub> (°C)
Tcz 1	5' GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3'	nDNA	67,6
Tcz 2	5' CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3'	nDNA	61,4
S34	5' ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'	kDNA	57,9
S35	5' ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'	kDNA	59,4
S36	5' GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'	kDNA	57,9
S67	5' GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)T C 3'	kDNA	60,1

#### 4.2 – Amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *Trypanosoma cruzi*

A reação de amplificação do kDNA se deu a partir da combinação do par de oligonucleotídeos S35 e S36 (Sturm e cols, 1989) apresentados na Tabela 1. Esses iniciadores anelam especificamente nas regiões constantes dos minicírculos de kDNA (ver em Figura 5B) e geram uma banda de aproximadamente 330 pb e seus catâmeros. Para essa PCR foi usada a seguinte padronização: 200 ng do DNA molde humano, tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e

2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µl. A padronização para a amplificação do kDNA foi a seguinte: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 62 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min; uma extensão final de 5 min a 72 °C; 4 °C por ∞.

Em todas as triplicatas das PCRs de nDNA e kDNA foram utilizadas amostras controles para dar validade e confiabilidade ao experimento. Um dos controles utilizados foi o branco, onde o DNA molde humano foi substituído por H<sub>2</sub>O. Os controles negativos e positivos empregados tanto para nDNA como para kDNA foram selecionados a partir do banco de amostras padrão do LMPDC. O DNA total de *T. cruzi* Berenice (200 pg) também foi incluído como controle positivo nos testes.

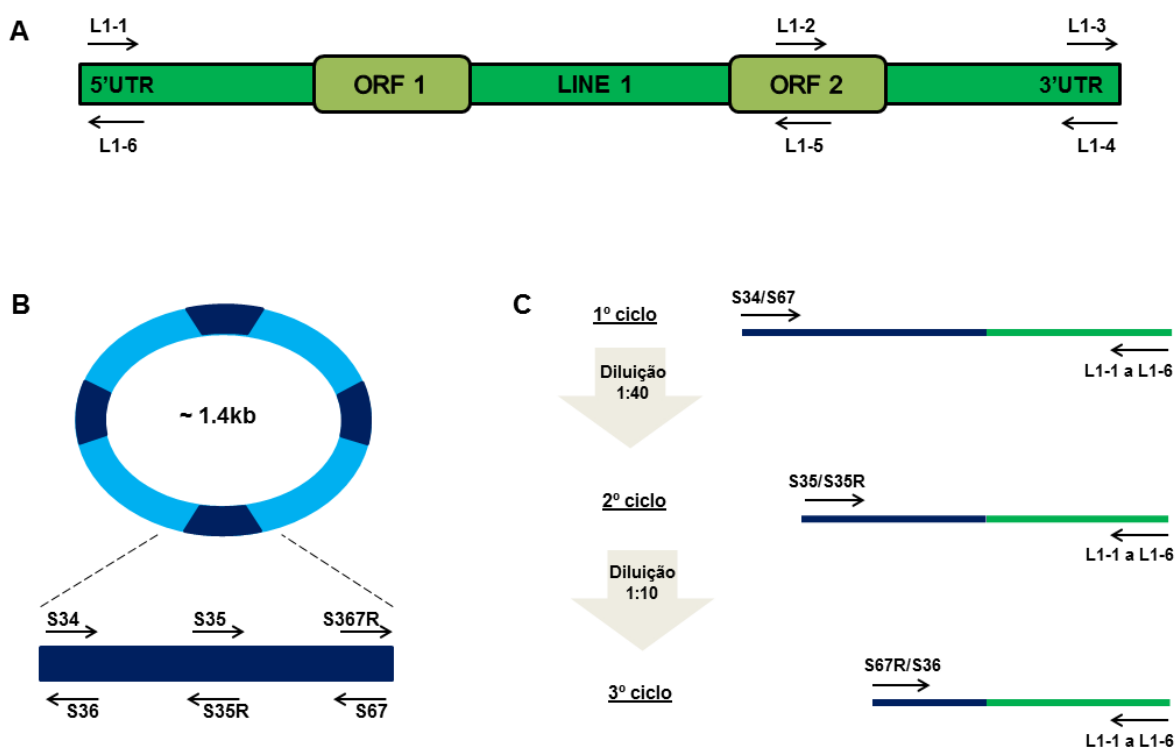
As amplificações foram realizadas no termociclador My cycler™ da BIO-RAD seguindo os programas de ciclos descritos acima. Para a averiguação do resultado da amplificação das amostras de PCR foram realizadas migrações eletroforéticas em gel de agarose 1,3%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL). A corrida foi feita sob tampão TAE 1X submetido à voltagem entre 70-120V e sob corrente constante.

## **5 - AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE DNA HUMANO QUE FLANQUEIAM O kDNA DO *Trypanosoma cruzi* INTEGRADO – *tpTAIL*-PCR**

Com a utilização da *tpTAIL*-PCR (*target-primer Thermal Asymmetric Interlaced – PCR*) tem-se em vista mapear os sítios de integração do kDNA no genoma do hospedeiro. Essa metodologia foi adaptada no LMPDC por Hecht e cols. (2010) e baseia-se numa modificação introduzida na TAIL-PCR descrita anteriormente por Liu & Whittier (1995). A técnica original tem como princípio a amplificação do DNA em três etapas de ciclos diferentes e sucessivos, onde são utilizadas combinações de oligonucleotídeos específicos com oligonucleotídeos degenerados. Cada um dos ciclos tem etapas que alternam altas e baixas temperaturas, o que resultam na modificação da estringência do anelamento dos iniciadores, permitindo momentos de anelamentos mais específicos ou menos

específicos. A alteração feita da TAIL original para a *tpTAIL*-PCR foi a substituição dos iniciadores degenerados pelo uso apenas de oligonucleotídeos específicos.

Como trabalhos anteriores (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006) já haviam demonstrado que os elementos transponíveis LINE-1 são alvos preferenciais de integração do kDNA, então Hecht e cols. (2010) deduziram iniciadores específicos a partir de regiões conservadas de L1 de diversos organismos, demonstrada na Figura 5A. O conjunto de oligonucleotídeo para kDNA foi obtido na sequência molde da região conservada do minicírculo (Figura 5B) e estão descritos na Tabela 1.



**Figura 5 – Esquemas das regiões de onde foram obtidos os iniciadores e da reação *tpTAIL*-PCR. A)** Presença de sequências conservadas nas regiões 5'UTR, ORF 2 e 3'UTR de elementos LINE-1 humanos permitiu a construção de um par de iniciadores para cada uma das regiões. **B)** Esquema da estrutura do minicírculo de kDNA do *T. cruzi* de aproximadamente 1.4kb, onde quatro regiões variáveis (azul claro) estão intercaladas por quatro regiões conservadas (azul escuro) do kDNA, de onde foram obtidos os seis iniciadores utilizados nas reações de *tpTAIL*-PCR. **C)** Esquema dos três ciclos das reações de *tpTAIL*-PCR, mostrando as diluições dos produtos de um ciclo para o outro, e os oligonucleotídeos de LINE-1 e kDNA utilizados em cada ciclo de amplificação. A sequência quimera esquematizada tem na cor azul escuro a região de kDNA integrada e em verde a região do DNA humano.

Na *tpTAIL*-PCR 1 utilizou-se 200 ng de DNA genômico adicionado a tampão de reação 1x (20 mM Tris Hcl pH = 8,4; 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, (Invitrogen); 0,4 µM do iniciador de kDNA (S34 ou S67), 0,2 mM de dNTPs, 2 Und de Taq Platinum (Invitrogen), além de 0,04µM de um dos iniciador de L1 (Tabela 2); resultando em um volume final de 25µl. A segunda *tpTAIL*-PCR foi a reamplificação do produto do primeiro ciclo. Os mesmos reagentes e concentrações utilizados nos primeiro ciclo foram empregados, entretanto, os oligonucleotídeos de kDNA foram substituídos pelo S35 nas amostras onde anteriormente foi empregado o S34 e S35 reverso nas amostras que receberam o S67. O DNA molde utilizado foi o produto da amplificação da primeira *tpTAIL*-PCR, diluído de 1:40. Já a *tpTAIL*-PCR 3 usa os produtos da segunda PCR diluídos de 1:10, e os iniciadores de kDNA foram o S67 reverso nas amostras que receberam o S35 e o S36 nas amostras onde anteriormente aplicou-se o S35 reverso. Os mesmos reagentes e concentrações das etapas anteriores foram mantidos. O esquema da *tpTAIL*-PCR e da mudança dos oligonucleotídeos está representado na Figura 5C. Os produtos do terceiro ciclo da *tpTAIL*-PCR foram aplicados em gel de agarose 1% e sofreram separação por eletroforese em voltagem de 70-120V.

**Tabela 2 - Iniciadores específicos para DNA humano**

INICIADOR	SEQUÊNCIA	DNA alvo	Tm (°C)
L1-1	5' CTC CGG TCT ACA GTC CCC A 3'	LINE	65,6
L1-2	5' TCC CAA GAC TAA ACC AGG A 3'	LINE	62,9
L1-3	5' ATC ACA CTC TGG GGA CTG TG 3'	LINE	64,7
L1-4	5' CAC AGT CCC CAG AGT GTG AT 3'	LINE	59,9
L1-5	5' TCC TGG TTT AGT CTT GGG AG 3'	LINE	60,1
L1-6	5' TGG GAG CTG TAC ACC GGA G 3'	LINE	63,0
OR <sub>1-17</sub> S2	5' TTT GGG ATT GTG GCT GTG G 3'	GENE	62,9
OR <sub>1-17</sub> AS1	5' GGG CTC TAT TCA GAC GCT GG 3'	GENE	63,9

O programa de ciclos de cada uma das *tpTAIL*-PCR estão discriminados abaixo:

<u>1º ciclo de amplificação</u>	<u>2º ciclo de amplificação</u>	<u>3º ciclo de amplificação</u>		
95°C - 4 min	95°C - 4 min	95°C - 5 min		
5 ciclos {	12 ciclos {	20 ciclos {		
94°C - 30 seg			94°C - 30 seg	94°C - 30 seg
64°C - 1 min			64°C - 1 min	45°C - 1 min
72°C - 2 min			72°C - 2 min	72°C - 2 min
94°C - 30 seg			94°C - 30 seg	
25°C - 2 min			64°C - 1 min	72°C - 7 min
72°C - 2 min			72°C - 2 min	4°C - ∞
			94°C - 30 seg	
			72°C - 2 min	
			45°C - 1 min	
			72°C - 2 min	
			72°C - 7 min	
	4°C - ∞			
12 ciclos {				
94°C - 30 seg				
64°C - 1 min				
72°C - 2 min				
94°C - 30 seg				
64°C - 1 min				
72°C - 2 min				
94°C - 30 seg				
44°C - 1 min				
72°C - 2 min				
72°C - 7 min				
4°C - ∞				

### 5.1 – Seleção de sequências aneladoras gene-específicas para o teste *tpTAIL*-PCR

A adaptação feita para genes específicos teve como princípio a análise da herança vertical dos minicírculos de kDNA dentro de uma mesma família. Através dos clones encontrados neste trabalho e baseado em resultados anteriores dos trabalhos de Hecht e cols (2010), Araújo (2012) e Pimentel (2012) foi verificado, em um número considerável de clones, a integração do kDNA flanqueado pelo gene do receptor olfatório OR<sub>1-17</sub> (*locus* BC137023.1). Assim, este gene foi selecionado para a *tpTAIL*-PCR-específica, para a qual foram sintetizados quatro oligonucleotídeos iniciadores, dois à montante e dois à jusante da região de integração do kDNA (RO<sub>1-17</sub> S1; RO<sub>1-17</sub> S2; RO<sub>1-17</sub> AS1; RO<sub>1-17</sub> AS2). Desses iniciadores, apenas foram utilizados o RO<sub>1-17</sub> S2 e o RO<sub>1-17</sub> AS1 (Tabela 2) combinados com os mesmos

iniciadores de kDNA empregados na *tpTAIL*-PCR convencional. A escolha desses oligonucleotídeos se deu pela melhor localização desses em relação a região conhecida de integração do kDNA. Os programas de amplificação dos três ciclos estão descritos abaixo, e diferem do anterior por adaptar as temperaturas de anelamento à condições mais próximas aos novos iniciadores específicos para a região do RO<sub>1-17</sub>.

<u>1º ciclo de amplificação</u>	<u>2º ciclo de amplificação</u>	<u>3º ciclo de amplificação</u>	
95°C - 4 min	95°C - 4 min	95°C - 4 min	
8 ciclos {	12 ciclos {	20 ciclos {	
95°C - 30 seg			95°C - 30 seg
61°C - 1 min		61°C - 1 min	50°C - 1 min
72°C - 2 min		72°C - 2 min	72°C - 2 min
94°C - 30 seg		94°C - 30 seg	72°C - 7 min
50°C - 2 min		61°C - 1 min	4°C - ∞
72°C - 2 min		72°C - 2 min	
94°C - 30 seg		94°C - 30 seg	
61°C - 1 min		50°C - 1 min	
72°C - 2 min		72°C - 2 min	
94°C - 30 seg		72°C - 7 min	
50°C - 1 min		4°C - ∞	
72°C - 2 min			
72°C - 7 min			
4°C - ∞			

## 6 – TRANSFERÊNCIA DOS PRODUTOS DE PCR PARA MEMBRANA DE NYLON

Após a realização das etapas de amplificação e separação eletroforética, os produtos de PCR foram transferidos do gel de agarose para uma membrana de nylon carregada positivamente (Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup>, GE Healthcare) pelo método de transferência por capilaridade (Sambrook & Russel, 2001). Nessa etapa, o gel de agarose foi banhado por 20min em solução alcalina de NaOH 0,4 M para a desnaturação do DNA. Em seguida, foi feita uma ponte que permitia a mesma

solução alcalina passar, por capilaridade, entre o gel em direção a membrana de nylon promovendo, assim, a transferência dos amplicons do gel para a membrana. Após um período de 8 a 12 h de transferência a membrana foi exposta a TA até secar.

## 7 – MARCAÇÃO DE SONDAS COM $\alpha^{32P}$ -dATP

Os produtos de PCR imobilizados nas membranas foram hibridizados com sondas específicas marcadas radioativamente. Foram produzidas sondas para nDNA, kDNA do *T. cruzi* e a sequência gene alvo do Receptor Olfatório RO<sub>1-17</sub> humano. As sequências das sondas que foram utilizadas estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3 – Sondas utilizadas nos procedimentos de hibridização**

SONDA	DESCRIÇÃO
<b>kDNA</b>	kDNA total extraído de cultura de epimastigota de <i>T. cruzi</i> digerido com <i>Eco RI</i> (~1.4 kb), separado em gel de agarose 0,8% e purificado com o kit <i>illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification</i> (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
<b>nDNA</b>	DNA do produto de PCR obtido após a amplificação de 100pg de DNA de <i>T. cruzi</i> amplificado com os iniciadores Tcz1/Tcz2 (~188 pb) separado em gel de agarose 1% e purificado com o kit <i>illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification</i> (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.
<b>RO<sub>1-17</sub></b>	DNA do produto de PCR obtido a partir de 200 ng de DNA humano amplificado com os iniciadores RO <sub>1-17</sub> S2/RO <sub>1-17</sub> AS1 (~350 pb) separado em gel de Agarose e purificado com o kit <i>illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification</i> (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

As sondas foram marcadas radioativamente utilizando o *kit Random Primer Labelling System* (Invitrogen). Nessa reação são empregados 30 ng do DNA molde diluído em H<sub>2</sub>O milliQ para um volume final de 25  $\mu$ l. Antes de iniciar a marcação da sonda, o DNA molde sofre desnaturação por 10min a 100 °C e depois é instantaneamente colocado no gelo. O procedimento de marcação obedeceu ao protocolo do fabricante e os reagentes requeridos foram: 2  $\mu$ l de dGTP, 2  $\mu$ l de dCTP, 2  $\mu$ l de dTTP, 15  $\mu$ l do tampão *Random Primer*, 5  $\mu$ l do nucleotídeo dATP marcado radioativamente ( $\alpha^{32P}$ -dATP, 3000 ci/nmol), e como enzima polimerizadora foi



utilizado 1 µl da *Klenow*. Depois de, no mínimo, 3 horas de incubação a TA foi acrescentado 5 µl do tampão de parada.

Após a marcação, as sondas foram purificadas seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001). O volume final de 55 µl foi transferido para uma coluna de lã de vidro e Sephadex G50.

## **8 – SOUTHERN BLOT**

A membrana contendo DNA foi inicialmente banhada com SSC 2X e, em seguida, bloqueada por, no mínimo, 2 h com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SSPE 1,5%, SDS 7 % e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão) em um cilindro giratório a 65 °C. Após esse período, a sonda radiomarcada foi desnaturada (aquecimento a 100 °C por 5 min e resfriada, rapidamente, em gelo), em sequência, ela foi acrescentada à solução de pré-hibridização e ficou em contato com a membrana por no mínimo 12 horas a 65 °C, sobre giro constante.

O passo seguinte à hibridização foi a sequência de lavagens que a membrana foi submetida. Após retirar a solução com a sonda radiomarcada, foram feitas duas lavagens sequenciais com SSC 2x/SDS 0,1%, a 65 °C, por 15 min cada. Em seguida se deu mais duas lavagens sequenciais com uma solução mais diluída composta por SSC 0,1x/SDS 0,1% também a 65 °C e por 15 minutos cada. Após as lavagens, as membranas foram revestida com filme plástico de PVC, fixadas em um cassete e expostas a filme de Raios-X (KODAK T-MAT). O armazenamento do cassete se deu a -80 °C por um período entre 4 h a 7 dias, conforme a intensidade de emissão da radiação (medida por um contador Geiger). Passado esse período o filme foi revelado utilizando reagentes de revelação e fixação da Kodak.

Para os experimentos de *tpTAIL*-PCR específica para o RO<sub>1-17</sub> foi necessário hibridizar as membranas dos produtos da PCR, assim como, as membranas de colônia de bactérias com duas sondas diferentes. Cada hibridização ocorreu em momentos distintos e para que a membrana fosse hibridizada com a segunda sonda era necessário previamente ser realizada a dehibridização dessa membrana. A dehibridização foi realizada mediante três lavagens de 10 min cada

com água MilliRO fervente. Após esse procedimento, a membrana se tornava adequada para ser novamente hibridizada com a nova sonda radioativa.

## **9 – CLONAGEM DOS INSERTOS**

### **9.1 – Ligação dos produtos da *tpTAIL*-PCR em vetor pGEM T-easy**

Os produtos da *tpTAIL*-PCR 3 reconhecidos fortemente pela sonda de kDNA de *T. cruzi* foram ligados ao vetor comercial pGEM T-easy (Promega). A ligação procedeu-se seguindo as normas do fabricante: 3 µl do produto da *tpTAIL*-PCR; 1 µl da enzima Ligase; 1 µl do plasmídeo pGEM T-easy; e 5 µl do Tampão. A ligação foi incubada por 12 h a 4 °C.

### **9.2 – Preparação e transformação das bactérias *Escherichia coli* competentes**

Para a clonagem, a linhagem de bactéria utilizada neste trabalho foi a *E. coli* XL10-Gold (Stratagene). Para que fosse possível que os plasmídeos ligados ao produto da *tpTAIL*-PCR ingressassem no citoplasma da bactéria foi preciso que esta estivesse permissiva, ou seja, competente para essa entrada. O protocolo utilizado com esse objetivo foi o de Cloreto de Rubídio (Promega, 1996). As *E. coli* competentes foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Com as bactérias já competentes foi realizada a transformação, ou seja, a metodologia que permite a entrada do vetor no citoplasma da *E. coli*. Para tal, foram acrescentados 3 µl de cada ligação em alíquotas de 100 µl de *E. coli* competente, no gelo. Após encubar de 30 min no gelo, as amostras foram submetidas a choque térmico ficando em banho-maria a 42 °C por 2min e, imediatamente após, foram introduzidas em gelo por um período de 5min.

Antes de plaquear cada ligação foi acrescido meio LB líquido em cada alíquota de *E. coli* que foram incubadas a 37 °C por 90 min sobre agitação constante de 150 rpm. Após centrifugar as alíquotas a 14.000 rpm e desprezar o sobrenadante, o sedimento foi homogeneizado e plaqueado em meio LB sólido com ampicilina (100 µg/mL) e X-Gal (40 µg/mL) e incubada por 12 h em estufa a 37 °C. O uso do antibiótico e do substrato proporcionou dupla seleção das colônias. A

ampicilina selecionou as colônias que receberam o vetor pGEM T-easy, pois este plasmídeo possui o gene de resistência à ampicilina permitindo a sobrevivência apenas das células que foram transformadas. O vetor pGEM T-easy possui o gene da  $\beta$ -galactosidase e, quando ocorre o fenômeno de integração do inserto, este gene é rompido cessando o consumo do X-Gal. Dessa forma, as colônias que receberam o plasmídeo sem o inserto apresentaram coloração azulada devido ao consumo do substrato, e as colônias de cor brancas eram aquelas em que o vetor possuía o inserto.

### 9.3 – Seleção dos clones para o sequenciamento

As colônias foram selecionadas aleatoriamente (30 colônias por ligação) e repicadas em uma membrana de nylon, positivamente carregada, sobre meio de cultura LB sólido, plaqueado em placa de Petri contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e X-Gal (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Simultaneamente, foi feita uma placa espelho onde as mesmas colônias eram repicadas diretamente em meio LB sólido (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-Gal). As placas foram incubadas em estufa por 12 h a 37 °C.

Após o período de incubação para o crescimento das colônias, cada membrana foi retirada da placa e passou por um tratamento para permitir o rompimento das células e a exposição e ligação do DNA à membrana carregada. O tratamento se deu em três etapas: cada membrana foi posta em um recipiente forrado com papel toalha embebido com solução de lise (SDS 10%) por 10 min; em seguida, a membrana foi exposta da mesma forma à solução de desnaturação (NaOH 0,4 M) por 10 min; e finalmente, foi colocada sobre papel toalha contendo solução de SSC 2X, também por 10 min. As membranas foram secas e armazenadas a TA até o momento do uso.

Depois de tratadas e secas as membranas ficaram prontas para o processo de hibridização conforme descrito no item 8. As membranas dos experimentos com colônias resultantes de clonagem da *tpTAIL*-PCR para o RO<sub>1-17</sub> foram hibridizadas duas vezes, necessitando da etapa de dehibridização descrita no item 8.

#### 9.4 – Extração, digestão e seleção do DNA plasmidial

Após os procedimentos de hibridização e revelação do filme foram selecionadas as colônias que possuíam sinal mais forte de hibridização com a sonda. Em seguida essas colônias foram crescidas, individualmente, em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina por 12h a 37 °C com aeração e agitação constantes de 250 rpm. As bactérias crescidas foram submetidas à extração de DNA plasmidial através do *kit* Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. A análise dos insertos foi feita após digestão enzimática por EcoRI (Invitrogen) a 37 °C por 12 h. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 1%, e os clones com os maiores insertos foram selecionados para sequenciamento comercial (Genomic Engenharia Molecular Ltda/ SP) em um *3130xl Genetic Analyser da Biosystems*, utilizando como sequências iniciadoras o Sp6 e o T7.

### 10 – ANÁLISE DOS CLONES SEQUENCIADOS E BIOINFORMÁTICA

As análises iniciais das sequências quimeras foram feitas utilizando as ferramentas dos programas DNAMAN, BIOEDIT e GENEIOUS. Para identificar as similaridades das sequências com *Homo sapiens* e *T. cruzi*, elas foram alinhadas com o depósito do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do algoritmo BLASTn. Na análise foram inseridos os seguintes parâmetros: *Database – Others; Optimize for Somewhat similar sequences* (BLASTn); e para limitar o alinhamento das sequências estudadas com as sequências prévias já depositadas pelo LMPCD foi acrescentada no parâmetro *Entrez Query* a restrição “all[filter] NOT Nitz[auth]”. Foram selecionados como válidos os resultados que tiveram valores de *E-value*  $\leq 10^{-3}$  e Identidade  $\geq 70\%$ . A base de dados GIRI foi utilizada para a obtenção de informações acerca da presença de categorias de elementos móveis.

Para a análise *in silico* da conformacional as sequências quimeras selecionadas foi utilizada a ferramenta bioinformática ICGEBnet, especificamente o método BEND.it, disponível em <http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/index.php> (Vlahovicek e cols, 2003).

## IV – RESULTADOS

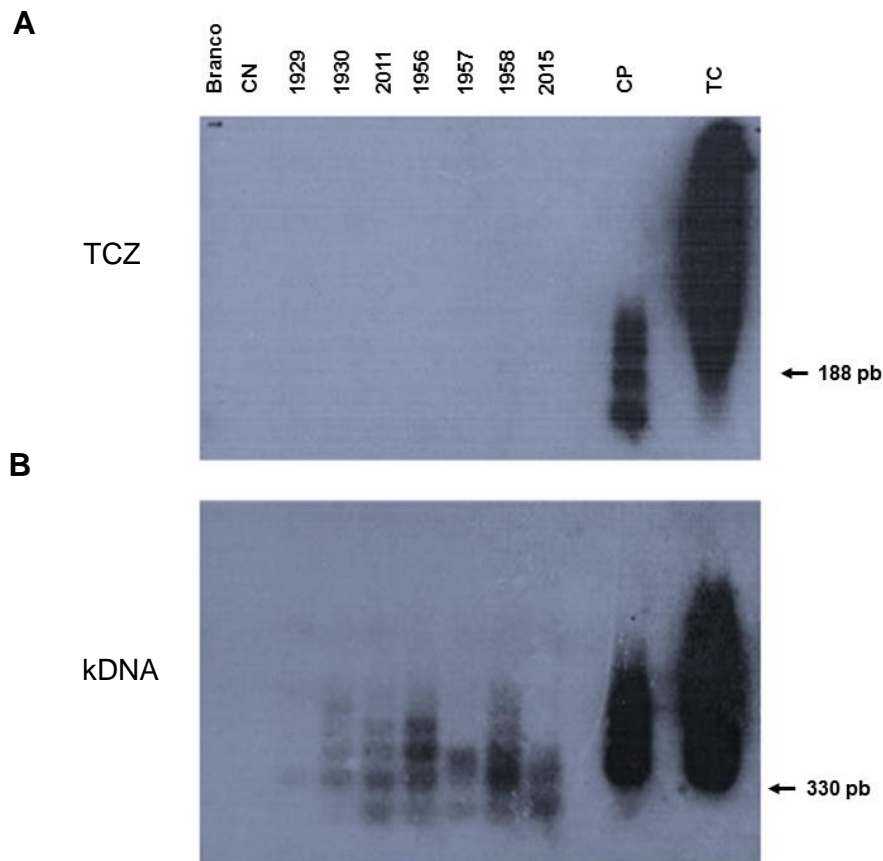
### 1. EMPREGO DA PCR COM SEQUÊNCIAS ANELADORAS DE nDNA E kDNA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS INFECÇÕES PELO *T. cruzi*

O diagnóstico de cada indivíduo foi feito pela técnica de PCR utilizando-se os aneladores e os procedimentos descritos em detalhes no tópico III.4. A utilização dos oligonucleotídeos Tcz1/Tcz2 permitiu verificar a presença de nDNA do *T. cruzi*, significando infecção ativa no hospedeiro. Este par de iniciadores produz uma banda de 188 pb e seus catâmeros identificados pela hibridização com a sonda radiomarcada específica para o DNA nuclear do parasito.

As ampliações pelas PCRs com o par de iniciadores s35/s36 detectaram minicírculos de kDNA no DNA molde extraído de células do sangue humano. Esses oligonucleotídeos amplificam no sentido da região variável do minicírculo, incluindo, ainda, a metade de uma região conservada gerando, ao final da reação, uma banda de 330 pb e seus catâmeros.

As análises moleculares utilizando esses dois conjuntos de iniciadores descritos foram realizadas em todos os 26 indivíduos participantes deste estudo. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados eram considerados válidos quando todos os controles utilizados (branco, controle negativo, controle positivo e DNA do *T. cruzi*) apresentavam os resultados consistentes.

A especificidade das PCRs foi confirmada mediante hibridização *Southern* dos produtos amplificados. Após a transferência do DNA para a membrana de nylon carregada positivamente, realizou-se a hibridização com sonda radioativa específica para nDNA ou kDNA. A Figura 6 ilustra um dos resultados obtidos em teste triplicata com DNA molde dos indivíduos da Família D. A hibridização do produto amplificado com a sonda específica revelava a presença da sequência alvo do DNA. Dessa forma, a presença de bandas específicas é um resultado positivo, enquanto que a ausência delas representa a não detecção do DNA procurado. Neste trabalho os resultados dos testes foram agrupados de acordo com as famílias estudadas e estão representados na Figura 7.



**Figura 6 – Southern blot sobre produtos de PCR obtidos com iniciadores de nDNA e de kDNA em moldes de DNA genômico de indivíduos da Família D, hibridizados com sonda específica. A) Southern blot dos produtos obtidos com Tcz1/Tcz2. A amplificação gerou uma banda de 188 pb e seus catâmeros. B) Southern blot dos produtos obtidos com os iniciadores s35/s36. Note as bandas de ~330 pb e seus catâmeros. Controles utilizados nas reações: Branco, ausência de DNA molde; CN, controle negativo; CP, controle positivo; TC, DNA total do *T. cruzi*.**

Os resultados dos testes de PCR nos indivíduos da Família A estão demonstrados na Figura 7A. Verificou-se que o parental 1406 teve ausência de amplificação do nDNA do *T. cruzi*, descartando a infecção ativa pelo parasito. Não obstante, a presença do minicírculo de kDNA foi constatada nesta progenitora. A descendente 1419 teve amplificação do nDNA com os iniciadores Tcz1/Tcz2, e este achado revelou a presença do parasito no seu organismo, caracterizando infecção ativa. Em adição, o teste para kDNA nesta descendente também se mostrou positivo, como pode ser verificado na Figura 7A. Na geração F2, a paciente 1420, apresentou resultado positivo apenas para o kDNA, sugerindo a transferência do kDNA para a descendente pela reprodução sexuada.

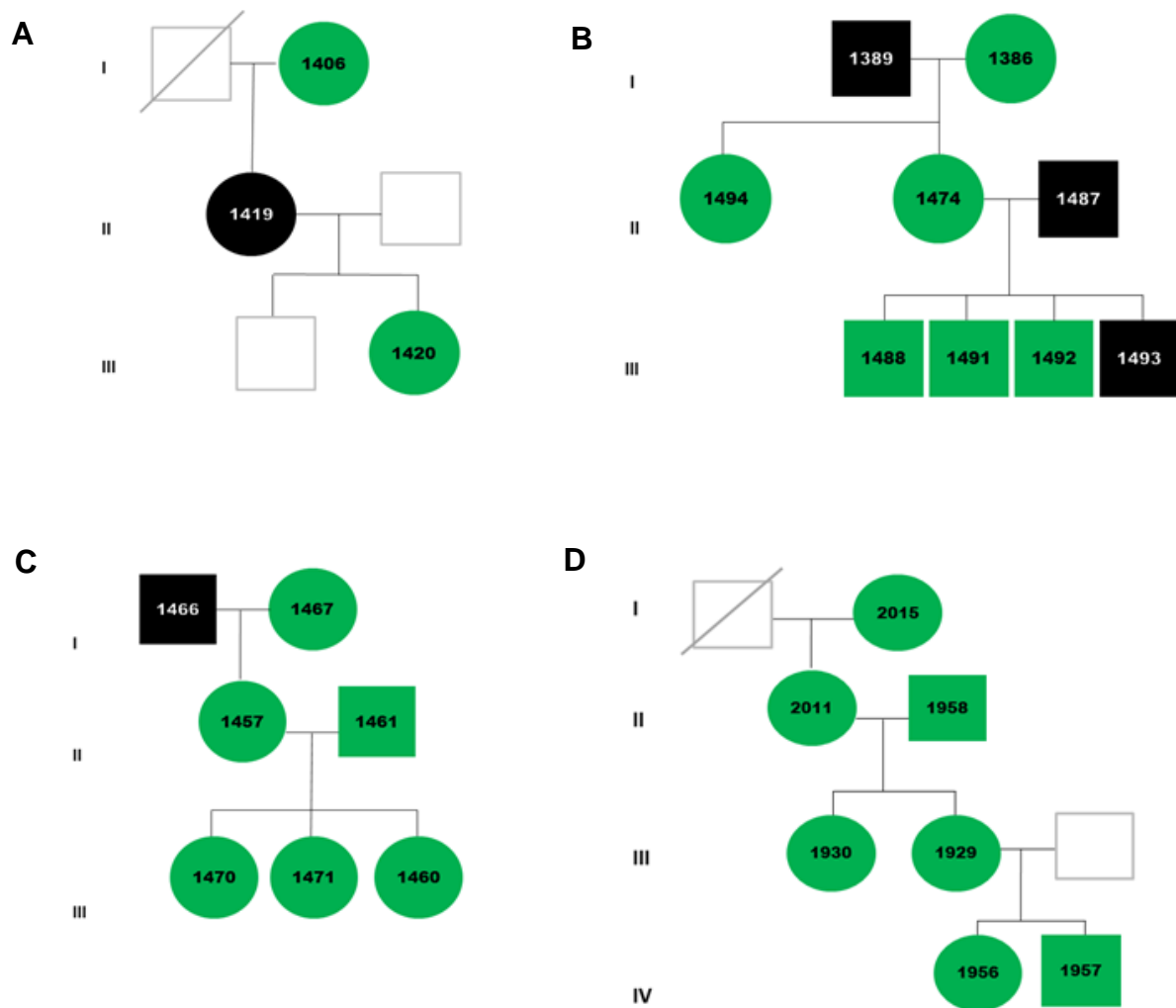
Dos nove integrantes da Família B, três indivíduos tiveram a PCR com amplificação do nDNA, indicando infecção ativa pelo *T. cruzi*. No parental 1389, e

nos casos 1487 e 1493 foi detectada a presença de nDNA e kDNA do flagelado. A genitora 1386 não apresentou nDNA, tendo apenas o kDNA confirmado pela PCR. Os outros seis indivíduos desta família herdaram o kDNA do parental chagásico transmitido dos parentais para os descendentes pela reprodução sexuada (Figura 7B).

A Família C com sete membros analisados, apresentou apenas o parental 1366 positivo para nDNA e kDNA, enquanto que a esposa 1367 teve o teste PCR positivo somente para kDNA. A filha deste casal, 1457, e o marido, 1461, tiveram o teste PCR positivo apenas para kDNA, confirmando a transferência vertical de minicírculos via reprodução sexuada, e, igualmente, o teste para kDNA foi positivo nos seus descendentes (1460, 1470 e 1471), conforme ilustrado na Figura 7C.

Entre todas as famílias estudadas a mais peculiar foi a Família D, pois, não apresentou nenhum indivíduo com teste PCR positivo para nDNA do *T. cruzi*. Contudo, mesmo sem a constatação da presença da infecção ativa na geração parental analisada, todos os descendentes apresentaram resultados positivos para o kDNA (Figura 7D). Este achado sugeriu que em algum momento da história da família um ancestral infectado pelo *T. cruzi* transferiu o kDNA para os descendentes em gerações sucessivas. A Figura 6 mostra os resultados dos filmes revelados após o *Southern blot* dos produtos da PCR da Família D. A ausência de amplificação do produto específico para o nDNA do parasito, verificada em todas as amostras da imagem superior, revela que não foi possível detectar nDNA do parasito, significando ausência de infecção ativa pelo *T. cruzi*, nesta família.

Dos 26 indivíduos analisados neste estudo, cinco (19,2%) apresentaram resultado positivo no teste PCR que amplifica o nDNA do *T. cruzi*. A herança de kDNA em 100 % dos indivíduos amostrados, mesmo na ausência de infecção ativa, mostra que o evento de TL e a herança do DNA exógeno de origem mitocondrial não parecem ser um evento de acontecimento raro na população humana.



**Figura 7 – Representação dos resultados obtidos nas análises de PCR para nDNA e para kDNA do *Trypanosoma cruzi*.** Círculos, indivíduos do sexo feminino; quadrados, indivíduos do sexo masculino; círculos e quadrados pretos, nDNA e kDNA positivos; círculos e quadrados verdes, apenas kDNA positivo; quadrados brancos, indivíduos não incluídos na casuística; quadrados brancos rasurados, indivíduos falecidos. **A)** Família A **B)** Família B. **C)** Família C. **D)** Família D.

## 2. MAPEAMENTO DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE kDNA NO GENOMA DAS FAMÍLIAS DO ESTUDO

Os testes PCR com aneladores s35/s36 foram positivos para kDNA do *T. cruzi* nos 26 indivíduos deste estudo. Com esse resultado, todo o grupo amostral foi selecionado para o mapeamento dos sítios de integração dos minicírculos de kDNA pelo sequenciamento dos produtos amplificados pela *tpTAIL*-PCR. Essa abordagem com três etapas de amplificação permite mapear randômicamente os sítios de integração do kDNA uma vez que utiliza uma combinação de oligonucleotídeos



aneladores para a região de DNA humano, e para kDNA (ver descrição da técnica no tópico III.5). Os seis iniciadores específicos para o DNA humano (Tabela 2 e Figura 5) foram obtidos por Hecht e cols (2010), a partir de regiões do retrotransposon LINE-1, sítio preferencial de integração do kDNA (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006).

Lembrando que a *tpTAIL*-PCR emprega iniciadores específicos do DNA hospedeiro e do kDNA do *T. cruzi*, em cada etapa sucessiva de amplificação o amplicon foi se tornando cada vez mais específico em decorrência da utilização de aneladores mais internos à região conservada do minicírculo de kDNA (Figura 5). Após a terceira etapa da *tpTAIL*-PCR, os produtos amplificados foram expostos à sonda radiomarcada de kDNA e aqueles que hibridizaram fortemente foram selecionados, ligados ao vetor comercial pGEM T-easy e clonados. Após a clonagem e extração do DNA plasmidial, os clones foram identificados com a sigla MBH, seguida de uma numeração. Ao final foram obtidos clones de 25 indivíduos, totalizando 465 clones sequenciados.

Do total de sequências clonadas, 152 (32,7%) apresentaram baixa qualidade do sequenciamento e foram descartadas por não ser possível identificar a sequência de DNA amplificada. Os remanescentes 313 (67,3%) clones foram alinhados com sequências depositadas no banco de dados GenBank/NCBI para identificar a identidade das sequências contidas nos clones. As análises mostraram 4 clones contendo somente DNA de humano, 110 clones apenas com kDNA, um clone contendo apenas o vetor pGEM T-easy e 198 clones contendo sequências quimeras kDNA-DNA humano. Dessa forma, o rendimento da *tpTAIL* PCR calculado pela razão entre o total de clones quimeras e o total de clones válidos foi de 63,3%. Esse valor de rendimento está próximo aos 58% obtidos anteriormente por Hecht e cols (2010) com a mesma técnica.

O alinhamento das sequências quimeras permitiu identificar as sequências redundantes no mesmo indivíduo, dessa forma, as sequências repetidas foram retiradas do montante de integrações quimeras e os dados apresentados nesta dissertação estão utilizando como base as 157 sequências não-redundantes. A Figura 8 mostra uma sequência quimera DNA humano com integração do minicírculo de kDNA e seus respectivos valores de *E-value* e similaridade, identificados na análise no BLASTn. Os valores de *E-value* de todas as sequências

obtidas neste estudo foram significativos, sendo que 12 clones apresentaram valores iguais a 0.0 (100% idêntico) nas regiões reconhecidas como DNA humano.

Os clones tiveram tamanho médio de  $640 \pm 161$  nts, sendo o maior deles composto por 1180 nts, e o tamanho médio das sequências de minicírculos do kDNA foi de  $228 \pm 161$  nts. Diversos clones, principalmente os que apresentaram integração do kDNA no *locus* AL732374.14 do cromossomo X, apresentaram a região do kDNA bastante rearranjada e truncada, possivelmente, devido a remodelamento daquele *locus*, visto que tais rearranjos podem ser resultantes de eventos de recombinação e embaralhamento no sítio de integração do kDNA com o DNA humano. Na Tabela A1 do Anexo 1 encontram-se listadas as informações sobre as regiões correspondentes ao kDNA e ao DNA humano como os respectivos *E-value* e percentual de similaridade, micro-homologia entre as sequências, e o *locus* de integração na maioria dos 157 clones.

Nos eventos de integração de kDNA no genoma humano, encontrados neste trabalho, foram observadas regiões de micro-homologia ricas em A e C compartilhadas pelo DNA humano e pelo kDNA, em uma ou mais regiões de DNA humano que se associavam, possivelmente, pelos eventos de recombinação e *hitchhiking*. Esses trechos de DNA compartilhado foram reconhecidos pelo banco de dados GenBank/NCBI como proveniente de origens distintas. O tamanho médio das micro-homologias foi de  $12 \pm 6$  nts, com a maior delas apresentando 34 nts, resultado semelhante ao observado anteriormente por Hecht e cols (2010) e Guimaro (2012).

Foram obtidas sequências quimera resultante da *tpTAIL*-PCR dos 26 indivíduos participantes deste estudo, mas o caso 1457 teve sequências curtas, de baixa qualidade, apresentando sequências válidas apenas na *tpTAIL* específica para o gene RO<sub>1-17</sub>. A média de  $6 \pm 4$  clones por paciente foi revelada. A maioria dos pacientes analisados (~80 %) eram apenas kDNA positivos, segundo o teste PCR específico para o minicírculo de kDNA. Dessa forma, esses resultados indicam que o parental de cada família transferiu exatamente aquele minicírculo de kDNA do seu gameta que, após fecundação, formou um embrião. Este processo que integra em cada gameta uma sequência de minicírculo diferente foi identificado na maioria dos progênies, na ausência de infecção ativa, porém, cada descendente com sua herança de minicírculo específico de kDNA integrado no genoma. Ocasionalmente,

era possível encontrar a mesma mutação, completamente idêntica, no parental e nas progênies.

**A**

S67r

```

1      GAACGCCCT CCCAAAACCA ATATTTACG AATCTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAC CAAATATATA AACTGTAATA TAACTCTAAC
121    TATACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AATATTCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAATCGG ACCCCACCTC CCGTAACACA CCCCATTTC GGCATATAA
301    TGTACGGGTG AGATGCATGA TTTTTCGGCC ATAAATTGTA ACGCCCCTCC CAAAACCAAT
361    ATTTACGAA TCTCCATACC TCATACTCCG TAACCATAAC ACAAACACAA TCATACAACC
421    CCATTAACCA AATATATAAA CTGTAATATA ACTCTAATTA TACAACTTA AACCACCTAC
481    CAAACTGTAA CTCACACGAT ATAAACTCAC ATGCATCATC TTAAACATAT TCAATAAGTT
541    ATATACCAA TATTCTAGTA ATCCACTAAC CTCCTTATAT CACACCAACC CCAATCGAAC
601    CAACATCAA GAATACATA AACACCTCTA CATAAATAAA CTAAGAAATC TAGAAGAAAT
661    GGATACATTC CTGGTTTGT CTTGGGA

```

L1-2

**B**

Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-16M2, complete sequence

Sequence ID: [gb|AC020783.8|](#) Length: 153740 Number of Matches: 5

Expect	Identities
2e-23	91/105(87%)

T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4

Sequence ID: [gb|M19188.1|TRBKPMCO](#) Length: 165 Number of Matches: 3

Expect	Identities
7e-42	131/149(88%)

**Figura 8 – Sequência quimera padrão mostrando integração de minicírculo de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma humano. A)** Clone MBH73 do indivíduo 1487 com 687 nts. Em azul escuro está destacada a região conservada do minicírculo de kDNA; em azul claro, região variável do kDNA; em verde, região de DNA humano do *locus* AC020783.8 do cromossomo 8. O trecho destacado em amarelo (24 nts) representa a região de micro-homologia entre as duas sequências. Os iniciadores utilizados na terceira *tp*TAIL-PCR estão sublinhados e identificados em cada uma das extremidades da sequência. **B)** Resultado da similaridade do clone MBH73 com depósitos no banco de dados GenBank/NCBI.

## 2.1 Topologia das regiões flanqueadoras às integrações de kDNA

A identificação da origem das sequências clonadas permitiu caracterizar algumas regiões de DNA humano flanqueadoras ao kDNA. Entretanto, em diversos casos, a utilização apenas do algoritmo BLASTn não permitia a caracterização dessas regiões. Para obter um número maior de informação acerca das sequências dos clones, as quimeras também foram alinhadas com o banco de dados da *Repbase* do CENSOR-GIRI. Cruzando os dados das duas análises foi possível

caracterizar 211 regiões presentes em eventos de integração de minicírculos. Esse acréscimo deu-se em decorrência da presença de dois ou mais *loci* em uma mesma sequência quimera ou pela presença de mais de uma região no mesmo *locus* na mesma sequência.

Conforme previsto, a grande maioria das integrações (49,8%) envolveu sítios contendo o retroelemento LINE-1. Esse achado foi explicado pela alta frequência de eventos de integração envolvendo o *locus* AL732374.14 do cromossomo X, perfazendo um total de 48 das 56 integrações associadas à este cromossomo. Este achado também indica que esse *locus* é um sítio preferencial de inserção do kDNA (Figura 9).

**A**

S67R

```

1      GAACGCCCT CCCAAAACCA ATATTTTCAG AATCTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAC CAAATATATA AACTGTAATA TAACTCTAAT
121    TATACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AGTAATCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAATCGA ACCCCACCTC CCGTAACACA CCCCATTTTC GGGCATATAA
301    TGTACGGGTG AGATGCATGA TTCTTTCGGC CATAAATTTG AACGCCCCCT CCCCAAAACC
361    AATATTTTAC AGAAGCCCCC TCCCAAAACC AATATTTTAC GAATCTCCAT ACCTCATACT
421    CCGTAACCAT AACACAAACA CAATCATACA ACCCCATTAA CCAAATATAT AAAGTGTAAAT
481    ATAACCTTAA TTATACAAAC TTAAACCACC TACCAAGCTG TAACTCACAC GATATAAACT
541    CACATACATC ATCTTAAACA TATTCAATAA GTTATATCAC CAGTAATCTA CTAATCCACT
601    AACCTCCTTA TATTACACCA ACCCCAATCG AACCAACATC AAAGAATACT ATGAACACCT
661    CTACATAAAT AAACATAAAA ATCTAGAAGA AATGGATACA TTCTTGGTTT AGTCTTGGGA
721    AAGTGTATGT GTATCAGAGC CTGTTATTGG TCTATTTCAGA GACTCAACTT CCTCCTGGTT
781    TAGTCTTGGG A

```

L1-2

**B**

Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X, complete sequence  
Sequence ID: [emb|AL732374.14|](#)Length: 224187Number of Matches: 13

<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
9e-29	85/91(93%)

T. cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone KY-13  
Sequence ID: [gb|M18814.1|TRBKPMCA](#)Length: 1451Number of Matches: 10

<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
6e-37	161/202(80%)

**C**

Name	From	To	Name	From	To	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	Score
7096.tmp/data.ori	610	705	L1HS	3183	3285	d	0.8485	1.0909	607
7096.tmp/data.ori	706	732	L1HS	3288	3314	c	0.9630	1.0000	241
7096.tmp/data.ori	734	791	L1	3422	3479	c	0.9655	1.0000	512

**Figura 9 – Integração do kDNA no locus AL732374.14 do cromossomo X. A)** Sequência quimera do clone MBH226 da paciente 1420 da Família A com 791 nts. Verde, região de DNA humano; azul escuro, região conservada do kDNA; azul claro, região variável do kDNA. O trecho de micro-homologia apresentou quatro nucleotídeos compartilhados entre os dois DNAs e está destacado em amarelo. Nas extremidades da quimera estão sublinhados e identificados os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no último ciclo da *tp*TAIL-PCR. **B)** Análise BLASTn (GenBank/NCBI) destacando os valores de *E-value* e similaridade para cada um dos trechos do DNA. **C)** Análise CENSOR-GIRI demonstrando a presença de retroelemento L1 na região do DNA humano do cromossomo X.

Vários elementos transponíveis, tais como LINE-2 (2,4%), SINE (6,2%), LTR (0,9%) e ERV (12,8%) foram encontrados em regiões de integração do kDNA. As integrações também foram constituídas por regiões codificadoras (8,5%) e pseudogenes (0,5%) (Figura 10A). Apesar das análises associarem os resultados entre o BLASTn e o CENSOR-GIRI, em 19 % dos casos não foi possível caracterizar

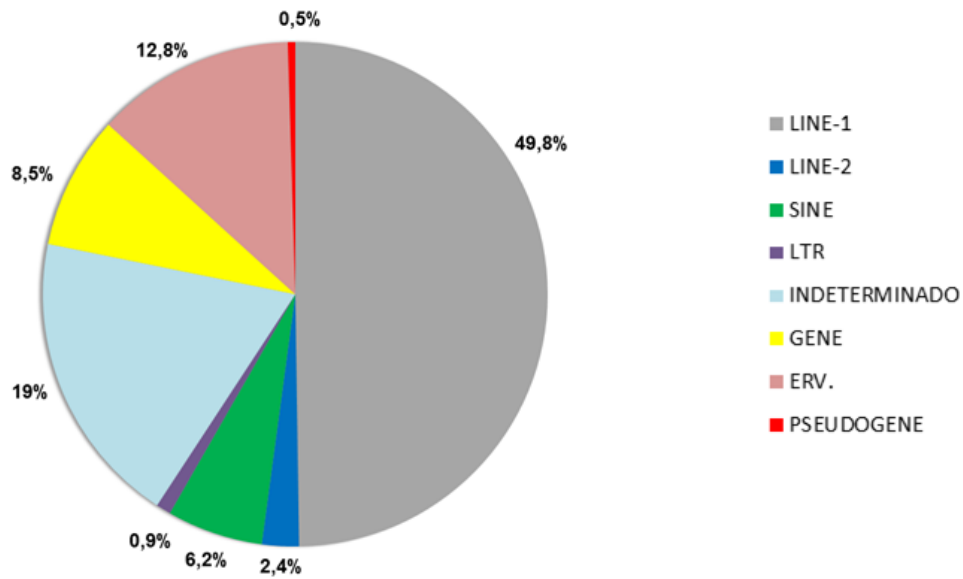
as regiões flanqueadoras nos dois bancos de dados. Dessa forma, essas regiões sem identificação foram consideradas indeterminadas. Para melhor compreensão dos resultados, neste trabalho as regiões flanqueadoras foram classificadas como: gene, elemento transponível, pseudogene ou região indeterminada. Em alguns clones quimeras o mesmo trecho da sequência humana apresentava, simultaneamente, mais de um elemento transponível, em geral um elemento L1 e um ERV. Desta forma, os clones que apresentaram esse tipo de evento foram caracterizados com duas regiões flanqueadoras distintas.

A distribuição das regiões flanqueadoras nos cromossomos humanos está ilustrada no gráfico da Figura 10B. Com exceção dos cromossomos 15, 20, 22 e 23 todos os outros apresentaram eventos de integração. Em 31 clones (~20 %) foram observados eventos envolvendo dois ou mais cromossomos diferentes, sugerindo a ocorrência de recombinação ou *hitchhiking* entre segmentos de sequências transpostas.

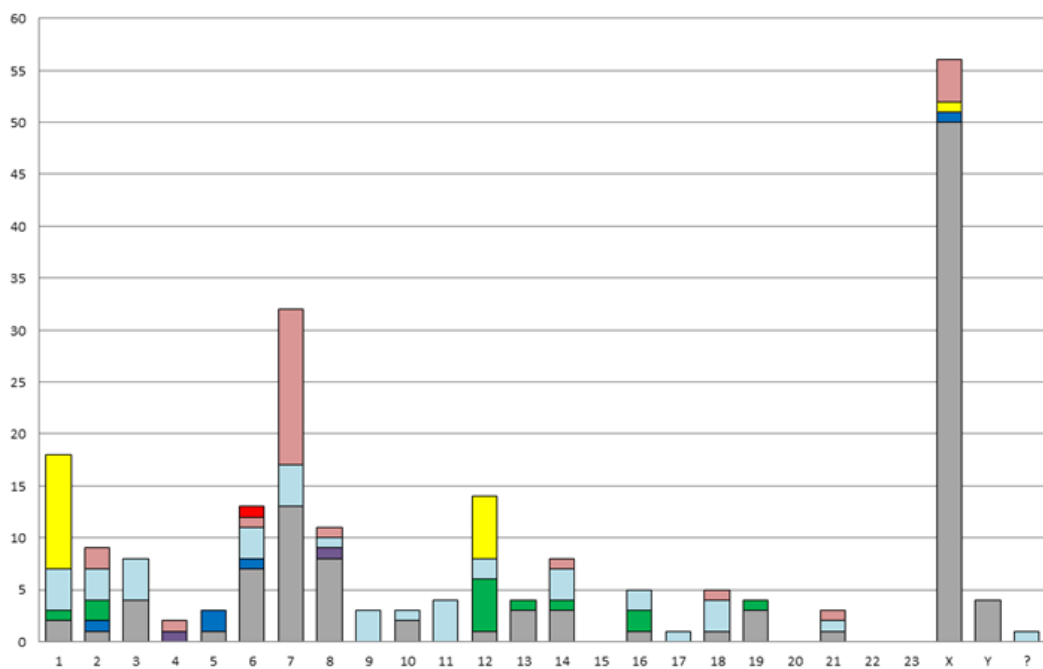
O cromossomo X, além de apresentar o maior índice de incidência de integração do kDNA em LINE-1, também apresentou um clone com inserção na região 3'UTR do gene PQBP1 (*Polyglutamine(Q) tract binding protein-1*) localizado no *locus* AJ973596.1 Em adição ao cromossomo X, outros dois cromossomos chamaram atenção pelas peculiaridades dos eventos de integração.

No cromossomo 1 estava agregada a maioria dos eventos relacionados a inserções de kDNA em regiões gênicas (11/18). Uma dessas integrações ocorreu no éxon 5 do gene da enzima Renina localizado no *locus* NG\_012122.1. Os outros dez eventos de integração ocorreram no sítio do receptor olfatório RO<sub>1-17</sub> no *locus* gênico BC137023.1. Este sítio de inserção do kDNA já havia sido observado anteriormente nos trabalhos de Hecht e cols (2010), de Araújo (2012), e de Pimentel (2012).

**A**



**B**



**Figura 10 – Caracterização das regiões flaqueadoras das integrações de kDNA no genoma humano. A)** Distribuição de acordo com as regiões flaqueadoras encontradas nos 157 clones analisados e que tiveram similaridades estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ). **B)** Distribuição das regiões flaqueadoras do kDNA em cromossomos humanos. A legenda descreve os resultados dos dois gráficos.

Outro cromossomo de interesse foi o autossômico 7, que obteve a segunda maior frequência de integração de kDNA (15%). Este cromossomo apresentou com frequência o retrotransposon ERV como região flaqueadora. A

maioria das integrações relacionadas a esse retroelemento foram identificadas no *locus* AC012596.4 onde também se encontra um elemento LINE-1.

## 2.2 Identificação de eventos de integração do kDNA em cada família

Após o panorama geral acerca dos eventos de integração dos minicírculos de kDNA encontrados neste estudo, este tópico apresenta um enfoque específico para cada uma das famílias estudadas.

A Família A obteve clones com integração de minicírculo de kDNA para as três gerações estudadas. Foi contabilizado um total de 22 clones quimeras com integrações em 21 *loci* distintos, distribuídos em 13 cromossomos, sendo que em um desses eventos não foi possível identificar o cromossomo, e em cinco clones foram identificados dois ou mais *loci* de cromossomos diferentes envolvidos na integração do kDNA. Foram identificadas 29 regiões flanqueando o kDNA, sendo 44,8% indeterminadas e 41,3% regiões contendo o retrotransposon LINE-1. Além de um evento contendo um SINE e dois contendo elementos ERV, um clone quimera apresentou integração de kDNA flanqueada por um gene do cromossomo 1 localizado no *locus* NG\_012122.1. Neste *locus* está situado o gene da Renina (REN), enzima que compõe o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), importante regulador eletrolítico e da pressão arterial em mamíferos (Tavares, 2000).

A integração do kDNA no gene REN foi verificada no clone MBH215 (Figura 11A) da paciente 1419. Este evento ocorreu no nucleotídeo 11.826 do gene REN e o kDNA se inseriu no éxon 5 (Figura 11B). O clone apresentou ao todo 781 nts e a região do gene compôs 124 nts. A região do DNA humano apresentou resultados significativos de *E-value* e similaridade no GenBank/NCBI (Figura 11C). Além da presença do gene REN, o clone MBH215 apresentou uma segunda região humana flanqueando o kDNA, o *locus* AC018522.7 de origem no cromossomo 18. No clone, a região deste *locus* apresentou 88 nts e foi identificado um elemento ERV (Figura 11D). O clone MBH215 apresentou dois trechos de micro-homologia, um entre a sequência do cromossomo 18 e o kDNA (9 nts) e a outra entre o cromossomo 1 e o kDNA (19 nts).



A

L1-1

```
1      CTCCGGTCTA CAGTCCCAG ATAATCTAGG TTCCGGCTTT TCTAGCTCCA GCCCCATCTG
61     ACGACCACCA CATTGGAGAC CCTAAGCTAG AAGCCCCC TC CCAAAACCAT AATGTACGGG
121    TGAGATGCGT GAATTTTCCG ACCCAAACCT GACGGCCCCC CCCAAAACCA TAATGTACGG
181    GGGAGATGCA TGAATTTCCA CCCCAAAGGT TGCCCTCAAC CCCGACACTC TCCGGTCTAC
241    AGTCCCCACC TGTGTAGTA GAAAGAGAAG ACGTCCTCTT TTAGCACCCC TTGGGAGATG
301    ATGTTGTCGA AGATAGGGGT GACCCTGCCA ATGGCCTGTT CAATGAAGCC CCCTCCCAA
361    ACCATAATGT ACGGTGGAGA TGCATGAATT TCCACCCCAA AGGTTGACCT CAACCCCGAC
421    ACCCTCCGGT CTACAGTCCC CATTTCGGG CAAATAATGT ACGGGTGAGA TGCATGGATT
481    TTCCGCCAAA AAGTTGAACG CCCCTCCCAA AACTGAATTT TCCAGATTTT CCGTATCACA
541    ATTTAACCAT ATAACCACCTA CCATCAACCA CCACACAACC TAACCAACAA CCTAACCAAC
601    ATCTATTATA AGAATAATTA TCATTTATAA CATTACGAAC ATAATACCAA CTGTATCTTA
661    CTCATATAAC CTCACCCAGC ATGTACGTTA TCTTCATTGT CATACTATAC ACATCATTTA
721    AATCACAAC TAATATACAT CCAAATTTCA ATACCCACC TCTCTATATT ACACCAACCC
781    C
      S36
```

B

```
exon 11743..11939
      /gene="REN"
      /gene_synonym="HNFJ2"
      /inference="alignment:Splign:1.39.8"
      /number=5
```

C

Homo sapiens renin (REN), RefSeqGene on chromosome 1  
Sequence ID: [ref|NG\\_012122.1|](#) Length: 18522 Number of Matches: 1

Expect	Identities
2e-49	120/124(97%)

Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-7N19, complete sequence  
Sequence ID: [gb|AC018522.7|](#) Length: 169578 Number of Matches: 1

Expect	Identities
1e-33	87/88(99%)

Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone B2 minicircle, partial sequence; kinetoplast  
Sequence ID: [gb|EU088395.1|](#) Length: 317 Number of Matches: 4

Expect	Identities
1e-08	55/63(87%)

Expect	Identities
2e-25	162/213(76%)

D

```
repeat region 79402..79721
      /rpt_family="MLT1H1"
```

**Figura 11 – Recombinação de seqüências de minicírculos de kDNA associadas a região do gene da enzima Renina (REN) no cromossomo 1 com fragmento de seqüência do cromossomo 18. A)** Seqüência quimera do clone MBH215 da paciente 1419 da Família A com 781 nts. Em vermelho, região de DNA humano do *locus* AC018522.7 do cromossomo 18; verde, DNA humano do *locus* NG\_012122.1 com seqüência do gene da enzima Renina (REN); azul, minicírculo do kDNA. Os trechos de micro-homologia aparecem em amarelo. Nas extremidades da quimera estão sublinhados os oligonucleotídeos iniciadores do último ciclo da *tp*TAIL-PCR. **B)** Sítio do éxon 5 do gene REN do genoma humano onde ocorreu a integração do kDNA. **C)** Análise no BLASTn (GenBank/NCBI) com valores de *E-value* e similaridade para cada um dos trechos do DNA. **D)** Análise BLASTn demonstrando elemento ERV da família MLT1H1, na região do cromossomo 18 humano.

Na Família A, entre todos os eventos observados, verificou-se no *locus* AL732374.14 de dois indivíduos (parental 1406 e a F2 1420) a integração de kDNA. O resultado do alinhamento dessas sequências, envolvendo este mesmo *locus* do cromossomo X está descrito no tópico IV-2.3, que também inclui resultados de outras famílias.

Na família B, os 55 clones obtidos dos nove integrantes geraram sequências quimeras contendo kDNA-DNA humano distribuídos em sítios de 18 cromossomos. Entre o total de quimeras foram mapeados 31 *loci* diferentes contendo 73 regiões flanqueando as integrações de minicírculos de kDNA. Em oito clones foi verificada a presença de *loci* de dois cromossomos envolvidos no mesmo evento de integração. Dentre as 73 regiões mapeadas flanqueando o kDNA, pouco mais de 80 % foram identificadas como elementos transponíveis. Deste montante, cerca de 71% delas envolviam o retrotransposon L1.

Um clone que chamou a atenção foi o MBH117 do paciente 1491 da geração F2 (Figura 12). Este quimera apresentou integração do kDNA no *locus* AJ973596.1 do cromossomo X. Esse *locus* abriga o gene PQBP1 que apresenta um domínio que codifica uma proteína envolvida na transcrição e na regulação do processamento do mRNA da RNA Polimerase II (Sudol e cols, 2012). O tamanho da sequência quimera foi de 430 nts distribuídos entre os 137 nts da sequência hospedeira, 283 nts do minicírculo de kDNA e a região de micro-homologia com 4 nucleotídeos compartilhados (Figura 12A). O resultado do alinhamento do clone MBH117 com o GenBank/NCBI demonstrou valores de *E-value* e similaridade significativos tanto para o DNA humano quanto para o kDNA (Figura 12B). Segundo o GenBank/NCBI, o gene PQBP1 possui ao todo 1133 pb e o evento de integração do kDNA neste gene ocorreu exatamente na posição entre o nucleotídeo 661 e 662, na região da extremidade 3'UTR do gene (Figura 12C).

**A**

L1-2

```
1      TCCCAAGACT AAACCAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTAT TTAGGTGACA
61     CTATAGAATA CTCAAGCTAT GCATCCAACG CGTTGGGAGC TCTCCCATAT GGTTCGACCTG
121    CAGGCGGCCG CGTATTCACT AGTGATTGAA GCGCCCTCCC AAAACCCGAT TTTCGAATCT
181    TCAAACCCGT AATTATTCTA CACCATTAC  CATCCGTAAC ACCACCAACA CCAAACCTCT
241    ACCACCATAT TATAAAAGAT ATATACAAC  AACATTACTA ACTATATACA TTATGAGCTC
301    ATTAACCCAC CAAGTATAAA TATCACACAC GTACTATATA TATCACATCA TACAACCTACA
361    CTCTAAAACA TCACACACCC ATTCATAAAT CATCCACCTA ATCCTATATT ACACCAACCC
421    CAATCGAACC
```

S36

**B**

Homo sapiens mRNA for polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)  
Sequence ID: [emb|AJ973596.1](#)|Length: 1133|Number of Matches: 1

Expect	Identities
1e-60	136/137(99%)

Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage I, strain X10 cl1 Z1, isolate mp38  
Sequence ID: [emb|AJ747960.1](#)|Length: 321|Number of Matches: 1

Expect	Identities
3e-10	59/70(84%)

**C**

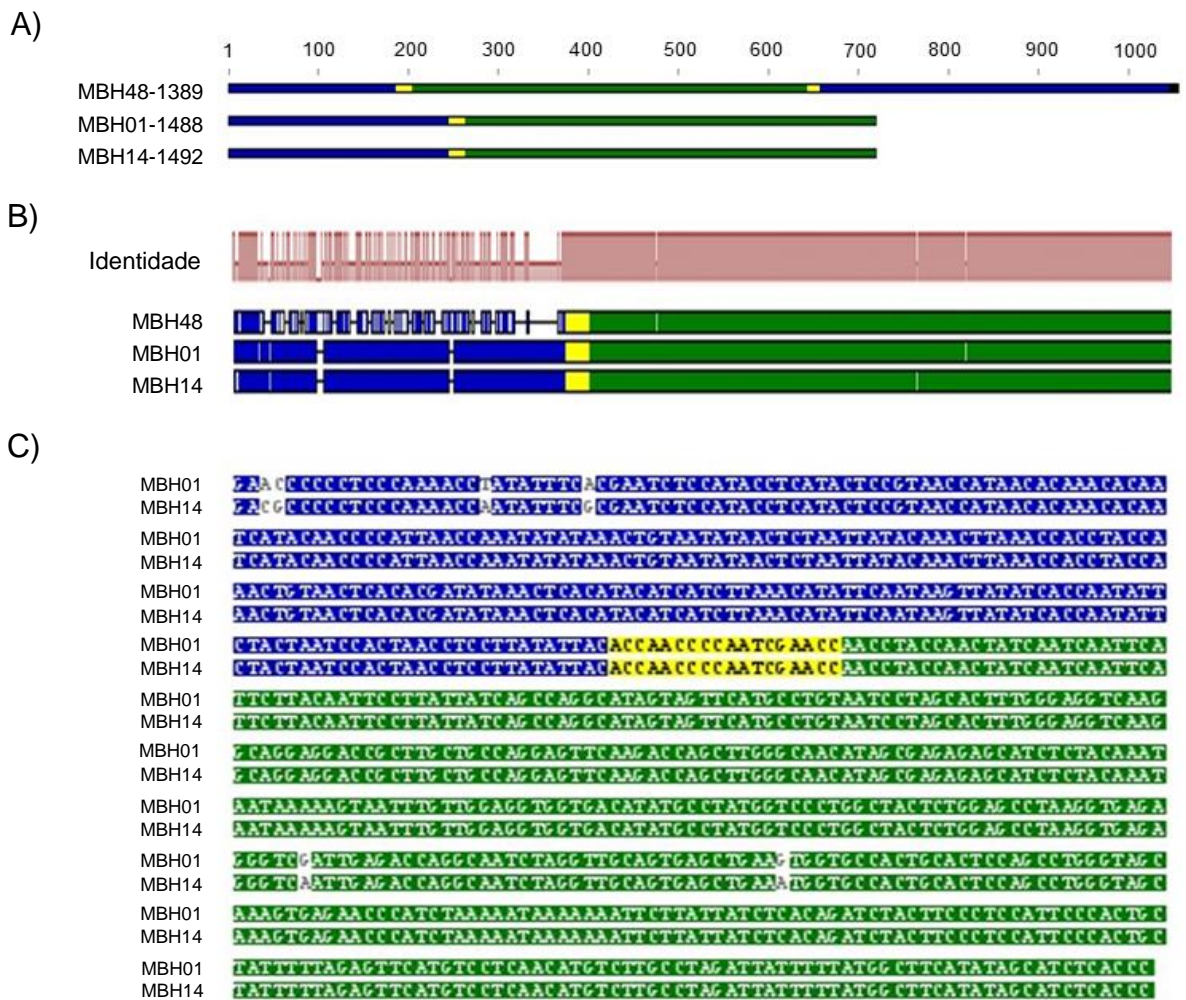
```
3'UTR      445..>1133
           /gene="PQBP1"
```

**Figura 12 – Sequência quimera com integração do kDNA no locus AJ973596.1 do cromossomo X, sítio do gene PQBP1.** **A)** Sequência quimera do clone MBH117 do paciente 1491 da Família B com 430 nts. Verde, região de DNA humano do locus AJ973596.1, região do gene PQBP1; azul, região do kDNA. O trecho de micro-homologia está destacado em amarelo. Nas extremidades da quimera estão sublinhados e identificados os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no último ciclo da *tpTAIL*-PCR. **B)** Resultado da análise BLASTn (GenBank/NCBI) destacando os índices de similaridade para cada um dos trechos do DNA. **C)** Integração do kDNA na região 3'UTR do gene PQBP1.

Ao analisar os resultados das integrações nos indivíduos da Família B observou-se que os *loci* AC084364.20 do cromossomo 12, o AC012596.4 localizado no cromossomo 7, e, também, o AL732374.14 do cromossomo X (ver resultados para este cromossomo no tópico IV-2.3) eram encontrados em mais de um indivíduo. Os *loci* dos cromossomos 7 e 12 abrigam elementos transponíveis nas regiões onde ocorreram a integração do kDNA. O sítio do cromossomo 12 apresenta um elemento Alu e o sítio do cromossomo 7 apresenta uma região com um L1 seguido de um elemento ERV. Para verificar a existência de semelhança na

constituição dos clones com integrações no mesmo *locus* foram feitos pareamentos entre as sequências que apresentaram integração no mesmo sítio.

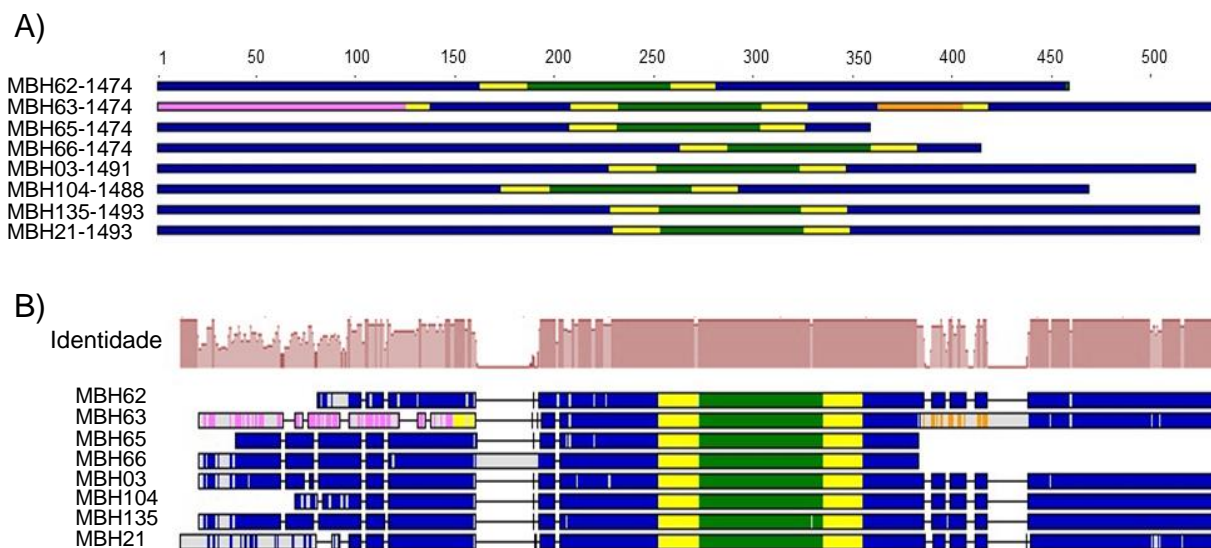
Os clones MBH01, MBH14 e MBH48 apresentaram integração no *locus* AC084364.20 do cromossomo 12. O clone MBH48 foi proveniente do parental nDNA, positivo da família, 1389, e os clones MBH01 e MBH14 foram resultantes, respectivamente, dos netos 1488 e 1492 da geração F2 (Figura 13A). A imagem ilustrada na Figura 13B mostra o alinhamento desses três clones (Identidade = 88,1%), onde é possível verificar o pareamento quase que total da região do DNA do cromossomo 12. A micro-homologia entre o DNA humano e kDNA, com 18 nts, apresentou identidade total (100 % de alinhamento) nas três quimeras. O mais interessante neste evento foi a observação do não pareamento da sequência do minicírculo de kDNA nas sequências do avô e dos dois netos (Figura 13B). Todavia, o pareamento das quimeras dos netos apresentou similaridade de 99,2%, porém com alterações pontuais (Figura 13C).



**Figura 13 – Alinhamento dos clones da Família B que apresentaram integração de kDNA no locus AC084364.20 do cromossomo 12. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Resultado do alinhamento entre os três clones. Acima - gráfico da Identidade do alinhamento; Embaixo: pareamento dos clones. As imagens representam apenas as regiões de tamanho igual entre os clones. Linhas brancas no alinhamento representam regiões diferentes entre os clones. **C)** Alinhamento quase que total dos clones MBH01 e MBH14. Em todas as imagens a cor verde representa a região de DNA humano, em azul, o kDNA, e, em amarelo, micro-homologias.

Além de apresentar clones de diferentes indivíduos com integrações no mesmo sítio do cromossomo 12, quatro integrantes da Família B apresentaram kDNA no locus AC012596.4 localizado no cromossomo 7. Os familiares 1488 e 1491 apresentaram um clone cada, MBH03 e MBH104, respectivamente. O indivíduo 1493 obteve dois clones, o MBH21 e o MBH135, e o caso 1474 apresentou os clones MBH62, MBH63, MBH65 e MBH66. Todos estes clones são diferentes e suas composições estão representadas na Figura 14A. A paciente 1474 é a mãe dos outros três indivíduos analisados (1488, 1491 e 1493). Entre todas as quimeras

presentes neste *locus*, somente MBH63, proveniente de 1474, apresentou outros sítios de DNA humano além do *locus* AC012596.4.



**Figura 14 – Alinhamento dos clones da Família B que apresentaram integração de kDNA no *locus* AC012596.4 do cromossomo 7. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Resultado do alinhamento entre os oito clones. No alto, gráfico da Identidade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. As imagens representam apenas as regiões de tamanho igual entre os clones. Em todas as imagens a cor verde representa a região de DNA humano do *locus* AC012596.4 do cromossomo 7; azul, o kDNA; e, em amarelo, os trechos de microhomologia. No clone MBH63 a região rosa representa o *locus* AC078793.13 do cromossomo 3 e a cor laranja representa o *locus* NG\_009261.1 localizado no cromossomo 7.

Na Figura 14A é possível verificar que a integração do kDNA envolveu *loci*, provenientes do cromossomo 3 (AC078793.13) e do cromossomo 7 (NG\_009261.1), ambos com regiões flangeadoras indeterminadas. A Figura 14B mostra o alinhamento dos clones (similaridade de 86,8%) onde os trechos de kDNA foram semelhantes entre algumas quimeras. Contudo, somente a região envolvida pelo *locus* analisado e pequenos segmentos de kDNA a montante e a jusante dele apresentaram-se com alta similaridade.

Após o alinhamento desses clones foi percebido que algumas quimeras demonstravam composição similar. Para verificar se tal similaridade refletia um evento de integração e fixação do kDNA da mãe (1474) transferido para os filhos, procedeu-se ao alinhamento das sequências semelhantes. O clone MBH65 da matriarca, e o clone MBH135 do caso 1493 foram selecionados por assemelharem-se com aqueles outros aparentados. O alinhamento desses quatro clones revelou

alta semelhança entre eles, alcançando similaridade de 97,5 %. Este achado revela que houve a fixação do kDNA herdado neste *locus* (Figura 15).



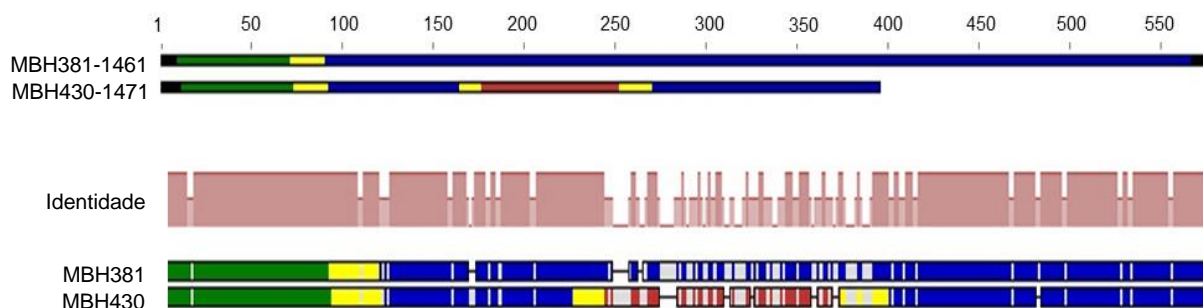
**Figura 15 – Alinhamento entre os clones selecionados da Família B que apresentaram seqüências integradas no *locus* AC012596.4 do cromossomo 7 com maior similaridade.** Em todas as imagens a cor verde representa a região de DNA humano; azul, o kDNA; e, em amarelo, os trechos de micro-homologia.

A Família C rendeu 42 clones quimeras obtidos de seis familiares, em 35 *loci* diferentes. Essas integrações mapearam 17 cromossomos, sendo o cromossomo X o mais representado. As regiões de DNA humano observadas flanqueando as integrações de kDNA abrigaram 51 sítios distribuídos entre elementos transponíveis (72,5%), pseudogene (2%) e regiões indeterminadas (25,5%). Nesta família foram identificados cinco clones com seqüências de dois cromossomos diferentes entre fragmentos de kDNA envolvidos no mesmo evento de integração.

Entre as 42 seqüências analisadas notou-se que clones contendo integração nos *loci* AC129028.3 (cromossomo 12), AC012596.4 (cromossomo 7) ou AL732374.14 (cromossomo X) apareciam em pelo menos dois indivíduos. Para verificar as possíveis semelhanças existentes entre esses clones, aqueles que possuíam integração no mesmo *locus* foram pareados.

Os clones MBH381 e MBH430, provenientes dos indivíduos 1461 e 1471 (pai e filha), respectivamente, apresentaram integração do kDNA no *locus* do cromossomo 12 (Figura 16A). O clone MBH381 apresentou 576 nts, sendo 81 nts pertencentes ao DNA humano e 504 nts ao kDNA, havendo entre os dois DNAs um trecho de micro-homologia de 19 nts. O clone MBH430 apresentou topologia peculiar que teria possibilitado a junção de regiões dos cromossomos 12 e 7. O clone com 395 nts, sendo 80 deles provenientes do cromossomo 12, 119 nts do cromossomo 7 e 233 nts do minicírculo de kDNA flanqueado pelo DNA hospedeiro. Três trechos de micro-homologia foram observados neste clone, o primeiro com 19

nts compartilhados entre o kDNA e o cromossomo 12; os outros dois entre o kDNA e o cromossomo 7, respectivamente, com 12 e 18 nts.

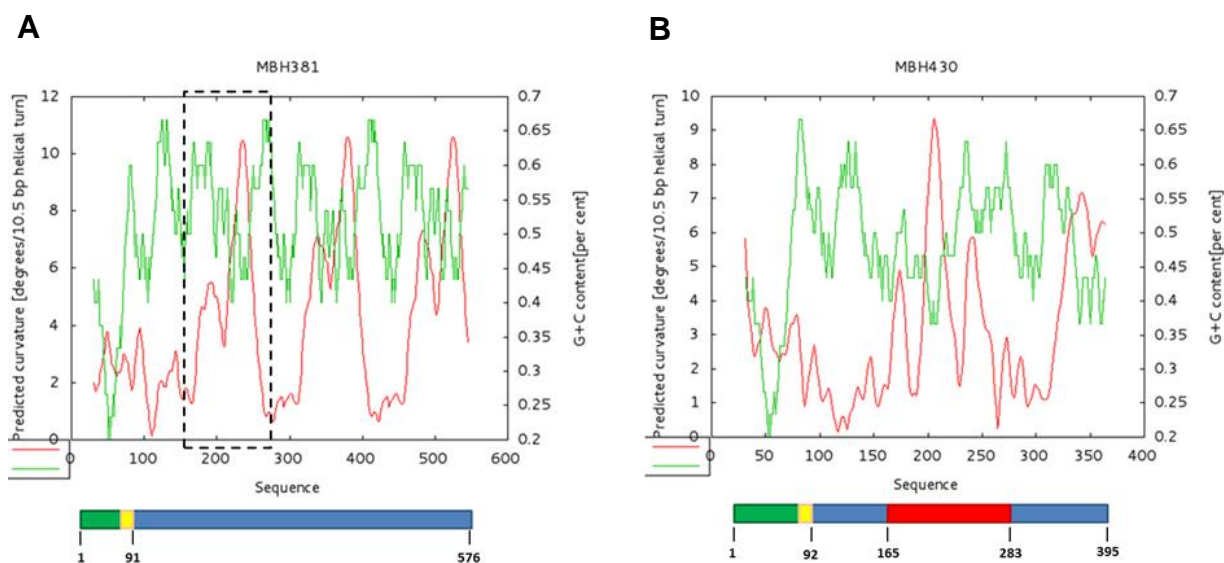


**Figura 16- Alinhamento dos clones da Família C que apresentaram integração de kDNA no locus AC129028.3 do cromossomo 12. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Alinhamento entre os dois clones. No alto, gráfico da Identidade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. As imagens representam apenas as regiões de tamanho igual entre os clones. Cor verde, região de DNA humano do locus AC129028.3 do cromossomo 12; azul, região do kDNA; e, em amarelo, os trechos de micro-homologia. No clone MBH430 a região em vermelho representa o locus AC012596.4 no cromossomo 7.

O alinhamento entre as duas sequências apresentou identidade igual a 88,7 % e o não pareamento ocorreu exatamente na região do cromossomo 7 do clone MBH430 (Figura 16B). O pareamento da Figura 16B dá ênfase à região onde as duas quimeras se alinharam, tornando mais visível os pontos onde não houve homologia entre as duas sequências (linhas brancas).

Utilizando a ferramenta BEND.it que permite analisar *in silico* a estrutura conformacional do DNA, sugerindo regiões de alças, foi possível identificar trechos de altas curvaturas nas regiões referentes ao kDNA do clone MBH381 (Figura 17A). Os três picos altos e semelhantes observados no gráfico de curvatura do MBH381 são reflexo de um possível evento de recombinação na região do kDNA que resultou em duplicações de parte da região conservada e a perda da região variável do minicírculo de kDNA. Esses três trechos do kDNA desta quimera foram separados e alinhados entre si e verificou-se identidade de aproximadamente 96 %, confirmando a alta semelhança entre eles. Com o resultado do BEND.it, obtido para o clone MBH430, foi possível identificar que a presença da inserção de um elemento ERV, do locus AC012596.4 do cromossomo 7, ocorreu exatamente no ponto equivalente a uma das regiões de alta curvatura observada no clone do parental 1461(Figura 17B).





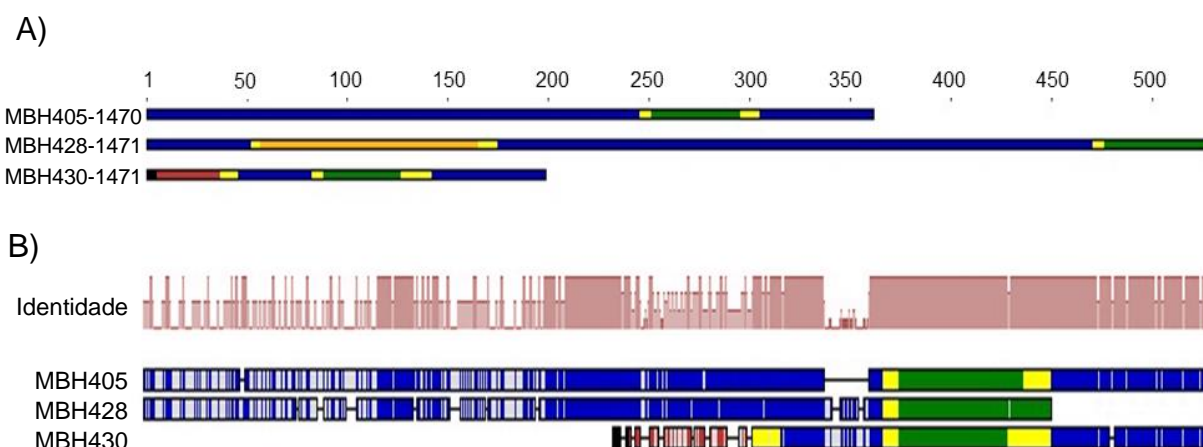
**Figura 17 - Análise conformacional da região de integração do kDNA no locus AC129028.3 do cromossomo 12. A)** Gráfico BEND.it com a curvatura resultante da análise *in silico* do clone MBH381 do paciente 1461 (parental). O quadrado tracejado indica a região do kDNA que possivelmente foi deletada no clone MBH430 do paciente 1471 (filha). **B)** Gráfico da curvatura resultante da análise *in silico* do clone MBH430 do paciente 1471 (filha). Nos dois gráficos, os picos em vermelho representam os potenciais de curvatura da estrutura do DNA e os picos em verde representam a constituição G/C da sequência. A composição de cada clone está representada abaixo do gráfico (verde, região do cromossomo 12; azul, região de kDNA; amarelo, região de microhomologia; vermelho, região do cromossomo 7).

A observação e comparação desses dois resultados sugerem que o clone MBH430 perdeu um trecho do kDNA equivalente a área tracejada destacada na Figura 17A e posteriormente, ou até simultaneamente, um evento de *hitchhiking* do cromossomo 7 ocorreu resultando na inserção de um novo DNA de origem humana nesta região do genoma do indivíduo 1471 (MBH430).

O evento de integração do kDNA no locus AC012596.4 do cromossomo 7, além de envolver o clone MBH430 também ocorreu em outros clones da Família C. Além desta quimera, o indivíduo 1471 teve um segundo clone, o MBH428, que apresentou mais uma região envolvida pelo evento de integração, um L1 presente no locus AF311103.5 do cromossomo 8. O tamanho total desse clone foi de 1059 nts (Figura 18A), composto por 245 nts de origem no cromossomo 8 (tendo dois trechos de micro-homologia compartilhados com o kDNA, um com 10 nts e outro com 19 nts), 119 nts do cromossomo 7 (sendo 12 nts compartilhados com o kDNA) e um total de 795 nts de kDNA. O clone MBH405, originário da 1470, paciente irmã da

1471, também recebeu a integração nesse mesmo *locus*. A sequência do clone MBH405 apresentou 721 nts, sendo 119 nts oriundos do cromossomo 7, envolvido por dois trechos de kDNA em suas duas extremidades (502 nts e 131 nts), apresentando duas regiões de micro-homologia, uma de 12 nts e a outra de 19 nts (Figura 18A).

O alinhamento dos três clones obteve similaridade de 79,4% com a região a montante do *locus* do cromossomo 7, apresentando grande variação em relação ao pareamento das bases e ausência de similaridade significativa entre os trechos de kDNA, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 18B. A região mais discordante entre as duas sequências é exatamente a que se encontra o *locus* do cromossomo 12 do clone MBH430 (Figura 18B). Esse evento demonstra mais uma vez a herança da integração de sequências de minicírculos de kDNA em descendentes de chagásico, já que nenhum desses progênies apresentou nDNA do *T. cruzi* na análise molecular por PCR.



**Figura 18 – Alinhamento dos clones da Família C com integração do kDNA envolvendo o *locus* AC012596.4 do cromossomo 7. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Resultado do alinhamento entre os três clones. Acima, gráfico da Identidade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. As imagens representam apenas as regiões de tamanho igual entre os clones. Em verde, região de DNA humano do *locus* AC012596.4 do cromossomo 7; em azul, região do kDNA; e, em amarelo, os trechos de micro-homologia. No clone MBH428 a região em laranja representa o *locus* AF311103.5 localizado no cromossomo 8. No clone MBH430 a região em vermelho representa o *locus* AC129028.3 do cromossomo 12.

A Família D teve todos os sete indivíduos estudados, e apresentaram integração do kDNA totalizando 38 quimeras. Após o alinhamento das sequências com aquelas de bancos de dados foram indentificadas mutações em 13 cromossomos, distribuídos em 17 *loci* diferentes. Nos clones analisados foram

encontradas 53 regiões flanqueadoras à integração do kDNA e, assim como nas outras famílias, a presença de L1 foi verificada na maioria desses eventos, confirmando a preferência da integração do kDNA por esses elementos transponíveis. O *locus* AL732374.14 do cromossomo X, na região que abriga um retrotransposon L1, também se apresentou como o mais representativo nesta família. Este *locus* foi encontrado flanqueando o kDNA em diversos clones, e verificou-se que em vários casos estava ao lado de outro *locus* em outro cromossomo, sugerindo evento de recombinação ou *hitchhiking* entre eles. Nesta família foram contabilizados 10 eventos de integração envolvendo dois *loci* de cromossomos diferentes sendo que nove desses eventos envolveram o *locus* AL732374.14 do cromossomo X. Um dos clones que apresentou esse evento está ilustrado na Figura 19.

**A**

S67R

```

1      GAACCCCCCT CCCAAAACCC ACCCCATTTT CGGGCATATA ATGTACGGGT GAGATGCATG
61     AATTTCCACC CCAAAAGTTG ACCTCAACCC CGACACTCTC CGGTCTACAG CTCCCATCTC
121    CTTATATTAC ACCAACCCCA ATCGAACCCC ACCTCCCGTA ACACACCCCA TTTTCGGGCA
181    TATAATGTAC GGGTGAGATG CAAGAATTTT CACCCAAAA GTTGACCCCA ACCCCGACAC
241    TCCCCGGTCT ACAGCTCCAT CTCCTTATAT TACACCAA CC CCAATCGAAC CACCATTCAG
301    GAGTTTATCT TCTCCGCTTT CCCTTATTC TGCTTTAGTC TTGGGAAGGT GCATGTGTAT
361    CAGAGCCTGT TATTGGTCTA TTCAGAGACT CAACTTCCTC CTGGTTTAGT CTTGGGA

```

L1-2

**B**

Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X, complete sequence  
Sequence ID: [emb|AL732374.14|](#) Length: 224187 Number of Matches: 8

Expect	Identities
1e-29	88/95(93%)

Homo sapiens olfactory receptor, family 6, subfamily K, member 2, mRNA (cDNA clone MGC:168639 IMAGE:9021016), complete cds

Sequence ID: [gb|BC137023.1|](#) Length: 1159 Number of Matches: 1

Expect	Identities
1e-18	62/64(97%)

T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone cl2 cst 2

Sequence ID: [gb|M19179.1|TRBKPMC|](#) Length: 164 Number of Matches: 3

Expect	Identities
9e-26	90/103(87%)

**C**

Name	From	To	Name	From	To	Dir	Sim	Pos/Mn:Ts	Score
<a href="#">27930.tmp/data.ori</a>	323	358	<a href="#">L1-2_Cja</a>	3732	3767	c	0.9167	1.5000	285

Name	From	To	Name	From	To	Dir	Sim	Pos/Mn:Ts	Score
<a href="#">27930.tmp/data.ori</a>	360	417	<a href="#">LiHS</a>	3300	3357	c	0.9655	1.0000	512

**Figura 19 – Sequência quimera com integração de minicírculo de kDNA envolvendo os loci AL732374.14 do cromossomo X e BC137023.1 do cromossomo 1.** **A)** Clone MBH320 da paciente 2015 da família D com 417 nts. Sublinhados e identificados nas extremidades estão os aneladores utilizados no último ciclo da *tp*TAIL-PCR. Em verde, região do cromossomo X; em vermelho, região do gene RO<sub>1-17</sub> no cromossomo 1; em azul, kDNA; e, em amarelo, regiões de micro-homologia. Sublinhado em vermelho estão as regiões referentes a elementos L1. **B)** Análise BLASTn (GenBank/NCBI) destacando os valores de similaridade para cada um dos trechos do DNA. **C)** Resultado CENSOR-GIRI demonstrando a presença de elementos L1 no cromossomo X.

A análise da possível fixação da integração do kDNA no genoma desta família foi verificada em eventos que ocorreram em pessoas com a mutação do kDNA envolvendo *loci* situados nos cromossomos 12, 6, 1 e X.

A integração envolvendo o *locus* NG\_031854.1 do cromossomo 12 esteve presente no clone MBH287 do indivíduo 1958 e em sua filha 1930, no clone MBH263 (Figura 20). A inserção do kDNA nos dois clones foi identificada no mesmo ponto, tendo o minicírculo se inserido no nucleotídeo 32.522. A integração ocorreu

no sítio de um receptor de glutamato, entretanto, a região específica envolvida na inserção não foi identificada.

**A**

**S67R**

1	<u>GAACCC</u> CCCT	<u>CCC</u> AAAACCA	TAATGTACGG	GTGAGATGCA	TGAGTTTCCA	CCCCAAAAGC
61	TGACCTCGAC	CCCGACACTC	TCCGGTCTAC	AGCTCCCATC	TCCTTATAT	ACACCAACCC
121	CAATCGAACC	CTACCTCCCG	TAACACACCC	CATTTTCGGG	CAAATAATGT	ACGGGTGAGA
181	TGCATGAATT	TCCACCCCAA	AGGTTGACCT	CAACCCCGAC	ACTCTCCGGT	GTACAGCTCC
241	CATCTCCTAT	ATGACACCAA	CCTCAATGGA	ACCCACCTC	CCGTAACACA	CCCCATTTTC
301	GGGCATATAA	TGTACGGGGG	AGATGCATGA	ATTTCCACGC	CAAAAGTTGA	CCTCAACCCC
361	GACACCCCTC	GGTCTACAGC	TCCCATCTCC	TTATATTACA	CCAACCCCAA	<u>TCGAACCTCT</u>
421	<u>CCTCCTGTGT</u>	<u>TTCCTCTCTC</u>	<u>CTTCCTGCAT</u>	<u>TCCTCCGGTG</u>	<u>TACAGCTCCC</u>	<u>ATCTCCTTAT</u>
481	ATTACACCAA	CCCCAATCGA	ACCCTACCTC	CCGTAACACA	CCCCATTTTC	GGGCATATAA
541	TGTATGGGTG	AGATGCATGA	ATTTCCACCC	CAAAAGTTGA	CCTCAACCCC	GACACCCCTC
601	GGTGTACAGC	TCCCATCTCC	TTATATGACA	CCAACCTCAA	TGGAACCCCA	CCTCCCGTAA
661	CACACCCAT	TTCCGGGCAT	ATAATGTACG	GGGGAGATGC	AAGAATTTCC	ACCCCAAAGG
721	TTGACCTCAA	CCCCGACACC	CTCCGGTCTA	CAGCTCCCAT	CTCCTTATAT	TACACCAACC
781	CCAATCGAAC	CTCTCCTCCT	GTGTTTCCT			

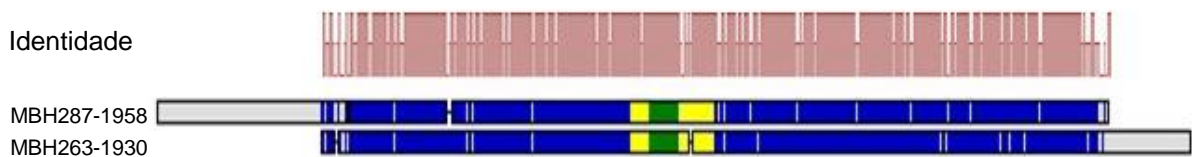
**B**

**S67R**

1	<u>GAACCC</u> CCCT	<u>CTCC</u> CAAAAC	CATAAAGTAC	GGGTGAGAAG	CATGAATTTCC	CACGCCAAAA
61	GTTGACTCAA	CCCCGACACT	CTCCGGTGTA	CAGCTCCCAT	CTCTTTATAT	TACACCAACC
121	CCAATCGAAC	CCTACCTCCC	GTAACACACC	CTATTTCCGG	GCATATAATG	TACGGGTGAG
181	ATGCATGAGT	TTCCACCCCA	AAAGTTGACC	TCAACCCCGA	CACCCTCCGG	TGTACAGCTC
241	CCGTCTCCTT	ATATTACACC	AACCCCAATG	<u>GAACCTCTCC</u>	<u>TCCTGTGTTT</u>	<u>CCTCTCTCCT</u>
301	<u>TCCGACACTC</u>	<u>TCCGGTGTAC</u>	<u>AGCTCCCATC</u>	<u>TCCTATATGA</u>	CACCAACCTC	AATGGAACCC
361	CACCTCCTGT	AACACACCCC	ATTTTCGGGC	ATATAATGTA	CGGGGGAGAT	GCATGGATTT
421	CCACCCCAAA	AGTTGACCTC	AACCCCGACA	CTCTCCGGTG	TACAGCTCCC	ATCTCCTTAT
481	ATTACACCAA	CCCCAATCGA	ACCCACCTC	CCGTAACACA	CCCCATTTT	GGGCAGATAA
541	TGTACGGGTG	AGATGCATGA	ATTTCCACCC	CAAAAGTTGA	CCCCAACCCC	GACACTCTCC
601	GGTCTACGGC	TCCCATCTCC	TTATATTACA	CCAACCCCAA	TCGGACCCCA	CCTCCCGTAA
661	CACACCCCAT	TTTCGGGCAT	ATAATGTACG	GGGGAGATGC	ATGAATTTCC	ACCCAAAAGT
721	<u>TGACCTCAAC</u>	<u>CCC</u> GAC				

**S67R**

**C**



**Figura 20 – Sequências dos clones da Família D com integração de minicírculo de kDNA no locus NG\_031854.1 do cromossomo 12. A) Clone MBH287 do paciente 1958. B) Clone MBH263 da paciente 1930. C) Resultado do alinhamento entre os dois clones. Acima, gráfico da identidade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. Em verde, região de DNA humano do locus NG\_031854.1 do cromossomo 12; em azul, kDNA; e, em amarelo, trechos de micro-homologia. Sublinhados e identificados nas extremidades das sequências estão os iniciadores utilizados no terceiro ciclo da *tpTAIL* PCR.**

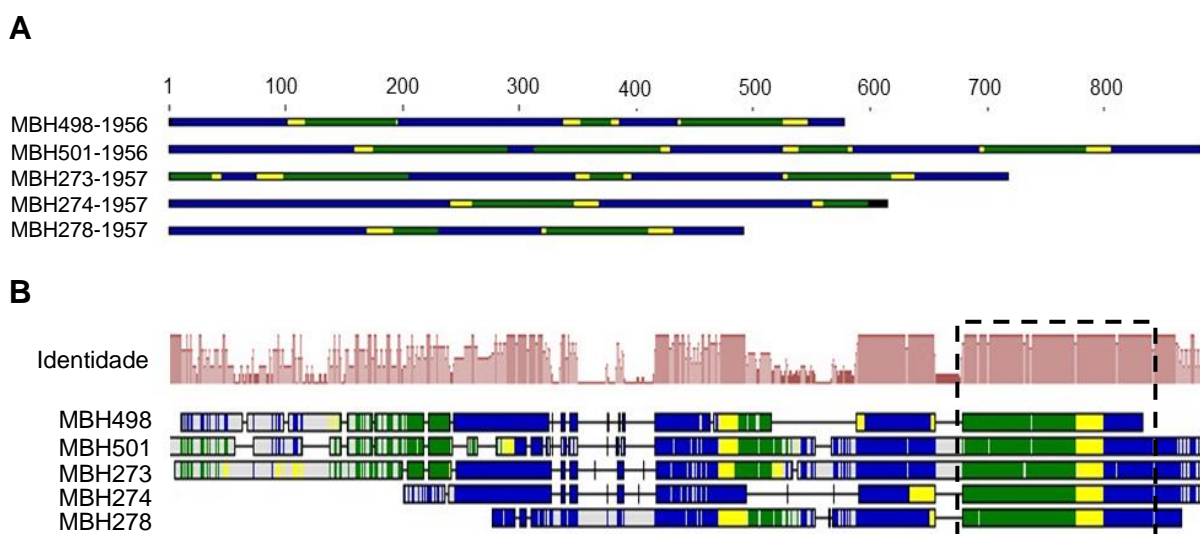
O MBH287 com 809 nts tinha o DNA humano abrangendo 68 nts, e o clone MBH263 com 736 nts tinha o fragmento de DNA humano com 67 nts. Nesses

clones é possível observar flanqueamentos de minicírculos kDNA a montante e a jusante do DNA humano. Tal evento pode, possivelmente, ter ocorrido inicialmente no DNA do paciente 1958 mediante integrações independentes de minicírculos ou, talvez, mediante recombinação do kDNA que gerou o flanqueamento nas extremidades do DNA humano. Com a ocorrência da transferência vertical, o clone MBH263 apresentou-se dessa mesma maneira em decorrência da herança paterna do kDNA que o indivíduo 1930 recebeu.

Com o alinhamento de ambos os clones percebeu-se que o MBH287 apresentava uma fração maior de kDNA à montante da região de DNA humano, e o clone MBH263 a jusante (Figura 20C). A identidade do alinhamento das duas sequências foi de 92,2 %, apresentando diferenças em nucleotídeos pontuais (região em branco) entre as regiões das duas sequências alinhadas (regiões em branco), retirando o excesso das extremidades de cada clone (Figura 20C).

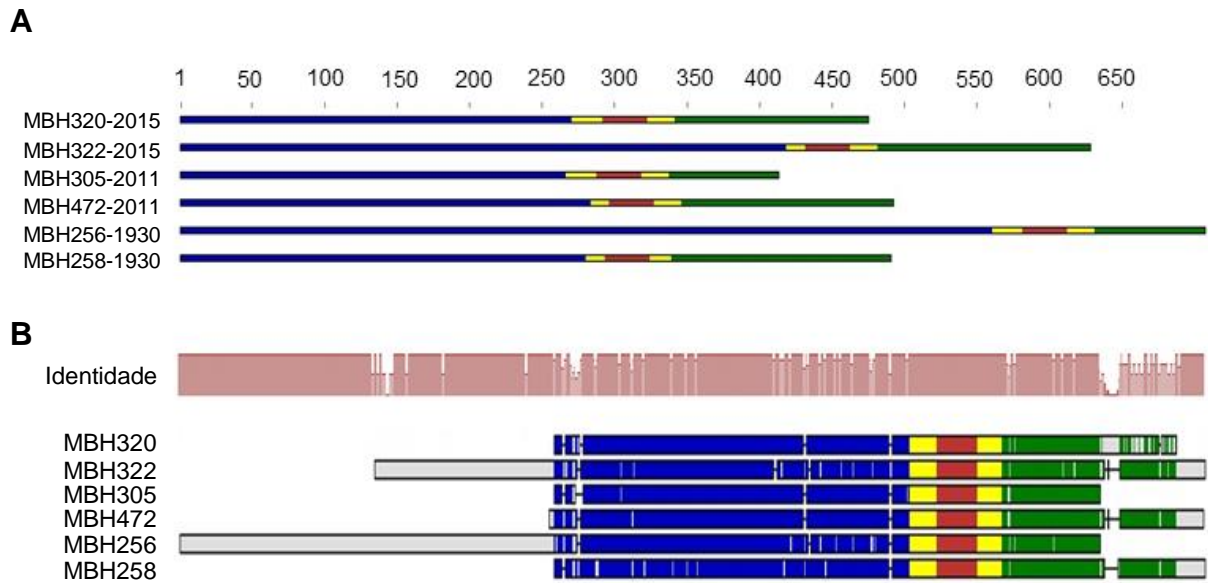
Outro caso de clones com integração de kDNA envolvendo o mesmo *locus* ocorreu no sítio NG\_023443.1 do cromossomo 6. Este caso foi semelhante ao observado no *locus* AC012596.4 do cromossomo 7 na Família C (Figura 18), em que foram obtidos mais de um clone por indivíduo. O paciente 1956 apresentou dois clones, MBH498 e MBH501, e seu irmão 1957 apresentou três sequências, MBH273, MBH274 e MBH278. Todas as cinco sequências apresentaram mais de um trecho do DNA humano deste mesmo *locus* (Figura 21A). A Figura 21B mostra a região de alinhamento de fragmentos comuns aos clones maiores. O alinhamento das cinco quimeras apresentou baixa similaridade de 67,2%, e apenas uma pequena região de DNA humano/micro-homologia/kDNA teve similaridade significativa (Figura 21B, quadrado tracejado).

Vale lembrar que no início das análises de todos os clones deste trabalho as sequências redundantes foram retiradas do montante final contabilizado. Com isto, cada um dos clones aqui apresentados, mesmo sendo do mesmo indivíduo, difere um do outro significativamente.



**Figura 21 - Alinhamento dos clones da Família D que apresentaram integração de kDNA no locus NG\_023443.1 do cromossomo 6. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. Os clones MBH498 e 501 pertencem ao caso 1956, e os MBH273, MBH274 e MBH278 ao 1957. **B)** Alinhamento entre os cinco clones. Acima, gráfico da Identidade do alinhamento; Abaixo: pareamento dos clones. As imagens representam apenas as regiões de tamanho mais aproximado entre os clones. Quadrado tracejado – destaque do trecho alinhado que apresentou região bastante conservada entre os clones (similaridade = 97,8%). Em verde, região de DNA humano do locus NG\_023443.1; em azul, kDNA; e, em amarelo, micro-homologias.

Outro evento observado na Família D foi a integração de kDNA envolvendo dois *loci* de cromossomos diferentes, e que apareceram em três indivíduos. Os casos 1930, 2011 e 2015 apresentaram sequências envolvendo um L1 localizado no locus AL732374.14 do cromossomo X e o gene RO<sub>1-17</sub> do locus BC137023.1 do cromossomo 1. Cada um desses indivíduos apresentaram dois clones, o MBH320 e o MBH322 provenientes do 2015; o MBH305 e o MBH472 originados do indivíduo 2011; e, o MBH256 e o MBH258 oriundos do caso 1930 (Figura 22A). O clone MBH320 da parental 2015 está representado na Figura 19. O alinhamento desses clones revelou similaridade significativa (94,3%) do DNA humano do cromossomo 1 e do cromossomo X, mas os fragmentos de minicírculos do kDNA, ainda que truncados e rearranjados, revelaram similaridade significativa (Figura 22B). Os valores de *E-value* e similaridade dos trechos de cada clone pode ser verificado na Tabela A1 no Anexo 1.



**Figura 22 – Alinhamento dos clones da Família D que apresentaram integração de kDNA nos loci AL732374.14 e BC137023.1, do cromossomo X e 1, respectivamente. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Alinhamento entre os seis clones. Acima, gráfico da similaridade entre as sequências alinhadas; Abaixo, pareamento dos clones. Em verde, região de DNA humano do locus AL732374.14; em vermelho, região do gene RO<sub>1-17</sub> do cromossomo 1; em azul, região do kDNA; e, em amarelo, micro-homologias.

### 2.3 Integrações de minicírculos de kDNA em elemento LINE-1 do locus preferencial de integração AL732374.14 do cromossomo X

Os resultados das análises obtidas neste trabalho demonstraram a alta frequência de integração dos minicírculos de kDNA no sítio AL732374.14 do cromossomo X fazendo deste locus uma região preferencial de integração nas quatro famílias estudadas. De todos os 157 clones apresentados na Tabela A1 do Anexo 1 é possível perceber que integrações envolvendo o locus AL732374.14 estão presentes em 30,6 % dos clones. Em decorrência da preferência de integração por este sítio e pela peculiaridade apresentada em quimeras com kDNA associado a diferentes trechos deste locus, os resultados que apresentaram essa região flanqueando o minicírculo foram analisados separadamente. Do total de clones analisados, onze apresentaram eventos de integração que envolviam, além deste sítio no cromossomo X, um segundo locus em outro cromossomo. Sete desses clones apresentaram o mesmo locus do cromossomo 1 envolvido na



integração, entretanto, dois eventos em *locus* diferentes ocorreram no cromossomo 8 (MBH84 e MBH324) e outros dois no cromossomo 16 (MBH87 e MBH531).

Sumariando, as análises dessas quimeras revelaram integrações dos minicírculos no *locus* AL732374.14 em 12 pontos de inserção diferentes, sendo que a inserção mais frequente ocorreu no nucleotídeo 77.363. Esta informação já havia sido descrita por Hecht e cols (2010), mas que encontrou apenas 7 sítios de entrada do kDNA neste *locus*.

Na Figura 23A é possível observar o embaralhamento de vários trechos de kDNA flanqueados por trechos de DNA humano originários do *locus* AL732374.14. Os índices de similaridade de cada um dos segmentos está discriminados na Figura 23B e nota-se que são valores significativos. O trecho de DNA humano que vai da base 1 a 45 teve a entrada do kDNA no ponto 35.618, já as outras regiões apresentaram a inserção no ponto 77.363. A análise deste clone ilustra o teor de embaralhamento das regiões do *locus* do cromossomo X e do kDNA. Conforme ilustrado na Figura 23C, a análise *in silico* utilizando a ferramenta BEND.it revelou alças (linha vermelha) nas regiões equivalentes ao kDNA. Essa observação sugere que a configuração estrutural das regiões do DNA exógeno, apresentando dobras do DNA, comprometeria a estabilidade da sequência nessas regiões, que se tornariam pontos frágeis susceptíveis a recombinação e embaralhamento. A presença de trechos de DNA com curvaturas parece contribuir para o aumento da instabilidade genômica dessa região, possivelmente tornando essa parte do DNA do hospedeiro mais propício a eventos de recombinação.

**A**

L1-2

```

1      TCCCAAGACT AAACCAGGAG GAAGTTGAAT CCCTGAATAC ACCAAACCCA ATGGAACCAC
61     ACCTCCGTAA ACACACCCCG ATTTTGGGCA ATATAATGTA CGGGTGAGAT GCATGATTTT
121    TCGGGCCCAA ATTGGAACGC CCTTCCAAG ACTAACAGG AAGAAGTTTA ATCTCTGAAT
181    AGACCAATAA CAGGCTCTGA TACACATATA GCCTCCAAG ATTAAACCAG GAAGAAGTTT
241    AATCTCTGAA TACACCAACC CCAATGGAAC CCCACCTCCC GTAAACAACC CTCATTTTTCG
301    GCAGTATAAT GTACGGGGGA GATGCATGAT GTACGGAGGA GGTGTATAAT GTACGGGGGA
361    GATGCATGAT TTTTCGGCCA TAAATTTGAG GCCTTCCA AGACTAAACC AGGAAGAAGT
421    TTAATCTCTG AATACACCAA CCCCAATGGA ACCCCACCTC CCGTAAACAA CCCTCATTTT
481    CGGCAGTATA ATGTACGGGG GAGATGCATG ATGTACGGAG GAGATGTATA ATGTACGGGG
541    GAGATGCATG ATTTTTCGGC CATAAATTTG AGGCCTTCC CAAGACTAAA CCAGGAGGAA
601    GTTGAGTCTC TGAATAGACC AATAACAGGC TCTGATACAC ATACACCAAC CCCAATCGAA
661    CC

```

S36

**B**

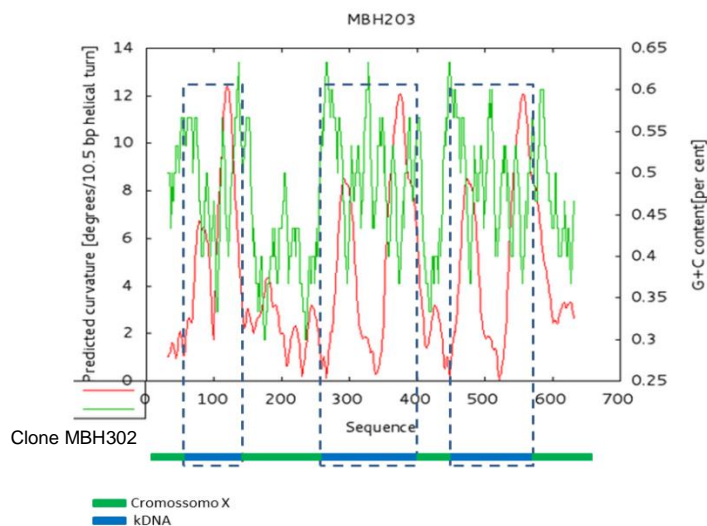
Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X, complete sequence  
Sequence ID: [emb|AL732374.14|](#) Length: 224187 Number of Matches: 22

<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
1e-06	41/45(91%)
<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
4e-37	108/118(92%)
<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
2e-09	45/48(94%)
<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
6e-23	70/73(96%)

T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4

Sequence ID: [gb|M19188.1|TRBKPMCO](#) Length: 165 Number of Matches: 5

<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
2e-35	109/120(91%)
<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
5e-24	75/80(94%)
<b>Expect</b>	<b>Identities</b>
5e-24	75/80(94%)

**C**

**Figura 23 – Sequência quimera de evento integração de minicirculo de kDNA no locus AL732374.14 do cromossomo X e embaralhamento da quimera. A)** Clone MBH203 da paciente 1420 da Família A com 647 nts. Sublinhados e identificados nas extremidades estão os iniciadores utilizados no último ciclo da *tp*TAIL-PCR. Em verde, regiões do cromossomo X; em azul, kDNA; e, em amarelo, regiões de micro-homologia. **B)** Análise BLASTn (GenBank/NCBI) destacando as similaridades para cada um dos trechos do DNA quimera. **C)** Gráfico BEND.it resultante da análise *in silico* do clone MBH203. Os picos em vermelho representam os potenciais de curvatura de estrutura do DNA e os picos em verde representam a constituição G/C da sequência. A composição do clone está representada abaixo do gráfico e os retângulos tracejados destacam, simultaneamente, as regiões de kDNA na sequência e no gráfico.

Eventos, como o ilustrado na Figura 23, ocorreram com frequência entre os clones que apresentaram kDNA neste sítio, e, desta forma, o pareamento das sequências entre os respectivos familiares teve, como consequência do embaralhamento, um baixo valor de similaridade não só nas regiões de kDNA como também nas regiões do DNA humano, como demonstrado nos gráficos e alinhamentos dispostos para cada família na Figura 24.

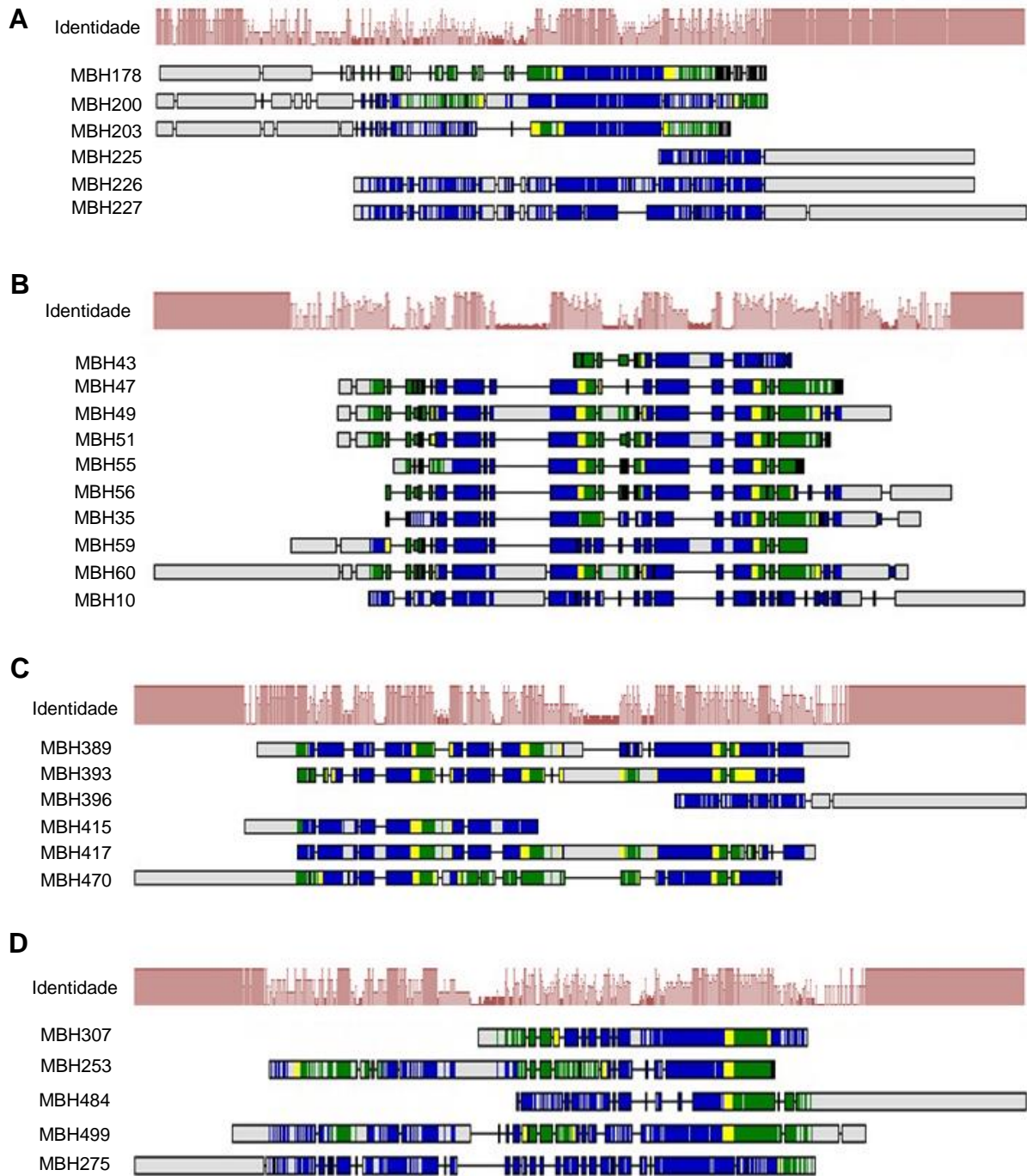
Na Família A foram contabilizadas seis sequências contendo integração do kDNA flanqueada apenas por L1 do *locus* AL732374.14. O clone MBH178 pertence a parental 1406, e os outros clones MBH200, MBH203, MBH225, MBH226 e MBH227 pertencem a 1420. O alinhamento das sequências gerou um valor de identidade igual a 54,1% apresentando muitas variações no pareamento das sequências (Figura 24A).

A integração de kDNA envolvendo especificamente o *locus* do cromossomo X foi observada em 16 clones da Família B. O indivíduo parental da primeira geração apresentou seis clones, o MBH43, MBN47, MBH49, MBH51, MBH55 e o MBH56. O caso 1386 obteve apenas um clone, o MBH35, assim como a 1492, com o clone MBH10. Mais dois clones com integração no cromossomo X foram provenientes da 1474, o MBH59 e o MBH60. O alinhamento dessas sequências quimeras apresentou baixa similaridade de 44,7% e observando o gráfico do alinhamento é possível perceber que diversos trechos, tanto do kDNA como da região do DNA humano, não apresentaram similaridade (Figura 24B). Como o membro externo a família, o indivíduo 1487, cônjuge da 1474, também apresentou integração neste sítio, as seis sequências dele foram alinhadas com o clone MBH10, seu único descendente direto a apresentar quimera neste sítio, também apresentando baixa similaridade (65,8%).

Com a Família C o resultado não foi discordante dos anteriores. Os seis clones alinhados apresentaram variações entre o kDNA e o DNA do cromossomo X resultando em um alinhamento com similaridade de 62,9% (Figura 24C). Os clones MBH389 e o MBH393 pertencem ao parental 1461, sendo os clones MBH396, MBH415 e MBH417 originários da filha 1471 e o MBH470 da outra filha, 1460.

Assim como o ocorrido na Família B, os clones da Família D também apresentaram sequências resultantes do paciente 1958, cônjuge da paciente 2011. Desta forma, dois grupos de alinhamento foram diferenciados. O primeiro excluiu os

clones do caso 1958 e o pareamento foi feito com as sequências de 2011 e seus descendentes. O segundo, contrariamente, incluiu apenas os clones do 1958 e dos seus descendentes. O clone MBH307 do caso 2011 foi comparado com o clone da filha 1929 (MBH253), e os netos 1956 (MBH484 e MBH499) e 1957 (MBH275). O alinhamento dessas sequências gerou similaridade de até 55% (Figura 24D). Já o pareamento das sequências do 1958 e seus descendentes apresentaram um valor de similaridade de 54,1% com variação crescente nas regiões de kDNA e DNA humano.



**Figura 24 – Sequências dos indivíduos de cada família com integração de kDNA apenas no locus AL732374.14 do cromossomo X. A) Alinhamento dos clones da Família A. B) Alinhamento dos clones da Família B. C) Alinhamento dos clones da Família C. D) Alinhamento dos clones da Família D. Acima, gráfico da similaridade dos alinhamentos; Abaixo, pareamento dos clones. Em verde, região de DNA humano do locus AL732374.14; em azul, kDNA; e, em amarelo, microhomologias.**

## 2.4 Estrutura de sequências de kDNA em mutações no gene do Receptor Olfatório (RO<sub>1-17</sub>)

A utilização da técnica de *tp*TAIL-PCR permitiu mapear alguns sítios de DNA humano que flanqueavam a integração do kDNA, sendo possível aprofundar o conhecimento acerca de possíveis sítios preferências de integração dos minicírculos. Os resultados obtidos após análise bioinformática permitiram a identificação de regiões do DNA humano que poderiam propiciar um estudo mais aprofundado acerca da herança e fixação do kDNA. Apesar da grande maioria das integrações dos minicírculos ocorrerem em elementos L1 no genoma humano, a alta frequência desses sítios repetitivos no genoma dificulta um mapeamento mais aprofundado que permita o estudo da fixação da integração.

Com o intuito de facilitar a identificação de possíveis eventos de herança do kDNA fixado em um mesmo *locus* foi sugerido utilizar como alvo de investigação uma região gênica de cópia única no genoma humano. A partir da junção de resultados anteriores (Hecht e cols, 2010; Araújo, 2012; Pimentel, 2012) com os achados deste estudo, o gene do RO<sub>1-17</sub> localizado no *locus* BC137023.1 do cromossomo 1, foi escolhido como região candidata ao estudo da fixação do kDNA. Os receptores olfatórios são expressos pelos neurônios sensoriais olfatórios do nariz e apresentam sete domínios transmembrana acoplados a proteína G (Malnic e cols, 2004). Os genes do RO envolvidos nas integrações de kDNA observadas neste trabalho foram identificados pelo GenBank/NCBI como membro 2 pertencente a Subfamília K da Família 6 dos RO. Segundo o banco de dados do NCBI, além de ser conhecido por RO<sub>1-17</sub>, o símbolo oficial dele é OR6K2.

Para obter especificidade nas amplificações das regiões de integração do kDNA no gene do RO<sub>1-17</sub> foi necessário obter oligonucleotídeos iniciadores que permitiam a amplificação dessa região do genoma humano. Os aneladores empregados neste trabalho estão descritos na Tabela 2, e foram utilizados na técnica *tp*TAIL-PCR em substituição aos iniciadores específicos para L1 humano.

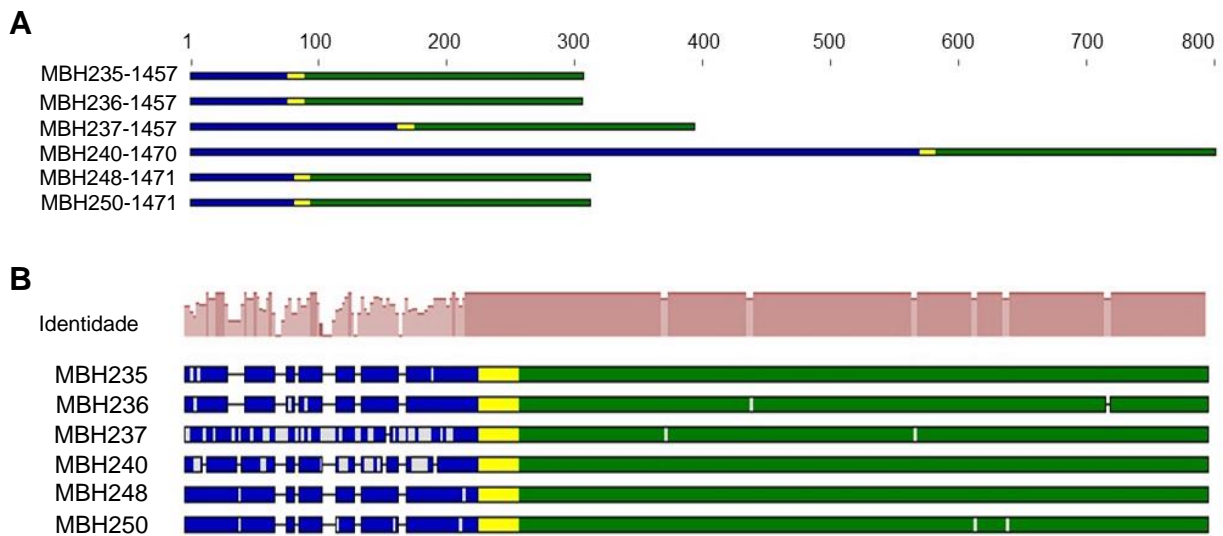
A *tp*TAIL-PCR específica para o gene RO<sub>1-17</sub> foi feita somente em 10 indivíduos somados da Família C (1457, 1470 e 1471) e da Família D (todos). A seleção de Família C para essa análise se deu em decorrência do estudo anterior de Hecht e cols (2010) ter observado clones com integração neste *locus* em integrantes

desta família. A escolha pela Família D se deu em detrimento da identificação de clones quimeras com integração neste gene obtidos na *tpTAIL*-PCR convencional deste presente estudo.

Ao final da técnica de *tpTAIL*-PCR com os aneladores específicos foram enviados para sequenciamento um total de 61 clones. Após a primeira etapa de análise das sequências, 15 clones foram descartados em decorrência da baixa qualidade no sequenciamento. Entre os 46 clones válidos contabilizou-se um somente com kDNA, dois apenas com DNA humano e 43 compostos de kDNA- DNA humano. Com este resultado o rendimento da *tpTAIL* específica foi de 93,5%. A retirada dos clones redundantes gerou um total de 37 sequências quimeras que estão descritas na Tabela A2 do Anexo 2. O tamanho médio desses clones foi de  $603 \pm 221$  nts com o maior clone apresentando 1351 nts. O tamanho médio das regiões de kDNA foi de  $224 \pm 136$  nts. Regiões de micro-homologia foram observadas entre o kDNA e a região do gene  $RO_{1-17}$ , entre o cromossomo X e o kDNA e também entre o gene e o X. O tamanho médio das micro-homologias foi de  $11 \pm 4$  nts.

As análises dos integrantes da família C resultaram em 6 clones distribuídos entre mãe (1457) e filhas (1470 e 1471) onde todos os clones apresentaram integração do kDNA no *locus* BC137023.1, conforme o esperado. Os clones MBH235, MBH236 e MBH237 foram obtidos da genitora 1457, a filha 1470 apresentou apenas um clone (MBH240), e a outra filha, 1471, obteve dois clones (MBH248 e MBH250) (Figura 25A). Os índices de similaridade de cada um dos clones foram bastante significativos (*E-value* de  $2e^{-113}$  a  $1e^{-109}$  e similaridades de 99 a 100% para o DNA humano, e de  $3e^{-41}$  a  $9e^{-30}$  e 91 a 96% para as regiões conservadas do kDNA).

O alinhamento dos seis clones apresentou identidade de 86,4%, sendo possível observar no gráfico uma constância entre as regiões referentes ao DNA do gene e as micro-homologia, destacando a variação entre o kDNA das sequências quimeras (Figura 25B). Entre os clones da genitora MBH235 e os clones da filha 1471, MBH248 e MBH250, houve uma identidade de 97% entre as sequências sugerindo que nesta descendente ocorreu fixação do kDNA em um dos eventos de integração identificado na mãe.



**Figura 25 - Sequências dos integrantes da Família C resultantes da *tpTAIL*-PCR específica para o gene do RO<sub>1-17</sub>. A)** Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. **B)** Resultado do alinhamento entre os seis clones. Acima, gráfico da similaridade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. Em verde, região de DNA humano do gene RO<sub>1-17</sub>; em azul, kDNA; e, em amarelo, micro-homologias.

Os resultados dos clones da *tpTAIL*-PCR específica para o RO<sub>1-17</sub> feita para a Família D apresentou dois grupos distintos de clones quanto ao padrão de integração. Em um dos grupos foram obtidos 13 clones com kDNA integrado na região do *locus* do receptor olfatório estudado, entretanto, no outro grupo de clones verificou-se, além do *locus* do cromossomo 1, um segundo sítio envolvido no mesmo evento de integração, o *locus* AL732374.14 do cromossomo X, totalizando 16 clones com os dois sítios associados. O mesmo padrão de integração envolvendo esses dois *loci* foi observado e descrito anteriormente em *tpTAIL*-PCR com os iniciadores específicos para L1.

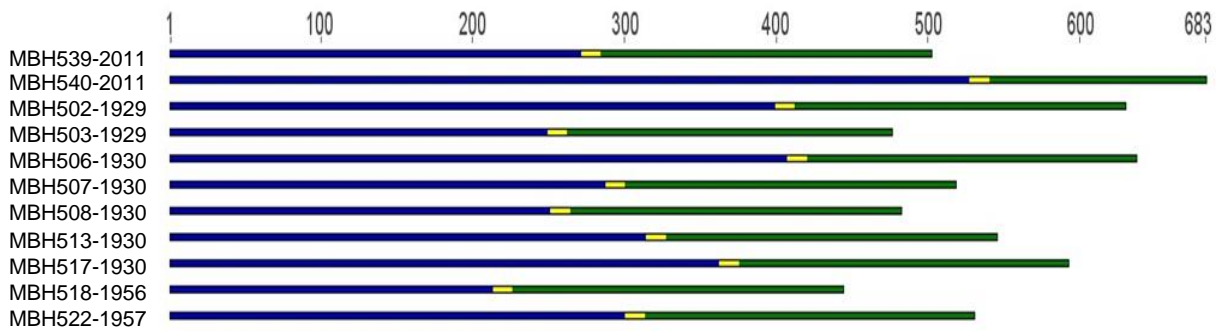
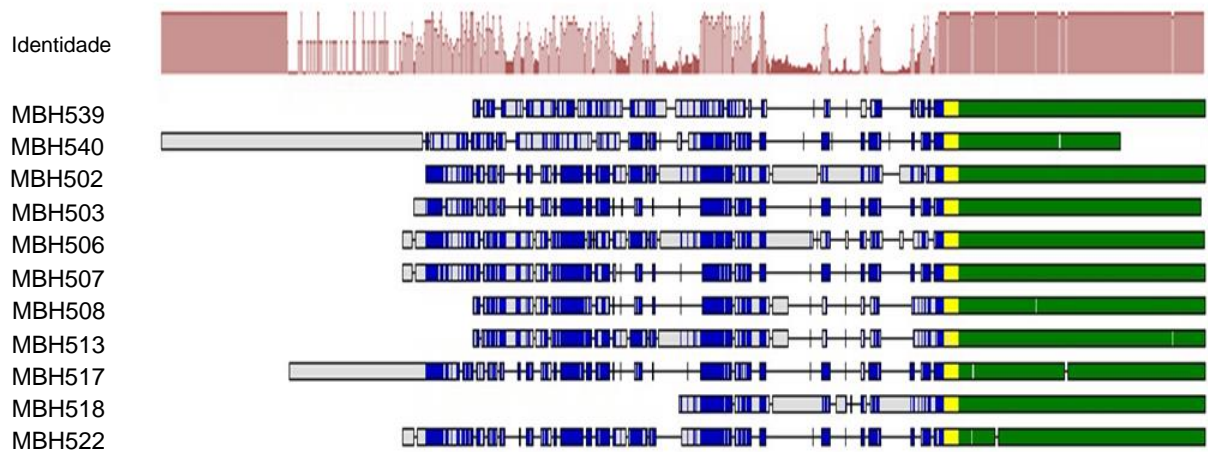
A Figura 26 mostra o alinhamento de 11 sequências quimeras resultantes da *tpTAIL*-PCR específica que tiveram integração do kDNA envolvendo somente o cromossomo 1. Os clones MBH539 e MBH540 são do caso 2011, os MBH502 e MBH503 são da 1929. A paciente 1930 apresentou cinco clones, MBH506, MBH507, MBH508, MBH513 e MBH517. Os dois integrantes da quarta geração da família apresentaram um clone cada, o MBH518 proveniente do 1956 e o MBH522 do 1957. A estrutura de cada uma das sequências, kDNA/micro-homologia/DNA humano, está demonstrada na Figura 26A.



O alinhamento destas sequências mostrou a região do *locus* bastante conservada, como pode ser observado no gráfico de identidade da Figura 26B, com a região do kDNA apresentando bastante variação. A identidade igual a 44,6% refletiu a baixa similaridade entre os trechos de kDNA das sequências.

Em decorrência da presença de integrações, também neste sítio, no cônjuge 1958, as duas sequências dele não fizeram parte do alinhamento apresentado na Figura 26, contudo, outro pareamento foi feito para os clones deste indivíduo e dos seus descendentes diretos que apresentaram integração no mesmo *locus*. Esse segundo pareamento apresentou resultado semelhante ao anterior, com similaridade de 54,6%.

O alinhamento das sequências quimeras que apresentaram o envolvimento do L1 do *locus* AL732374.14 do cromossomo X também foram realizadas em dois momentos, pois o 1958 também apresentou clones com esse padrão de integração. A similaridade do pareamento das sequências dos familiares 2015, 2011, 1930, 1956 e 1957 foi de 46,6%. Esse alinhamento apresentou a região do gene RO<sub>1-17</sub> bastante conservada entre os familiares, entretanto, tanto os trechos de kDNA, como as regiões do L1 do cromossomo X apresentaram alta variedade entre uma sequência e a outra. O alinhamento envolvendo as sequências do indivíduo 1958 e seus descendentes 1930, 1956 e 1957 apresentaram um valor ainda menor de identidade, 38%.

**A****B**

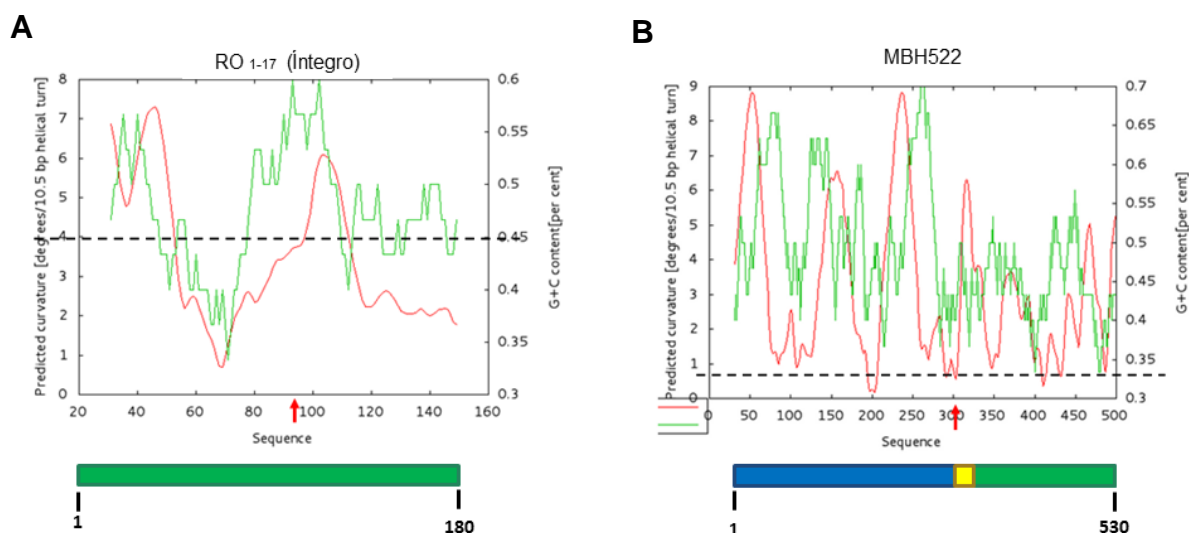
**Figura 26 – Sequências dos integrantes da Família D resultantes da *tp*TAIL PCR específica para o gene do RO<sub>1-17</sub>. A) Esquema do padrão de constituição de cada uma das quimeras. B) Alinhamento entre os onze clones. Acima, gráfico da identidade do alinhamento; Abaixo, pareamento dos clones. Em verde, região de DNA humano do gene RO<sub>1-17</sub>; em azul, kDNA; e, em amarelo, micro-homologias.**

Apesar das regiões do gene do RO<sub>1-17</sub> estarem sempre bastante conservadas nos alinhamentos entre os integrantes de cada família, os trechos de kDNA envolvidos nos eventos são diferentes. Dessa forma é possível perceber que os clones resultantes da *tp*TAIL-PCR específica apresentaram um padrão de constituição “DNA humano com alta homologia + kDNA sem homologia apreciável” conforme observado na maioria dos alinhamentos demonstrados nas sequências obtidas pela *tp*TAIL convencional.

Ao final da análise de todos os clones com integração no gene do RO<sub>1-17</sub> constatou-se que a região de micro-homologia foi exatamente a mesma em todos os clones quando o evento de integração envolvia o kDNA ligado diretamente ao gene.

O trecho “CCCCAATCGAACC” de 13 nts apresentou pareamento total com parte da região do CSB1 da região conservada do kDNA. Outra particularidade encontrada nesses clones foi que todas as integrações de kDNA envolvendo o *locus* BC137023.1 ocorreram sempre no mesmo nucleotídeo, base 94, do gene do receptor olfatório, independente da topologia do kDNA integrado e do clone ser proveniente de *tpTAIL*-PCR com iniciador de múltiplos anelamentos ou de anelamento específico do sítio em análise.

A análise *in silico* utilizando a ferramenta BEND.it permitiu verificar a conformação estrutural da sequência íntegra da região do receptor olfatório sujeita a integração do kDNA e como resultado foi identificada a presença de uma curvatura no DNA exatamente a partir do trecho que envolve o nucleotídeo 94 (Figura 27A). Ao analisar *in silico* a consequência da inserção do kDNA no ponto da base 94 notou-se uma redução acentuada da curvatura do DNA nesta região (Figura 27B). Sequências de diferentes indivíduos e com kDNA de topologias distintas foram selecionadas aleatoriamente para observar se padrão de redução da curvatura original se mantinha e foi observado o mesmo resultado em todos os clones analisados. É possível, então, que a integração do kDNA neste exato ponto do gene do RO<sub>1-17</sub> resulte em um aumento na estabilidade da molécula de DNA e por isso integrações neste sítio são encontradas em uma maior frequência no genoma humano.



**Figura 27 – Análise da variação conformacional da região do locus BC137023.1 que abriga o gene do RO<sub>1-17</sub>.** **A)** Gráfico da curvatura resultante da análise *in silico* na ferramenta BEND.it na região íntegra do gene RO<sub>1-17</sub> entre os nucleotídeos 1 a 180. A seta indica o ponto do nucleotídeo 94 e a linha tracejada demarca o início da região de curvatura associada ao ponto exato do 94 nt. **B)** Gráfico da curvatura do clone MBH522 (paciente 1957). A seta indica o ponto da base 301 onde ocorreu a integração do kDNA nesta quimera e a linha tracejada demarca o início da região de curvatura associada ao ponto exato do 301 nt.

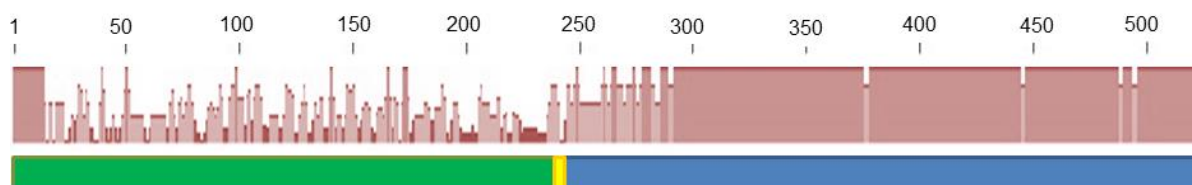
## 2.5 Tipologia específica numa série de minicírculos presentes nos evento de integração de minicírculos de kDNA no genoma humano

Além de mapear integrações de kDNA no mesmo sítio do genoma humano entre indivíduos da mesma família, outra maneira de avaliar a possível fixação deste DNA exógeno é através da manutenção de uma mesma região variável de minicírculo kDNA no genoma de uma família.

A grande maioria (~75%) dos eventos analisados nas sequências obtidas neste trabalho apresentaram apenas a região conservada do minicírculo de kDNA. Possivelmente a alta capacidade de recombinação deste DNA resulta no truncamento de trechos envolvendo, principalmente, a perda da região variável. Talvez este seja o motivo pelo qual somente foi possível encontrar a presença de 39 fragmentos de kDNA contendo a região variável. Então, os fragmentos contendo apenas a região variável do kDNA foram extraídos dos clones e alinhados entre si para estimar a diversidade de minicírculos que têm a capacidade de integrar no genoma humano.

Na Família B foi identificada uma região variável de minicírculo de kDNA comum a quatro indivíduos distintos, 1488, 1491, 1492 e 1493. Em cada um dos

indivíduos, a região flanqueadora envolvida pelo minicírculo foi identificada em cromossomos diferentes, como ilustrado no gráfico de identidade do alinhamento entre os quatro clones (Figura 28). Em familiares da Família C e da Família D fenômeno semelhante também foi identificado.



**Figura 28 - Diferenças entre as sequências flanqueadoras hospedeira e similaridade dos minicírculos de kDNA integrados no genoma de indivíduos da Família B.** Gráfico de similaridade demonstrando a manutenção da topologia do minicírculo de kDNA integrado em diferentes *loci* nos quatro indivíduos da Família B. Em verde, região de DNA humano; em azul, kDNA; e, em amarelo, região de micro-homologia .

Neste estudo, o alinhamento dos trechos das regiões variáveis resultaram em agrupamentos de sequências por similaridade, sendo possível destacar a presença de três consensos de regiões variáveis de minicírculos de kDNA (Figura 29). Além da identificação de grupos de minicírculos que possivelmente têm uma maior tendência ou aptidão para se inserir, alguns dos trechos de kDNA eram únicos e não compartilharam regiões comuns aos grupos formados pela similaridade.

Os três consensos de kDNA variável foram formados por clones resultantes, em geral, de indivíduos distintos e com sítios de integração diferentes. Todos os 39 trechos foram alinhados independente da origem familiar dos clones. O Consenso I e II apresentaram kDNAs da região variável originários de indivíduos das quatro famílias estudadas. O Consenso I apresentou um tamanho aproximado de 115nts e o Consenso II pouco menos de 300nts (Figura 29A e B, respectivamente). O terceiro conjunto de sequências que apresentou o mesmo kDNA variável foi identificado como Consenso III. O tamanho aproximado do Consenso III foi de 260nts e os nove clones que apresentaram essa sequência de kDNA em comum estão distribuídos nas famílias A, B e D (Figura 29C). As características detalhadas acerca de cada um dos clones, como família e *locus* de integração do kDNA estão discriminados na Tabela A1 do Anexo 1.

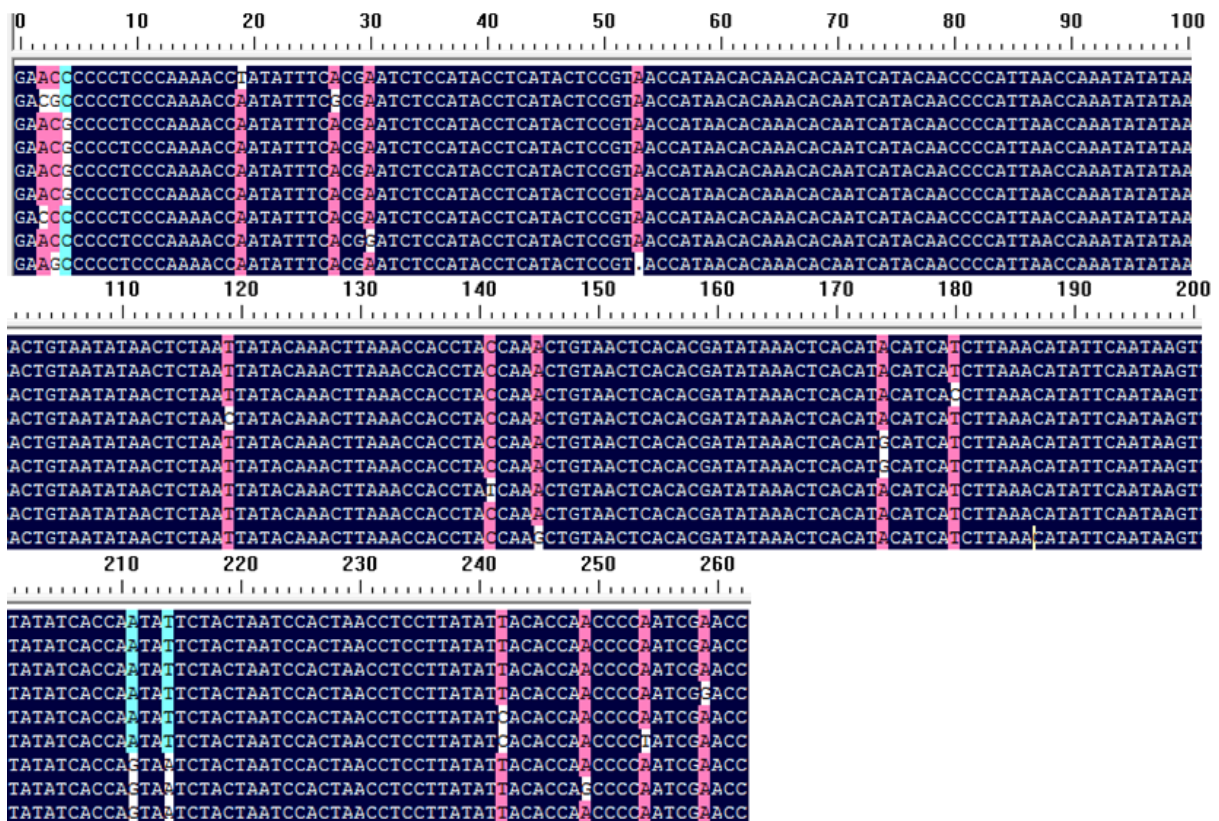
A

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
AGGATAATGTACGGGTGAGATGCATCAATTTCCGCCCAAAGTTGACTCAA.CCCCGAACTCTCCGGTTACAGCTCCCATCTCTTATATTACCCAACCCCAATGAAACC  
.ACCATAAGTACGGGTGAGATGCATCAATTTCCGCCCAAAGTTGACTCAA.CCCCGAACTCTCCGGTTACAGCTCCCATCTCTTATATTACCCAACCCCAATGAAACC  
ACCATAAGTACGGGTGAGATGCATCAATTTCCGCCCAAAGTTGACTCAA.CCCCGAACTCTCCGGTTACAGCTCCCATCTCTTATATTACCCAACCCCAATGAAACC  
.....ACACCGGTGAGATGCATCAATTTCCGCCCAAAGTTGACTCAA.CCCCGAACTCTCCGGTTACAGCTCCCATCTCTTATATTACCCAACCCCAATGAAACC

B

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
GAACGCCCTCCCAACACTGAATTTCCAGATTTCCGTATCACAATTTAACCATATAACCTACCATCAACCACCAACCAACCTAACCAACAACCTAAC  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
CAACATCTATTATAAGATAAATTATCATTAAACAATTACGAATATAATACCAACTGTATCTTACTCATATAAACCTACCTAGCATGTACGTTATCTTCA  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
210 220 230 240 250 260 270 280 290  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCC.....  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC  
TGCATACTATACACATCATTAAATCACAATACTAATATACATCCAATTTCAATA.CCCACCTCTCTATATTACACCAA.CCCCAATCGAACC

C



**Figura 29 – Regiões variáveis de minicírculos de kDNA agrupadas em consensos de acordo com a similaridade entre elas. A) Consenso I – Clones MBH21, MBH159, MBH263 e MBH531, respectivamente. B) Consenso II – MBH39, MBH215, MBH265, MBH269, 352, MBH354, MBH355, MBH356 e MBH406, respectivamente. C) Consenso III – MBH01, MBH14, MBH60, MBH73, MBH74, MBH75, MBH225, MBH227 e MBH484, respectivamente. As regiões em azul escuro mostram alinhamento total entre as regiões variáveis do kDNA de cada um dos clones.**

As regiões variáveis do minicírculo de kDNA apresentam um tamanho aproximado de 250 pb, entretanto, os consensos I e II apresentaram tamanho diferente deste padrão. Possivelmente a redução do tamanho da sequência do consenso I, assim como o aumento do consenso II podem estar associados a eventos de recombinação do kDNA, resultando em deleções ou duplicações de trechos do DNA.

## V- DISCUSSÃO

### 1. ASPECTOS GERAIS

A integração de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro humano vem sendo documentada há mais de duas décadas (Teixeira e cols, 1991; Teixeira e cols, 1994). Os achados presentes corroboram com a real existência deste evento e demonstram que a integração do kDNA no genoma humano ocorre na população e, também, nos mamíferos permissivos ao *T. cruzi*. Este estudo sugere que a transferência lateral (TL) é um fenômeno natural que pode ser documentado em qualquer indivíduo infectado pelo protozoário flagelado. O estudo foi conduzido em algumas famílias que viviam em diferentes áreas endêmicas para a doença de Chagas, mas que geraram e criaram os filhos e descendentes em Brasília e no entorno do Distrito Federal, região considerada livre da transmissão vetorial do parasito. Os testes de DNA revelaram um marcador genético específico do DNA nuclear do *T. cruzi* em cinco indivíduos, que eram portadores da infecção ativa. Ademais, os testes conduzidos com o marcador genético do minicírculo de kDNA revelaram que todos os indivíduos nas famílias do estudo tinham evidências de integração do kDNA no genoma. Este resultado revelou o aspecto universal da transferência de sequências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para *Homo sapiens*, visto que este achado foi documentado em todas as pessoas da amostragem (Figura 7).

As evidências encontradas nos testes de DNA que mostraram o fenômeno de TL do kDNA no genoma dos pacientes com infecção ativa pelo *T. cruzi* e a subsequente transferência vertical (TV) dessas mutações para as progênes foram claramente confirmadas pelos clones quimeras obtidos mediante a técnica de *tpTAIL*-PCR (Hecht e cols, 2010). Com o sequenciamento dos clones foi possível identificar a integração de kDNA em todos os pacientes e mapear alguns sítios do genoma humano nos quais ele estava inserido. O reconhecimento das regiões de origem humana e do *T. cruzi* foi feito mediante análises que renderam escores estatisticamente significativos de similaridades das sequências quimeras kDNA-DNA humano em bancos internacionais públicos de sequências genômicas



(GenBank/NCBI e CENSOR GIRI). Essas análises conferem alta confiabilidade e veracidade aos resultados obtidos neste estudo.

O presente trabalho documenta de maneira explícita a ocorrência de transferência de kDNA do *T.cruzi* para o homem e expande os conhecimentos relacionados a herança das mutações geradas pela integração de sequências de minicírculos na maioria dos cromossomos dos hospedeiros.

## **2. MAPEAMENTO DAS INTEGRAÇÕES DE MINICÍRCULOS DE kDNA DO *Trypanosoma cruzi* NO GENOMA HUMANO**

O mapeamento dos sítios do genoma humano que estavam envolvidos na integração dos minicírculos de kDNA permitiu identificar a distribuição desses eventos em quase todos os cromossomos, excetuando os autossômicos 15, 20, 22 e 23 (Figura 10B). A ausência de integração nestes cromossomos não os exclui da possibilidade de estarem envolvidos nestes eventos. Pois, a não identificação de clones contendo kDNA nos cromossomos citados pode ter ocorrido pelo atributo randômico da técnica de *tpTAIL-PCR*, ou até mesmo pela possibilidade de mobilização do kDNA desses cromossomos para outros à distância. Eventos de integração no cromossomo X foram contabilizados em 35 % dos clones, e o *locus* AL732374.14 deste cromossomo foi identificado como o mais frequentemente modificado pelas mutações de kDNA. Os resultados apresentados nos estudos de Hecht e cols (2010) e Araújo (2012) detectaram eventos de integração em cromossomos que não foram representados neste trabalho, e, também, obtiveram resultados semelhantes quanto a frequência de kDNA no *locus* AL732374.14 do cromossomo X (35 % e 36 %, respectivamente), confirmado este *locus* como o principal *hotspot* de integração do kDNA exógeno.

Em decorrência de limitações dos bancos de dados acessados neste estudo, não foi possível caracterizar todas as regiões do DNA humano flanqueando o kDNA. Contudo, eventos envolvendo integração foram identificados em *loci* gênicos, como o do receptor olfatório RO<sub>1-17</sub>, da enzima renina, da subunidade 2B do receptor N-metil D-Aspartato e da proteína PQBP1 (*Polyglutamine(Q) tract binding protein-1*), assim como em *loci* referentes a elementos móveis (TEs)

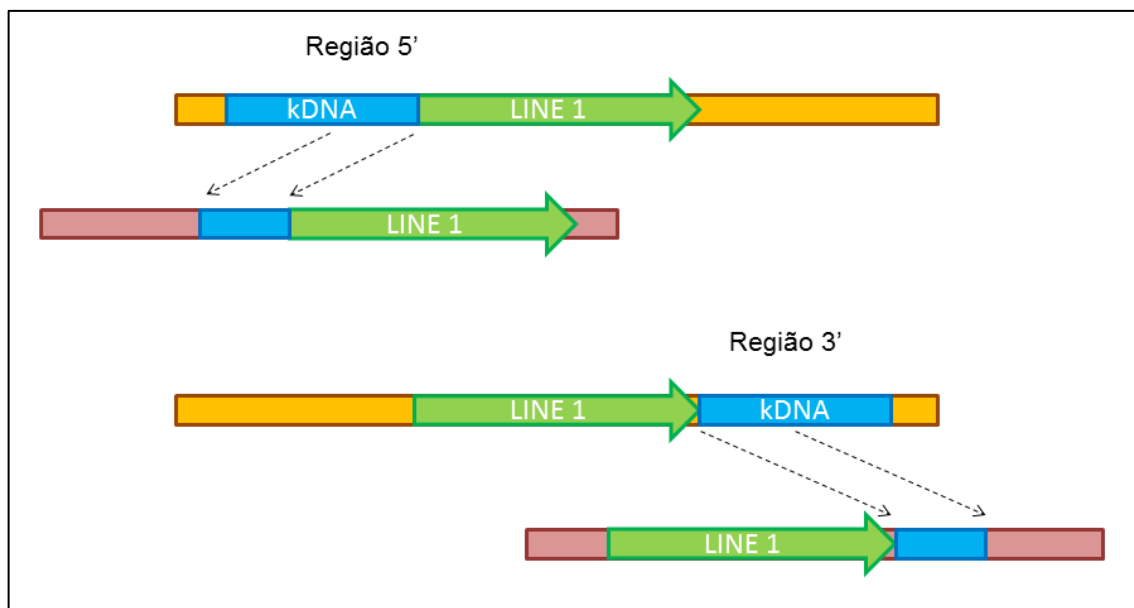
identificados em aproximadamente 80 % dos clones quimeras (Figura 10A). Cerca de 50 % das mutações de kDNA identificadas neste estudo ocorreram em regiões que envolviam o elemento móvel L1 no cromossomo sexual X, abrigo aproximadamente 86 % dos eventos de integração neste retroelemento. Justifica-se a alta incidência de integrações em retroelementos L1, pela sua abundância no genoma humano (Witherspoon e cols, 2006), com distribuição mais frequente no cromossomo X (Korenberg e Rykowski, 1988). Sabe-se que os TEs são importantes substratos para recombinação, promovendo um rápido remodelamento do genoma que podem produzir efeitos deletérios, tais como, ruptura gênica, recombinações, e silenciamento de genes (Rebolo e cols, 2012).

Em adição ao *locus* AL732374.14 do cromossomo X, outros sítios do genoma humano chamaram atenção pela frequência de eventos de integração, independentemente da origem familiar. Integrações no *locus* NG\_031854.1 do cromossomo 12 foram descritas pela primeira vez por este trabalho. Devido a observações de tais integrações encontradas em indivíduos não aparentados das famílias estudadas A, B e D, sugere-se que esta deve ser uma região preferencial de integração (Figura 20, Tabela A1 no Anexo 1). No cromossomo 7, o *locus* AC012596.4 também esteve flanqueando minicírculos de kDNA integrados no genoma de indivíduos das famílias B, C e D. Vale ressaltar que integrações de kDNA neste sítio haviam sido observadas em estudos anteriores (Hecht e cols, 2010; Araújo, 2012; Pimentel, 2012). Esses autores também encontraram integração do kDNA na região do gene do receptor olfatório RO<sub>1-17</sub>, localizado no *locus* BC137023.1 do cromossomo 1, que foi identificado, no presente trabalho, em 10 clones da Família D. Posteriormente, foi possível identificar mais clones com a ajuda da *tpTAIL*-PCR com iniciadores deste gene, em indivíduos das famílias C e D. Por conseguinte, essas três regiões recorrentes são aqui indicadas como sítios preferencias de integração de minicírculo de kDNA no genoma humano.

Eventos de integração do kDNA envolvendo mais de um *loci* de cromossomos diferentes foram observados em cerca de 20 % dos clones, um dos casos está ilustrado na Figura 11. Em algumas dessas quimeras não foi possível caracterizar as regiões flanqueadoras, entretanto, em outras foi verificado que pelo menos um dos *loci* envolvidos apresentava um elemento transponível, com predominância nítida do L1 de origem no cromossomo X (Figura 19). A mobilização

de L1 ativo ocorre naturalmente no genoma humano (Prak e Kazazian, 2000), onde a presença constante de elementos transponíveis, principalmente o L1, sugere que nesses eventos houve transposição para a região onde o kDNA foi inicialmente integrado. Nos casos em que o kDNA estava associado a dois fragmentos humanos contendo elemento móvel de cromossomos diferentes, nem sempre é possível inferir qual desses recebeu a integração e qual teria sido mobilizado. O sítio alvo da endonuclease de L1 é o consenso TT/AAA (Jurka, 1997), e a região variável do minicírculo é rica em nucleotídeos A/T (Sturm e cols, 1989); tal composição de nucleotídeos indica a plausibilidade da ocorrência de inserções de L1 nestes locais, visto que os sítios preferencias de inserção deste retroelemento são justamente em regiões com abundância nestes nucleotídeos (Graham e Boissinot, 2006).

Outro mecanismo que pode produzir evento de integração envolvendo dois *loci* de cromossomos distintos ocorre de maneira diferente ao descrito acima. Os elementos L1, ao se transporem, têm o potencial de carrear consigo regiões adjacentes a sua sequência, mediante mecanismo de transposição mediada por L1 (Deininger e cols, 2003), também conhecido por *hitchhiking*. Esse mecanismo difere do anterior, pois, ao invés do L1 se transpor para um sítio de outro cromossomo que já abriga uma integração de kDNA, no *hitchhiking*, parte ou todo o kDNA integrado em uma região de L1 é transposto juntamente para um novo sítio, conforme ilustrado no esquema da Figura 30. Simões-Barbosa e cols (2006) mostraram um evento de *hitchhiking*, pela primeira vez, com mobilização de kDNA carreado por um fragmento de sequência de L1 em macrófago humano infectado com *T. cruzi* em cultura.



**Figura 30 – Esquema ilustrando um evento de *hitchhiking* do kDNA carregado por um retrotransposon LINE 1. A) Carreamento de uma região de kDNA integrada na extremidade 5' ao L1. B) Carreamento de uma região de kDNA integrado na extremidade 3' do L1. Em laranja, região do DNA do hospedeiro; em rosa, região do DNA do hospedeiro diferente da anterior; em azul, kDNA; e, seta verde, elemento L1.**

Estudos sobre eventos de TL e TV de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* têm documentado a presença de trechos compartilhados entre o DNA do hospedeiro e o kDNA do *T. cruzi*, correspondendo aos blocos CSB1, CSB2 e CSB3 das regiões conservadas de minicírculos (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a). Além de encontrar regiões compartilhadas entre DNA humano e kDNA, neste trabalho também foram detectadas regiões de homologia entre diferentes sítios de DNA de origem humana, como pode ser observado na Figura 19, na região de junção entre o DNA dos cromossomos X e 1. As regiões de micro-homologias detectadas nos clones apresentaram cerca  $12 \pm 6$  nts, ricos em Adenosina/Citosina (repetições A/C) (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a). As regiões de micro-homologia são observadas em quase todos os eventos de integração e sua importância no mecanismo de inserção dos minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro tem sido realçada.

Todavia, o conhecimento completo sobre o mecanismo de TL de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma do hospedeiro ainda não foi obtido. A alta frequência das micro-homologias ricas em A/C nas quimeras kDNA-DNA hospedeiro vertebrado (Hecht e cols, 2010; Guimaro, 2012; Rose, 2013), e a presença desses motivos repetidos nos CSBs das regiões conservadas do

minicírculo de kDNA sugere a mediação da sua integração em sítios específicos do genoma do hospedeiro vertebrado. A literatura também sugere que o minicírculo de kDNA se utiliza da maquinaria de retrotransposição do L1 ativo de forma semelhante ao que ocorre na mobilização dos elementos não autônomos (Nitz, 2001; Cardoso, 2006; Hecht e cols, 2010). Quando as formas replicativas do *T. cruzi*, situadas no citoplasma da célula hospedeira iniciam o processo de divisão, os minicírculos de kDNA são desprendidos da rede concatenada pela Topoisomerase II. Possivelmente durante este processo alguns minicírculos de fita simples podem se ligar à proteína da ORF1 do L1 sendo passível de ser carregado para o núcleo da célula. Já no núcleo, o kDNA pode aproveitar a quebra de dupla fita do DNA (DSB – *double strand break*) do hospedeiro, integrando-se nesta região por intermédio da ação de endonuclease e transcriptase reversa da ORF2 do L1. Eventos de DSB podem ser causados por fatores resultantes do estresse produzido pela infecção do parasito (Hecht e cols, 2010), ou pela susceptibilidade de regiões deformadas, como grampos ou curvaturas, ao rompimento do DNA (Chen e cols, 2010), possivelmente predispondo esses sítios instáveis à invasão do minicírculo mitocondrial do *T. cruzi*.

O aproveitamento da instabilidade de algumas regiões do genoma do hospedeiro pelo kDNA pode explicar, por exemplo, a recorrente integração de minicírculos no gene do receptor olfatório OR<sub>1-17</sub> sempre no mesmo ponto. Ao analisar a configuração espacial *in silico* da região do gene RO<sub>1-17</sub> envolvida nos eventos de integração foi identificada uma curvatura da estrutura do DNA iniciando-se exatamente na base equivalente ao 94º nucleotídeo, local da entrada do minicírculo em todos os clones que apresentaram essa sequência flanqueadora ao kDNA (Figura 27). Evento semelhante foi observado em integrações de kDNA no gene da enzima málica de *Gallus gallus*, em que Rose (2013) identificou, *in silico*, a presença de uma curvatura intrínseca à região onde está localizado o ponto recorrente de integração do kDNA neste gene. Pribil e Haniford (2003) sugerem que deformações de DNA podem contribuir significativamente para a escolha de um sítio alvo de transposição, destacando que regiões de curvaturas no DNA são importantes determinadores para escolha de um sítio de integração.

## 2.1 Eventos de integração de minicírculos de kDNA em regiões gênicas

Integrações de minicírculos de kDNA em regiões codificadoras foram identificadas em *loci* de três cromossomos, contabilizando dois sítios no cromossomo 1, gene da enzima renina e gene de receptor olfatório (RO), um no cromossomo 12, gene de receptor glutamato, e um no cromossomo X, gene PQBP1. Eventos envolvendo a entrada de minicírculos em genes de diferentes espécies de hospedeiro já foram descritos anteriormente (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a; Araújo, 2012; Guimaro, 2012; Pimentel, 2012; Rose, 2013), entretanto, em humanos ainda não foi possível estabelecer um padrão de sítios gênicos preferencias de integração. Através das análises das sequências quimeras foi possível distinguir que o kDNA pode adentrar uma região gênica via elemento transponível (Simões-Barbosa e cols, 2006) ou simplesmente se integrando diretamente em um gene (Hecht e cols, 2010).

Em um dos clones foi observada a integração de kDNA na região 1q32 do cromossomo 1, especificamente no éxon 5 do gene da renina (Figura 11). A renina (REN) é uma enzima produzida pelas células justaglomerulares do rim que tem participação fundamental na cascata bioquímica no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Adams e cols, 2006). Este sistema está intimamente ligado com o controle da pressão arterial e da homeostase eletrolítica, e a sua desregulação tem sido associada a fisiopatologias da pressão arterial e a várias consequências hemodinâmicas e humorais, como isquemia do miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias, alterações no equilíbrio coagulação-fibrinólise e aumento do estresse oxidativo (Ribeiro e Florêncio, 2000). Um estudo desenvolvido em uma família com vários indivíduos apresentando cardiomiopatia dilatada localizou alterações em um *locus* específico da região cromossômica 1q32 sugerindo o gene REN como um dos genes candidatos ao envolvimento com a insuficiência cardíaca (Durand e cols, 1995).

Uma das integrações não caracterizada pelos dois bancos de dados utilizados neste trabalho, ocorreu no cromossomo 12 no gene da subunidade 2B do receptor N-metil D-Aspartato (NMDAR2B ou GRIN2B) (Figura 20). Os NMDARs são heterotetrâmeros pertencentes à família de receptores ionotrópicos de glutamato que têm como principais agonistas os aminoácidos NMDA e glutamato, ligantes da

subunidade GRIN2 (Dzamba e cols, 2013). Esses receptores têm um papel importante no sistema nervoso central, agindo na transmissão e plasticidade sináptica e na excitotoxicidade (Cull-Candy e cols, 2001). Variações genéticas nos NMDARs têm sido associadas à doenças neurológicas, psiquiátricas e de aprendizagem, com mutações específicas na subunidade GRIN2B associadas a susceptibilidade genética a déficit intelectual (Freunsch et cols, 2013), autismo (Tarabeux e cols, 2011) e esquizofrenia (Ohtsuko e cols, 2001).

Outro evento de integração do kDNA ocorreu na extremidade 3'UTR do gene PQBP1. Este gene, localizado no cromossomo X, foi bastante conservado ao longo da evolução e apresenta um domínio que codifica uma proteína envolvida na transcrição e na regulação do processamento do mRNA da RNA Polimerase II, sendo altamente expresso no cérebro de mamíferos (Sudol e cols, 2012). No homem, diversas doenças genéticas são descritas associando mutações neste gene ao déficit intelectual, sindrômicos ou não, e a casos de micro-oftalmia e microcefalia (Martínez-Garay e cols, 2007). Uma das mutações desse gene, especificamente uma deleção de quatro nucleotídeos no éxon 4, altera a janela de leitura do DNA gerando uma proteína truncada não-funcional que acomete o cérebro causando heteropia periventricular cerebral, caracterizada pela presença de nódulos neuronais na lateral do ventrículo (Sheen e cols, 2010).

A quarta região gênica envolvida nos eventos de integração do kDNA foi o gene do receptor olfatório RO<sub>1-17</sub>, localizado no *locus* BC137023.1 do cromossomo 1. Os ROs são receptores acoplados a proteína-G, formados por sete domínios transmembrana que pertencem a maior superfamília de genes do genoma dos vertebrados, totalizando 17 famílias multigênicas bastante conservadas ao longo da evolução (Glusman e cols, 2001; Malnic e cols, 2004). No humano foram identificados aproximadamente 370 genes intactos de RO e cerca de 460-480 pseudogenes, que estão distribuídos em diferentes *loci* em todos os cromossomos, exceto os cromossomos 20 e X (Malnic e cols, 2010), compondo mais de 170 subfamílias (Malnic e cols, 2004). Em contraste com a maioria dos genes, os ROs são encontrados em locais com baixo teor de nucleotídeos G e C, entretanto, as regiões codificadoras destes genes são 7,7 % mais ricas nesses nucleotídeos do que a maioria dos outros genes (Glusman e cols, 2001).

As integrações de kDNA observadas neste trabalho foram identificadas no RO<sub>1-17</sub>, membro 2 da subfamília K pertencente a família 6, localizado na região cromossômica 1q23.1. A região 1q21-q25 apresenta grupos de *loci* parálogos à região do MHC (*Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade), localizada no braço curto do cromossomo 6, sendo a única região paráloga ao MHC que apresenta dois autênticos genes de MHC Classe I, localizados nos *loci* CD1 e MR1. Ademais, 12 dos 13 genes expressos na região 1q21-q22, entorno dos *loci* CD1, são imunologicamente relevantes. Susceptibilidade a diversas doenças relacionadas à morfologia alterada das hemácias e a esquizofrenia e hemiplegia de origem familiar, têm sido associadas a alterações nos *loci* CD1 da região 1q21-q23 (Shiina e cols, 2001).

Eventos de integração envolvendo o gene RO<sub>1-17</sub> e o cromossomo X foram comumente observados neste estudo (Figuras 19 e 20C). Na literatura é possível identificar diversos trabalhos descrevendo eventos de translocação entre os cromossomos X e 1 (Tzschach e cols, 2006; Haudebourg e cols, 2010; Mukkamala e cols, 2010), inclusive envolvendo uma região próxima ao *locus* do gene RO<sub>1-17</sub>, t(X;1)(p11; q21), que resulta em carcinoma de células renais papilar (Weterman e cols, 1996). Entretanto, em se tratando de um elemento L1, sugere-se que o trecho de DNA humano proveniente do cromossomo X tenha se transposto para o cromossomo 1, levando consigo o kDNA mediante *hitchhiking* ou se integrando em um sítio que já apresentava, anteriormente, um evento de integração.

### **3. VARIABILIDADE DE MINICÍRCULOS DE kDNA ENVOLVIDOS NOS EVENTOS DE INTEGRAÇÃO**

A rede de kDNA do *T. cruzi* é composta de milhares de cópias de minicírculos que, apesar de possuírem tamanho aproximadamente homogêneo, apresentam uma grande heterogeneidade quanto a composição das suas sequências (Klingbeil e cols, 2001) que exibem notável polimorfismo nas regiões variáveis dos minicírculos (Velazquez e cols, 2008). Diferentes eventos de integração foram encontrados nos clones dos indivíduos estudados (Tabela A1 Anexo 1), com variações tanto nos fragmentos de DNA humano como nos minicírculos integrados. Esse resultado sugere que os minicírculos têm um potencial



de se integrar em diversas regiões do genoma humano com motivos repetidos, compartilhados, que se constituem em sítios preferenciais de integração do kDNA.

Além de encontrar *loci* humanos mais passíveis a integração, foram identificadas três sequências consenso de regiões variáveis de minicírculos distribuídas entre clones de indivíduos não necessariamente aparentados (Figura 29). A inserção desses consensos não apresentou uma preferência por um *locus* determinando, pois foram encontrados integrados em sítios aleatórios. Essa observação indica a existência de classes de minicírculos com maior potencial de integração no genoma humano. Barros (2008) e Hecht (2008) já haviam sugerido a existência de minicírculos que se integram preferencialmente no genoma do hospedeiro. Notavelmente, o consenso III, identificado em clones de três famílias aqui estudadas, foi igual ao consenso II encontrado por Hecht (2008), evidenciando a existência de famílias de minicírculos de kDNA eletivas a eventos de integração.

O minicírculo é formado por quatro regiões variáveis alternadas por regiões conservadas, entretanto, as sequências de kDNA observadas neste estudo apresentavam apenas uma das regiões variáveis. Dessa forma, a identificação dos consensos foi feita a partir de uma das quatro regiões variáveis encontradas em quimeras. Na maioria dos clones obtidos foi verificado que os minicírculos de kDNA integrados não exibiam a estrutura completa, e foram notados clones com regiões variáveis truncadas. Muitos desses clones eram quimeras com apenas a região conservada do minicírculo do kDNA, algumas vezes repetida e rearranjada. Esses achados sugerem a ocorrência de recombinação no minicírculo de kDNA, indicando, pela alta frequência de clones portando essas alterações, que esses eventos acontecem de maneira constante, como podem ser observado nos kDNAs presentes na Figura 20. Ademais, Nitz e cols (2004) já haviam indicado a ocorrência de eventos de recombinação do kDNA integrado em células cardíacas de coelhos chagásicos descrevendo eventos em que clones apresentavam regiões variáveis com tamanho reduzido, repetições apenas de regiões conservadas e até mais de quatro regiões variáveis e conservadas juntas. Há que se distinguir o achado resultante de truncamento e recombinações, da simples ausência de fragmentos de regiões conservadas em consequência do método de PCR aninhada, empregada neste estudo.

A análise conformacional feita em alguns clones demonstrou várias regiões sugestivas de altas dobras em trechos do kDNA (Figuras 17, 23 e 27), o que indica que o DNA do *T. cruzi* parece estar sempre susceptível a eventos de quebra. A alta frequência da base adenina em cada segmento de ~11 bases levaria a alterações na estrutura do DNA, gerando curvaturas (Diekmann e Wang, 1985). A composição da região variável do kDNA rica em nucleotídeos A/T sugere que seja, possivelmente, sítio eletivo de quebra de DNA e perda de fragmentos dessas sequências, caracterizando tais regiões como pontos de instabilidade genômica sujeitos, constantemente, à modificações.

Em estudo feito em macrófagos humanos e tecido de coelhos chagásicos, Barros (2008) verificou regiões de dobramento e curvatura nos clones com integração de kDNA indicando haver regiões de tensão próximas a locais de recombinação. O trabalho também identificou que após o evento de integração ocorreram modificações na estrutura do DNA com uma consequente redução local da tensão.

#### **4. ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA VERTICAL E FIXAÇÃO DO kDNA**

A herança do kDNA pôde ser claramente observada nos descendentes dos indivíduos chagásicos identificados neste estudo. A ausência de contato direto com o parasito, evidente nos resultados moleculares negativos para nDNA do *T. cruzi*, demonstra que a presença de kDNA no genoma desses indivíduos tem origem exclusiva da transferência vertical do minicírculo ao longo das gerações dos indivíduos chagásicos.

Esperava-se que as integrações de kDNA herdadas pelos descendentes de infectados com *T. cruzi* apresentassem um padrão Mendeliano de herança, com os sítios de integração do DNA exógeno se mantendo ao longo das sucessivas gerações, assim como a conservação da topologia do kDNA originalmente integrado no genoma do parental chagásico. Porém, eventos de integração dugestivos deste padrão de herança foram observados de forma pontual nos casos descritos neste estudo. Pois, conforme verificado nos resultados dos alinhamentos entre clones de indivíduos aparentados, ilustrados ao longo do corpo deste trabalho, foi possível

notar a alta frequência de kDNAs com topologias distintas integrados nos mesmos *loci*.

A herança Mendeliana postula que as características dos indivíduos diploides são herdadas a partir de igual proporção entre os dois parentais, sendo o genoma do descendente composto por metade de origem materna e metade de origem paterna, possibilitando prever as frequências alélicas da prole, estimando os genótipos e as características fenotípicas (Pierce, 2004). Por conseguinte, os eventos de integração que apresentam kDNAs topologicamente distintos entre parental e descendente, parecem não obedecer as leis propostas pelo seminarista Mendel, sugerindo a ocorrência de um padrão de herança não Mendeliano para estes casos. A presença de diversos eventos de integração independentes, que podem ocorrer a todo instante nas células germinativas e somáticas de indivíduo com infecção ativa, as transposições de elementos móveis carregando o kDNA, a mobilização do próprio kDNA sozinho ou o remodelamento das regiões envolvidas pela integração, seja do kDNA ou do DNA humano, podem explicar esse padrão de herança observado nos eventos aqui descritos.

Um indivíduo infectado com o *T. cruzi* está sujeito, frequentemente, a eventos de integração do kDNA, apresentando uma diversidade de minicírculos com potencial de integração de uma gama de amastigotas intracelulares em divisão. Como consequência, o genoma de uma célula infectada pode exibir integração em um *locus* preferencial, enquanto outra célula também pode ter seu genoma invadido no mesmo *locus*, contudo, com integração de outro minicírculo de topologia diferente. A diversidade imensa da população de cerca de 20 mil minicírculos, possibilita, inclusive, mutação no mesmo *locus* com minicírculo de kDNA de topologia diferente em células somáticas e germinativas. Por ser um indivíduo com potencial de apresentar alto nível de heterogeneidade de mutações, a pessoa infectada com o *T. cruzi* pode ser um mosaico genético, segundo o conceito considerado por De (2011). Dessa forma, a diversidade de integrações que pode ser encontrada em um mesmo *locus* genético de um indivíduo infectado dificulta o achado do mesmo minicírculo de kDNA que teria sido herdado a partir de uma célula germinativa que estava exposta à um número incontável de minicírculos. A compreensão para este fato é encontrada no conhecimento de que em cada fecundação os gametas carregam mutações com minicírculos de kDNA que tendem

à diversidade sem limite conhecido. Essas explicações podem ser ilustradas pela diferença entre a região de kDNA identificada no clone MBH48, do parental nDNA positivo, 1466, e dos seus dois netos apenas kDNA positivos, 1470 e 1471, como verificado no alinhamento da Figura 13.

Outra sugestão para elucidar as diferenças encontradas nos kDNAs de indivíduos aparentados é pela via da mobilização de elementos transponíveis situados nas regiões flangeadoras à integração que, por *hitchhiking*, altera o sítio original da inserção do DNA exógeno (Simões-Barbosa e cols, 2006; Hecht e cols, 2010). Os eventos identificados nas quimeras das Figuras 11 e 19 apresentaram entre as regiões flangeadoras, sequências de genes e de elementos transponíveis, indicando a possibilidade de mobilização dos elementos para os sítios gênicos, gerando um aspecto de embaralhamento e mosaicismos no genoma hospedeiro.

A mobilização apenas do kDNA integrado, ou de um trecho dele, saindo do *locus* de origem e se inserindo em outro local a distância, pode resultar em diferenças de kDNAs integrados em um mesmo sítio em mais de um familiar. Essa mobilização pode ocorrer tanto no parental, como nos descendentes. Um mesmo minicírculo de kDNA, reconhecido pela sua região variável, foi identificado disperso no genoma de quatro irmãos da geração F2, sendo que os eventos de integração detectados mostraram cromossomos diferentes em cada um desses indivíduos (Figura 28), sugerindo a mobilização do DNA exógeno herdado. Também foram identificados eventos em que clones de um mesmo indivíduo, apenas kDNA positivo, apresentaram minicírculos com a mesma região variável, integrados em cromossomos diferentes. Outra sugestão de mobilização do kDNA pode ser ilustrado pelo clone MBH287 demonstrado na Figura 20. Existem duas possibilidades que podem ter resultado na presença de duas regiões de kDNA flangeando uma sequência de DNA humano. Ou dois eventos independentes de integração ocorreram neste *locus* ou um segundo kDNA se deslocou para uma região de DNA humano próxima a outro minicírculo já integrado.

A diferença apresentada entre minicírculos de kDNA integrados no mesmo *locus* de um indivíduo também pode sugerir a ocorrência de recombinação, homóloga ou não, ou de algum tipo de rearranjo, como pode ser visto nos clones da Figura 21, em que o caso 1956 apresentou dois clones com kDNA diferente no mesmo *locus*, enquanto que o 1957 apresentou três clones seguindo este mesmo

padrão. A troca de informação genética entre sequências de DNA resultante de eventos de recombinação acontece normalmente no genoma, como por exemplo, no *crossing over* entre cromossomos homólogos, gerando variabilidade genética. Já os rearranjos cromossômicos podem resultar em duplicações, deleções, inversões e translocações na estrutura individual de um cromossomo (Pierce, 2004).

Como foi descrito anteriormente, na maioria das integrações envolvendo o *locus* AL732374.14 do cromossomo X observou-se o alto embaralhamento entre as regiões de kDNA e DNA humano (Figura 23). Trechos de kDNA truncados, muitas vezes com ausência de região variável, foram observados intercalando regiões do cromossomo X contendo L1. Possivelmente as altas curvaturas, demonstradas pelo gráfico da Figura 23C, podem ocorrer pela repetição em tandem de regiões conservadas de kDNA duplicadas, sugerindo que essas regiões estão estruturalmente dobradas, formando alças, propiciando alto potencial de rearranjo entre trechos de kDNA e do L1, já que regiões de DNA repetitivos, incluindo classes de elementos transponíveis, são substratos para eventos de rearranjo cromossômico (George e Alani, 2012).

Na Figura 17 é possível verificar que o clone MBH381, do parental 1461, apresenta picos repetitivos na região que se refere ao kDNA. Essas regiões foram identificadas como sendo apenas região conservada sugerindo a ocorrência de uma deleção das regiões variáveis entre as três regiões conservadas, ou a ocorrência da deleção de uma região variável e a subsequente duplicação da região conservada. A presença de altos picos de curvatura nas regiões do kDNA sugere que o clone MBH430, da filha 1471, perdeu a região destacada na Figura 17A, possivelmente pela alta instabilidade apresentada por essa estrutura de DNA, já que regiões de dobra estão bastante associadas à eventos de mutações, deleções e recombinações (Barbosa e cols, 2008). Ademais, outra diferença apresentada entre os clones de pai e filha, demonstra que na região do kDNA deletado, ocorreu uma translocação de uma parte do cromossomo 12, ou uma mobilização de um elemento móvel, contudo, por ser um flaco do DNA hospedeiro que consta como indeterminado, não há como sugerir um mecanismos operacional (Figura 16).

Com o objetivo de aproximar as buscas por eventos de fixação do minicírculo de kDNA em um mesmo *locus*, as Famílias C e D foram selecionadas para a *tpTAIL*-PCR específica para o gene do RO<sub>1-17</sub>. Os resultados apresentados

por essa metodologia adaptada não diferiu do observado pela técnica convencional com iniciadores para L1, contribuindo com a hipótese das integrações de kDNA apresentarem um padrão preferencial de herança não Mendeliano. Os minicírculos integrados nos clones da Família C apresentaram diferenças topológicas (Figura 25), entretanto, uma das quimeras da parental 1457, apresentou alta similaridade do kDNA identificado em dois clones da descendente 1471. Os clones da Família D apresentaram alta variação na sequência de kDNA integrado, inclusive entre clones de um mesmo indivíduo (Figura 26), cujas sequências de kDNA bastante truncadas, exibiam as regiões conservadas de kDNA e redução do tamanho ou ausência das regiões variáveis, sugerindo que essa variação do kDNA decorreu ou por sucessivos e independentes eventos de rearranjo em cada um dos indivíduos, ou da herança de minicírculos diferentes.

Dos 194 clones totais obtidos pelas duas variações da *tpTAIL*-PCR, 89 clones representaram eventos únicos. Nos 105 clones remanescentes foram identificados eventos de integração do kDNA distribuídos em sete *loci* em que o sítio de integração se repetia entre indivíduos consanguíneos. Destes clones incluídos no estudo da herança do kDNA, um total de 15 quimeras (14 %) representaram eventos sugestivos de herança Mendeliana da mutação do kDNA, com conservação da região humana, da micro-homologia e da topologia do kDNA integrado. Essa frequência é considerada baixa quando comparada aos demais casos (86%) que apresentaram um padrão de herança não conservada do DNA exógeno, onde a mutação do kDNA, apesar de manter-se no mesmo *locus*, apresentava divergências na topologia do kDNA integrado.

Com a frequência de integrações de kDNA apresentando um padrão indicativo de herança não Mendeliana indicado pela alta divergência entre as regiões de kDNA do parental e das progênes, sugere-se que eventos de fixação da mutação do minicírculo de kDNA integrado originalmente no parental chagásico são raros. Contudo, os alinhamentos ilustrados nas Figuras 15, 21 e 23 mostram que a mesma mutação de kDNA identificada no parental foi encontrada em seu(s) descendente(s), indicando a transferência vertical do minicírculo. Além disto, a Figura 13C ilustra o mesmo kDNA herdado entre dois irmãos, indicando que este minicírculo teve origem no mesmo parental. Desta forma é notado que existem casos em que o kDNA

herdado é transferido para a progênie de forma conservada e a mutação resultante da sua integração é fixada no genoma da família.

## 5. ASPECTOS DA HERANÇA NÃO MENDELIANA

O avanço progressivo da ciência e da tecnologia proporcionaram metodologias que permitiram conhecer intrínsecamente a organização celular, a conformação estrutural de moléculas, a interação dos sistemas celulares, assim como, a constituição genética de muitas espécies através do sequenciamento de genomas. Conhecendo cada vez mais as características genéticas, os estudos relacionados à herança ganharam força, e variações do padrão clássico de herança descrito por Mendel foram sendo documentados.

A revisão do conceito de dominância, acrescentando a dominância incompleta e a co-dominância; o efeito materno; a herança de material genético extracromossômico; a epigenética; a interação gênica entre *loci* diferentes; e, a epistasia, são exemplos de herança que evadem do padrão clássico Mendeliano, pois a influência de um alelo sobre o outro, a origem parental do alelo, entre outros fatores, afetam diretamente o modo como os genes são expressos em fenótipos, resultando em progênies com características genéticas herdadas diferentes dos parentais (Heyningen e Yeyati, 2004; Pierce, 2004; Oliveira, 2012).

Mesmo sendo classificados como herança não Mendeliana por apresentarem alterações que diferenciam a prole dos seus genitores e que modificam a frequência fenotípica esperada, os casos descritos acima são resultantes de alterações na expressão gênica, sem que haja modificação da configuração estrutural primária do DNA parental. Diferentemente dos casos descritos acima, no presente estudo, as mutações de kDNA observada nos ancestrais diferem, em sua maioria, daquelas encontradas nas progênies, tanto nos *loci* de integração, quanto na topologia do minicírculo integrado, demonstrando uma herança não conservada do kDNA, sugerindo herança não Mendeliana.

A predominância de integrações dos minicírculos de kDNA em sítios de elementos transponíveis pode ser um fator a contribuir com a herança não Mendeliana dessas mutações. As transposições de L1 em células somáticas são

modificações adaptativo-evolutivas que contribuem para a variabilidade das mutações de kDNA que podem se mobilizar via *hitchhiking*, gerando mosaicismos somáticos no hospedeiro. Ademais, em modelos experimentais transgênicos foi verificada a expressão de RNA e a presença de proteínas de retroelementos L1 de humanos e camundongos, em células do estágio inicial do desenvolvimento embrionário, e, em menor proporção, em células germinativas, sugerindo que a retrotransposição em humanos acontece majoritariamente no estágio embrionário inicial (Kano e cols, 2009), podendo gerar mosaicismos somático e germinativo (van den Hurk e cols, 2007).

Outra proposta deste estudo para tentar compreender a maneira pela qual o kDNA está sendo herdado propõe a hipótese do kDNA se comportar como um gene egoísta. Os elementos genéticos egoístas (*selfish genetic element* - SGE) têm a característica de aumentar sua própria frequência em relação a todo o resto do genoma de um indivíduo, apresentando uma tendência de se multiplicarem durante a meiose, tornando-se super representados na geração seguinte, apresentando um padrão de herança não Mendeliano (Werren, 2001). Sendo um gene egoísta, talvez o kDNA se comporte como os genes HEGs (*Homing endonuclease genes*) que em alguns casos apresentam uma herança de quase 75 a 90% da prole (Giraldo-Perez e Goddard, 2013), similar a alta frequência observada na herança do kDNA. Como é possível perceber, dentro deste conceito de gene egoísta se encaixam também os elementos transponíveis que, por apresentarem a habilidade de “cópia”, acumulam no genoma. Talvez, a associação do kDNA com os TEs também promova a multiplicação egoísta do DNA exógeno.

A variabilidade de eventos de mutação por integração de kDNA que um indivíduo infectado está susceptível, associada a fatores mutagênicos, como a mobilização do kDNA via *hitchhiking* de L1, juntamente com a hipótese do kDNA se comportar como um gene egoísta, geram indivíduos mosaicos e ampliam de uma maneira incomensurável, a diversidade genética nos chagásicos e seus descendentes, sugerindo um padrão de herança não Mendeliano, com modificações na estrutura primária das mutações de kDNA, cuja disseminação na população pode ocorrer sem limite conhecido.



## VI CONCLUSÕES

Até o presente momento não foi possível elucidar a importância relativa das inúmeras mutações de kDNA e suas possíveis consequências fisiopatológicas. A identificação e caracterização das regiões flangeadoras permitiram detectar a presença de DNA exógeno em regiões gênicas sugerindo um potencial mutagênico para este DNA. Esse contexto indica que os eventos de inserção podem gerar implicações como rupturas e silenciamento de genes, alterações na expressão gênica e formação de novas ORFs e proteínas quimeras, gerando alterações genéticas que podem desencadear a disfunção de diversos genes.

Os padrões observados nos sítios de integração deste estudo indicam haver a preferência do kDNA por regiões específicas do genoma humano, assim como a existência de minicírculos com maior tendência à integração. A elevada ocorrência de integração em regiões sujeitas a mobilização parece ser uma estratégia que permite potencializar a distribuição do DNA exógeno no genoma hospedeiro, promovendo o potencial mutagênico do kDNA e sua disseminação, multiplicando as possíveis consequências geradas pelos evento de integração.

A fixação e perpetuação do kDNA, transmitido verticalmente às gerações sucessivas de uma família de parental chagásico foi observada de forma frequente. Porém, a variabilidade de minicírculos, somada aos recorrentes efeitos de recombinação e mobilização aos quais os kDNAs estão sujeitos, resultaram em um mosaicismos genético dos indivíduos mutados, indicando um padrão não Mendeliano de herança. Apesar desta observação, alguns casos sugestivos de herança Mendeliana, com conservação do *locus* de inserção e do minicírculo, entre parental e descendentes, foram identificados.

As descobertas modernas acerca das heranças que não obedecem o padrão clássico da hereditariedade, magistralmente descrito por Gregor Mendel, não desmerecem nem invalidam os antigos postulados, mas, sim, agregam conhecimento acerca das modificações e ampliações da hereditariedade. De fato, os conceitos de herança Mendeliana não são, por si só, suficientes para explicar a herança de todas as características genéticas.

O remodelamento do genoma, decorrente de eventos como a mobilização, a deleção, o truncamento e as translocações, promove a diversidade genética, e a presença de kDNA em todos os indivíduos estudados sugere que esse

evento recorrente provoca uma constante evolução da espécie. Contudo, há de se reconhecer que se herança Mendeliana fosse única e absoluta não haveria como entender a evolução definida por Charles Robert Darwin como "descendentes com modificação". A série de publicações do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da UnB revela "descendentes modificados" pelo fenômeno natural e inexorável, subsequente à integração de sequências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma de mamíferos, sujeitos à herança sem conservação do padrão Mendeliano. A esse respeito, descobriu-se um elo que Jean-Baptiste Lamarck sugeriu como elemento de pressão do meio ambiente sobre a evolução das espécies. Ou seja, o *T. cruzi* é um fator ambiental que une Lamarck e Darwin no magnífico fenômeno da evolução das espécies, cuja força motriz é a diversidade genética. Os remodelamentos do genoma decorrentes de eventos de mobilização, recombinação, truncamento, translocações e heterose social, são fatores endógenos que promovem a diversidade genética. Porém, são os fenômenos exógenos de TL e TV, aqui definidos pela integração de minicírculo de kDNA em todos os indivíduos estudados, com seu padrão de herança não conservada que põe em marcha a saga constante da evolução das espécies, tal como acontece com o movimento incessante dos corpos celestes: As mutações de kDNA fixadas em sítios do genoma e os corpos celestes na topografia do firmamento.

## VII PERSPECTIVAS

O presente estudo permitiu elucidar de que forma os minicírculos de kDNA estão sendo transmitidos os descendentes em uma família com parental chagásico, demonstrando a importância da diversidade dos eventos herdados para a contribuição para a evolução do genoma humano. Os resultados aqui apresentados abrem portas para novas investigações, possibilitando responder muitas perguntas que ainda dependem de mais investigação, buscando esclarecer:

- Se os *loci* preferencias de integração apresentam uma estrutura topologia que facilita a entrada do kDNA nestes sítios.
- Quais os fatores que contribuem para o mecanismo de integração do kDNA e qual o papel das regiões de micro-homologia na estabilização do kDNA no genoma do hospedeiro.
- Se classes de minicírculos de kDNA que tiveram maior frequência de integração, sugerindo mais aptidão à mutação, promovem aumento na estabilidade da estrutura do DNA, proporcionando a sua fixação.
- Se com a utilização da *tpTAIL*-PCR específica para o gene da Renina é possível estimar a frequência de integração neste *locus*. A ampliação do conhecimento sobre as integrações de kDNA neste gene, visto que mutações neste sítio de interesse podem gerar insuficiência cardíaca.
- Se a combinação de múltiplas integrações, juntamente com os sítios de mutação, associa fatores fisiopatológicos que iniciam as manifestações clínicas.

## BIBLIOGRAFIAS

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

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH. **Doença causadas por respostas imunes: hipersensibilidade e auto-imunidade.** In: *Imunologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 423-443.

ADAMS, DJ; HEAD, GA; MARKUS, MA e cols. **Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function.** *J. Biol. Chem.* 281: 31753-31761, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Gerenciamento do risco sanitário na Transmissão de doença de Chagas aguda por alimentos.** Informe técnico, n35, 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35\\_190608.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.htm) Acessado em: Setembro de 2013.

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

ARAÚJO, PF. **Estudo genético, imunológico e parasitológico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* em famílias do Estado do Pará.** 2012. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

AOKI, S. **Resurrection of na ancestral gene: functional and evolutionary analyses of the Ngr1 genes transferred from Agrobacterium to Nicotiana.** *J Plant Res.* 117(4): 329-337, 2004.

BARBOSA, JF; BRAVO, JP; TAKEDA, KI; SILVA, JL; BALANI, VA; FIORINI, A; FERNANDEZ, MA. **Intrinsic bent DNA colocalizes with the sequence involved in the Nd-sD mutation in the Bombyx mori fibroin light chain gene.** *BMB Rep.* 41(5): 394-299, 2008.

BARRIAS, ES; CARVALHO, TMU; SOUZA, W. ***Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation.** *Front Immunol.* 2013.

BARROS, AM. **Caracterização de regiões de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano.** Tese de Doutorado. Universidade de Brasília – DF, Brasil, 2008.

BELANCIO, AP; HEDGES, DJ; DEININGER, P. **Mammalian non-LTR retrotransposons: For better or worse, in sickness and in health.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 18: 343-358, 2008.

BENVENUTI, LA; ROGGÉRIO, A; FREITAS, HFG; MANSUR, AJ; FIORELLI, A; HIGUCHI, ML. **Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocarditis.** *Ann Trop Med Parasitol.* 102(6): 481-487, 2008.

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

BOCCHI, EA. **Heart failure in South America.** *Current Cardiology Reviews,* 9: 147-156, 2013.

BÖHNE, A; BRUNET, F; GALIANA-ARNOUX, D; SCHULTHEIS, C; VOLFF, JN. **Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates.** *Chromosome Research.* 16: 203-215, 2008.

BONNEY, KM; ENGMAN, DM. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?** *Current Molecular Medicine.* 8: 510-518, 2008.

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

CARDOSO, CG. **Lesões típicas da doença de Chagas em aves com genoma alterado por integração de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília-DF, Brasil, 2006.

CARLIER, Y; TORRICO, F; SOSA-ESTANI, S; RUSSOMANDO, G; LUQUETTI, A; FREILIJ, H; VINAS, PA. **Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women.** *PLoS Negl Trop Dis*; 5 (10):e1250, 2011.

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

CHAGAS, Carlos. **Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 8(2): 37-60, 1916.

CHEN, J.M.; COOPER, D.N.; FÉREC, C.; KEHRER-SAWATZKI, H.; PATRINOS, G.P. **Genomic rearrangements in inherited disease and cancer.** *Seminars in Cancer Biology*. 20(4): 222-233, 2010.

CHIG-HONG, PV; SCHHWARTZ, BS; BERN, C; MONTGOMERY, SP; KONTAK, S; KUBAK, B; MORRIS, MI; NOWICKI, M; WRIGHT, C; ISON, MG. **Screening and treatment of Chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the Chagas in Transplant working group.** *American Journal of Transplantation*; 11: 672–680, 2011.

CORDOVA, E; BOSCHI, A; AMBROSIONI, J; CUDOS, C; CORTI, M. **Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007.** *International Journal of Infectious Diseases*. 12(6): 587-592, 2008.

COURA, JR. **The Discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(4): 389-390, 2013.

COURA, JR; CASTRO, SL. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(1): 3-24, 2002.

COURA, JR; MOREIRA, CJC; JUNQUEIRA, ACV. **Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscópicas de Malária e Laboratoristas de rede pública.** Organização Pan-Americana da Saúde. Módulo 1:

1-69. 2012. Disponível em:  
<http://www1.paho.org/cdmedia/manualchagas2012/pdf/modulo1.pdf> Acessado em:  
Agosto de 2013.

CULL-CANDY, S; BRICKÇEY, S; FARRANT, M. **NMDA receptor subunits: diversity, development and disease.** *Current Opinion in Neurobiology.* 11: 327–335, 2001.

CHUNA-NETO, E; BILATE, AM; HYLAND, KV; FONSECA, SG; KALIL, J; ENGMAN, DM. **Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry.** *Autoimmunity.* 39(1): 41–54, 2006.

DE, S; **Somatic mosaicism in healthy human tissues.** *Trends in Genetics.* 27(6): 217-223, 2011.

DEININGER, P. **Alu elements: know the SINEs.** *Genome Biology.* 12(236), 2011.

DEININGER, PL; MORAN, JV; BATZER, MA; KAZAZIAN, HH JR. **Mobile elements and mammalian genome evolution.** *Current Opinion in Genetics & Development.* 13: 651-658, 2003.

DIEKMANN, S; WANG, JC. **On the sequence determinants and flexibility of the kinetoplast DNA fragment with abnormal gel electrophoretic mobilities.** *Journal of Molecular Biology.* 186: 1-11, 1985.

DORN, P; PERNICIARO, L; YABSLEY, MJ; ROELLIG, DM; BALSAMO, G; DIAZ, J; WESSON, D. **Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana.** *Emerging Infectious Diseases.* 13(4): 605-607, 2007.

DURAND, JB; BACHINSKI, LL; BIELING, BS e cols. **Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32.** *Circulation.* 92(12): 3387:3379, 1995.

DUTRA, WO; ROCHA, MOC; TEIXEIRA, MM. **The clinical immunology of human Chagas disease.** *TRENDS in Parasitology.* 21(12): 581-587, 2005.

DZAMBA, D; HONSA, P; ANDEROVA, M. **MNDA receptors in glial cells: pending questions.** *Current Neuropharmacology*. 11: 250-262, 2013.

EL-SAYED, NM; MYLER, PJ; BARTHOLOMEU, DC e cols. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** *Science*; 309: 409–415, 2005.

FERNANDES, CD; TIECHER, FM; BALBINOT, MM; LIARTE, DB; SCHOLL, D; STEINDEL, M; ROMANHA, A. **Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(1): 27-32, 2009.

FRANZÉN, O; OCHYA, S; SHERWOOD, E; LEWIS, MD; LLEWELLYN, MS; MILES, MA; ANDERSSON, B. **Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener.** *PLoS Negl Trop Dis*. 5(3), 2011.

FREUNSCHT, I; POPP, B; BLANK, R; ENDELE, S; MOOG, U; PETRI, H; PROTT, EC; REIS, A; RÜBO, J e cols. **Behavioral phenotype in five individuals with de novo mutations within the GRIN2B gene.** *Behav Brain Funct*. 9(1): 20, 2013.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva.** São Paulo: FUNPEC. 3ª ed., 2009.

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

GEORGE, C.M.; ALANI, E. **Multiple cellular mechanisms prevent chromosomal rearrangements involving repetitive DNA.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 47(3): 297-313, 2012.

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



GIRALDO-PEREZ, P; GODDARD, MR. **A parasitic selfish gene that affects host promiscuity.** *Proc Biol Sci.* 280(1770), 2013.

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

GLUSMAN, G; YANAI, I; RUBIN, I e cols. **The complete olfactory subgenome.** *Genome Res.* 11: 685-702, 2001.

GLUENZ, E; POVELONES, ML; ENGLUND, PT; GULL, K. **The kinetoplast duplication cycle in *Trypanosoma brucei* is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis.** *Mol Cell Biol.* 31(5): 1012-1021, 2011.

GOODIER, JL; KAZAZIAN, HH JR. **Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites.** *Cell.* 135: 23-35, 2008.

GRAHAM, T; BOISSINOT, S. **The genomic distribution of L1 elements: the role of insertion bias and natural selection.** *J Biomed Biotechnol.* 2006(1), 2006.

GRANT, IH; GOLD, JW; WITTNER, M e cols. **Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States.** *Annals of International Medicine;* 111: 849-851, 1989.

GUEDES, PMM; GUTIERREZ, F; NASCIMENTO, M; DO-VALLE-MATTA, MA; SILVA, JS. **Antiparasitical chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence.** *Tropical Medicine and International Health.* 17(9): 1057-1065, 2012.

GUIMARO, M. C. **Herança e fixação de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Gallus gallus*: alterações genotípicas e miocardiopatia autoimune.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília – DF, Brasil, 2012.

GUTIERREZ, FRS; GUEDES, PMM; GAZZINELLI, RTLIVA, JS. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite Immunology*, 31: 673-685, 2009.

HAUDEBOURG, J; HOCH, B; FABAS, T; BUREL-VANDENBOS, F; CARPENTIER, X; AMIEL, J; CARDOT-LECCIA, N; MICHIELIS, JF; PEDEUTOUR, F. **A novel case of t(X;1)(p11.2;p34) in a renal cell carcinoma with TFE3 rearrangement and favorable outcome in a 57-year-old patient.** *Cancer Genet Cytogenet.* 200(2):75-78, 2010.

HECHT, MM. **Transferência horizontal de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e herança vertical das mutações.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília – DF, Brasil, 2008.

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

HEYNINGEN, V; YEYATI, PL. **Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease.** *Human Molecular Genetics.* 13(2): 225-233, 2004.

HOTOPP, JCD. **Horizontal gene transfer between bactéria and animais.** *Trends in Genetics.* 27(4): 157-163, 2011.

HOWARD, EJ; XIONG, X; CARLIER, Y; SOSA-ESTANI, S; BUEKENS, P. **Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis.** *BJOG*; DOI: 10.1111/1471-0528.12390, 1-12, 2013.

HUANG, J. **Horizontal gene transfer in eukaryotes: The weak-link model.** *BioEssays.* 35(10): 868-875, 2013.

IVANCEVIC, AM; WALSH, AM; KORTSCHAK, RD; ADELSON, DL. **Jumping the fine LINE between species: horizontal transfer of transposable elements in animals catalyses genome evolution.** *Bioessays.* 35, 2013.

JACKSON, Y; MYERS, C; DIANA, A; MARTI, HP; WOLFF, H; CHAPPUIS, F; LOUTAN, L; GERVAIX, A. **Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland.** *Emerg Infect Dis.* 15: 601–603, 2009.

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

JUNG; YD; AHN, K; KIM, YJ; BAE, JH; LEE, JR; KIM, HS. **Retroelements: molecular features and implications for disease.** *Genes Genet. Syst.* 88: 31-43, 2013.

JURKA, J. **Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(5):1872-7, 1997.

KANO, H; GODOY, I; COURTNEY e cols. **L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism.** *Genes Dev.* 23: 1303-1312, 2009.

KAZAZIAN, HH JR. **Mobile elements and disease.** *Current Opinion in Genetics & Development.* 8: 343-350, 1988.

KIDWELL, MG. Transposable Elements. In: GREGORY, TR. (Org) **The Evolution of the Genome.** San Diego, CA: Elsevier. 165-221, 2005.

KIRCHHOFF, LV. **American Trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the united states.** *Infect Dis Clin North Am.* 7(3): 487-502, 1993.

KJOS, SA; MARCET, PL; YABSLEY, MJ; SNOWDEN, KF; LOGAN, KS; BARNES, JC; DOTSON, EM. **Identification of bloodmeal sources and *Trypanosoma cruzi* infection in triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidea) from residential settings in Texas, the United States.** *J Med Entomol.* 50(5): 1126-1139, 2013.

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

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

KOONIN, EV; MAKAROVA, KS; ARAVIND, L. **Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification.** *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 709-742, 2001.

KORENBERG, JR; RYKOWSKI, MC. **Human genome organization: Alu, lines, and molecular structure of metaphase chromosome bands.** *Cell.* 53(3): 391-400, 1988.

LASCURE, FX; LE LOUP, G; FREILIJ, H; DEVELOUX, M; PARIS, L; BRUTUS, L; PIALOUX, G. **Chagas disease: changes in knowledge and management.** *Lancet infect dis.* 10: 556-570, 2010.

LAURIA-PIRES, L; BRAGA, MS; VEXENAT, AC; NITZ, N; SIMÕES-BARBOSA, A; TINOCO, DL; TEIXEIRA, ARL. **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** *Am J Trop Med Hyg,* 63(3, 4): 111-118, 2000.

LAZARTE, RA e cols. **Congenital transmission of Chagas disease-Virginia, 2010.** *MMWRMorb. Mortal. Wkly. Rep.* 61:477-479, 2012.

LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, SA; AGBO, EEC; ENGLUND, PT. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *TRENDS in Parasitology.* 21(8): 365-369, 2005.

LIU, Y; ENGLUND, PT. **The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication.** *Molecular Microbiology.* 64(3): 676-690, 2007.

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

LORETO, ELS; CARARETO, CMA; CAPY, P. **Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila***. *Heredity*. 100: 545-554, 2008.

LUKES, J; GUILBRIDE, DL; VOTÝPKA, J; ZÍKOVÁ, A; BENNE, R; ENGLUND, PT. **Kinetoplast DNA Network: evolution of an improbable structure**. *Eukaryotic Cell*. 1(4): 495–502, 2002.

LUKES, J; HASHIMI, H; ZÍKOVÁ, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptoma in kinetoplastid flagellates**. *Curr Genet*. 48: 277–299, 2005.

MACHADO-DE-ASSIS, GF; DINIZ, GA; MONTOYA, RA; DIAS, JC; COURA, JR; MACHADO-COELHO, GL; ALBAJAR-VIÑAS, P; LANA, MD. **A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(7): 873-880, 2013.

MALNIC, B; GODFREY, PA; BUCK, LB. **The human olfactory receptor gene family**. 101(8): 2584-2589, 2004.

MALNIC, B; GONZALEZ-KRISTELLER, DC; GUTTIYAMA, LM. Odorant receptor. In: MENINI, A (Ed). **The neurobiology of olfaction**. Boca Raton(FL): CRC Press; 2010.

MÁRQUEZ, E; CRESPO, M; MIR, M; PÉREZ-SÁEZ, ML; QUINTANA, S; BARBOSA, F; PASCUAL, J. **Chagas' disease and kidney donation**. *Nefrología*; 33(1):128-133, 2013

MARTÍNEZ, I; LANDÍN-CERVANTES, A; ESPINOZA, B. **Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas**. *Gaceta Médica de México*. 149: 363-365, 2013.

MARTÍNEZ-GARAY, I; TOMÁS, M; OLTRA, S; RAMSER, J; MOLTÓ, MD; PRIETO, F; MEINDL, A; KUTSCHE, K; MARTÍNEZ, F. **A two base pair deletion in the PQBP1 gene is associated with microphthalmia, microcephaly, and mental retardation**. *Eur J Hum Genet*. 15(1):29-34, 2007.

MATVEEVA, TV; BOGOMAZ, DI; PAVLOVA, OA; NESTER, EW; LUTOVA, LA. **Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the Plant *Linaria* in *Nature*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(12): 1542-1551, 2012.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). **Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V38, supp III, 2005.**

MONCAYO, A; SILVEIRA, AC. **Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (suppl 1): 17–30, 2009.**

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

MOWER, JP; STEFANOVIC, S; YOUNG, GJ; PALMER, JD. **Gene transfer from parasitic to host plants. *Nature*. 432: 165-166, 2004.**

MUKKAMALA, K; GENTILE, RC; WILLNER, J; TSANG, S. **Choroidemia in a woman with ectodermal dysplasia and complex translocation involving chromosomes X, 1 e 3. *Ophthalmic Genet*. 31(4):178-182, 2010.**

MUNÓZ-CALDERÓN, A; DÍAZ-BELLO, Z; VALLADARES, B; NOYA, O; LÓPEZ, MC; NOYA DE ALRCÓN, B; THOMAS, MC. **Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vector and reservoirs. *Infection, Genetics and Evolution*, 17: 113-122, 2013.**

NAVIN, TR; ROBERTO, RR; JURANEK, DD; LIMPAKARNJANARAT, K; MORTENSON, EW; CLOVER, JR; YESCOTT, RE; TACLINDO, C; STEURER, F; ALLAIN, D. **Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. *AJPH*. 75(4): 366-369, 1985.**

NICKERSON, P; ORR, P; SCHROEDER, ML; SEKLA, L; JOHNSTON, JB. **Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Annals of Internal Medicine*; 111: 851-853, 1989.**

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

NITZ N; GOMES, C; ROSA, A C; D'SOUZA-AULT, MR; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NACIMENTO, RJ; TEIXEIRA, ARL. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell*. 23(118): 175-186, 2004.

NORMAN, FF; LÓPEZ-VÉLEZ, R. **Chagas disease and breast-feeding.** *Emerg Infect Dis*. 19(10): 1561-1566, 2013.

OCHSENREITER, T; CIPRIANO, M; HAJDUK, SL. **KISS: The kinetoplastid RNA editing sequence search tool.** *RNA*. 13: 1-4, 2007.

OHTSUKI, T; SAKURAI, K; DOU, H; TORU, M; UAMAKAWA-KOBAYASHI; ARINAMI, T. **Mutation analysis of the MNDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia.** *Molecular Psychiatry*, 6: 211–216, 2001.

OLIVEIRA, JC. **Epigenética e doenças humanas.** *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 33(1): 21-34, 2012.

PACE, JK II; GILBERT, C; CLARK, MS; FESCHOTTE, C. **Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods.** *PNAS*. 105(44): 17023-17028, 2008.

PEREIRA, KS; SCHMIDT, FL; MARBOSA, RL; GUARALDO, AMA; FRANCO, RMB; DIAS, VL; PASSOS, LAC. **Transmission of Chagas disease (American trypanosomiasis) by Food.** In: *Advances in Food and Nutrition Research*. 59(3): 63-85, 2010.

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

PIERCE, BA. **Genética: um enfoque conceitual.** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1ªed, 2004.

PIMENTEL, CFR. **Herança de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência do nDNA do *Trypanosoma cruzi***. 2012. Tese (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

PINTO, AYN; VALENTE, VC; COURA, JR; VALENTE, SAS; JUNQUEIRA, ACV; SANTOS, LC; FERREIRA JR, AG; MACEDO, RC. **Clinical follow-up of Responses to treatment with Benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease**. *PLoS ONE*. 8(5): e64450. doi:10.1371/journal.pone.0064450, 2013.

POULADI, MA; MORTON, AJ; HAYDEN, MR. **Choosing an animal model for the study of Huntington's disease**. *Nat Rev Neurosci*. 14(10): 708-721, 2013.

PRAK, ETL; KAZAZIAN, HH JR. **Mobile elements and the human genome**. *Nat Rev Genet*. 1(2): 134-44, 2000.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease**. *Lancet Infect Dis*. 1(2): 92-100, 2001.

PRIBIL, PA; HANIFORD, DB. **Target DNA bending is an important specificity determinant in target site selection in Tn10 transposition**. *J Mol Biol*. 330 (2): 247-259, 2003.

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

RAMÍREZ, JD; MONTILLA, M; CUCUNUBÁ, ZM; FLORÉZ, AC; ZAMBRANO, P; GUHL, F. **Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia**. *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e2041. doi:10.1371/journal.pntd.0002041, 2013.

RASSI, AJr; RASSI, A; MARIN-NETO, JA. **Chagas disease**. *Lancet*, 375: 1388–1402, 2010.

RAY, DA; WALKER, JA; BATZER, MA. **Mobile element-based forensic genomics**. *Mutation Research*. 616: 24-33, 2007.



RAY, DS. **Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of Trypanosomes.** *Molecular and Cellular Biology*. 9(3): 1365-1367, 1989.

REBOLO, R; ROMANISH, MT; MAGER, DL. **Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes.** *Annu. Rev. Genet.* 46: 21-42, 2012.

RIBEIRO, CH; LÓPEZ, NC; RAMÍREZ, GA; VALCK, CE; MOLINA, MC; AGUILAR, L; RODRÍGUEZ, M; MALDONADO, I; MARTÍNEZ, R; GONZÁLEZ, C; TRONCOSO, R; LAVANDERO, S; GINGRAS, AR; SCHWARBLE, W; FERREIRA, A. ***Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity.** *Molecular Immunology*. 46: 1092–1099, 2009.

RIBEIRO, JM; FLORÊNCIO, LP. **Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT<sub>1</sub>.** *Rev Bras Hipertens*. 3: 293-302, 2000.

RIOS, A. **Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*.** 2013. Tese (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

ROS, VID; HURST, GDD. **Lateral gene transfer between prokaryotes and multicellular eukaryotes: ongoing and significant?** *BMC Biology*. 7(20), 2009.

ROSE, E. **Transferência vertical de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no modelo *Gallus gallus*.** 2013. Tese (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** *Cold Spring Harbor, NY*; 3<sup>a</sup> Ed, Cap. 6, 7-12, 2001.

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

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

SCHMUNIS, GA. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Vol. 102(Suppl. I): 75-85, 2007.

SCHMUNIS, GA; YADON, ZE. **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica.* 115: 14–21, 2010.

SHEEN, VL; TORRES, AR; DU, X; BARRY, B; WALSH, CA; KIMONIS, VE. **Mutation in PQBP1 is associated with periventricular heterotopia.** *Am J Med Genet A.* 152A(11): 2888–2890, 2010.

SHIINA, T; ANDO, A; SUTO, Y; KASAI, F; SHIGENARI, A; TAKISHIMA, N; KIKKAWA, E e cols. **Genomic anatomy of a premier major histocompatibility complex paralogous region on chromosome 1q21-q22.** *Genome Res.* 11(5):789-802, 2001.

SIMÕES-BARBOSA, A; ARGARNARAZ, ER; BRARROS, AM; ROSA, AC; ALVES, NP; LOUVANDINI, P; D'SOUZA-AULT, MR; NITZ, N; STURM, NR, NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, AR. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, V101(8): 833-843, 2006.

SIMÕES-BARBOSA, A; BARROS, AM; NITZ, N; ARGANARAZ, ER; TEIXEIRA, ARL. **Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients.** *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. Vol. 94, Suppl. I: 249-252, 1999.

SNUSTAD, DP; SIMMONS, MJ. **Fundamentos da genética.** Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2ªed, 2001.

SOLYOM, S; KAZAZIAN, HH JR. **Mobile elements in the human genome: implications for disease.** *Genome Medicine.* 4(12), 2012.

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

SOUZA, W. **Structural organization of *Trypanosoma cruzi*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(Suppl. I): 89-100, 2009.

STRASEN, J; WILLIAMS, T; ERLS, G; ZOLLER, T; STICH, A; RITTER, O. **Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge.** *Clin Res Cardiol.* 2013.

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

SUDOL, M; McDONALD, CB; FAROOG, A. **Molecular insights into the WW domain of the Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1.** *FEBS Lett.* 586(17): 2795-2799, 2012.

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

TARABEUX, J; KEBIR, O; GAUTHIER, J; HAMDAN, FF; XIONG, L; PITON, A; SPIEGELMAN, D e cols. **Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autismo spectrum disorders and schizophrenia.** *Transl Psychiatry.* 1(55), 2011.

TARLETON, RL. **Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease.** *International Journal for Parasitology.* 31: 550-554, 2001.

TAVARES, A. **Polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares.** *Rev Bras Hipertens.* 7(3): 237-242, 2000.

TEIXEIRA, A. **Doença de Chagas e evolução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1<sup>a</sup> ed., 2007.

TEIXEIRA, AR; LACAVA, Z; SANTANA, JM; LUNA, H. **Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 24(1), 55-58, 1991.

TEIXEIRA, AR; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. **Evolution and pathology in Chagas disease – A review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(5): 463-491, 2006a.

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

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

TEIXEIRA, ARL; GOMES, C; NITZ, N; SOUSA, AO; ALVES, RM; GUIMARO, MC; CORDEIRO, C; BERNAL, FM; ROSA, AC; HEJNAR, J; LEONARDECZ, E; HECHT, M. ***Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism**. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3), 2011a.

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

THOMAZ, S; MARTINEZ, IT; WESTENBERGER, SJ; SURM, NR. **A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing**. *BMC Genomics*. 8(133), 2007.

TZSCHACH, A; HOELTZENBEIN, M; HOFFMAN, K; MENZEL, C; BEYER, A; OCKER, V; WURSTER, G; RAYNAUD, M; ROPERS, HH; KALSCHEUER, V; HEILBRONNER, H. **Heterotaxy and cardiac defect in a girl with chromosome translocation t(X;1)(q26;p13.1) and involvement of ZIC3**. *Eur J Hum Genet*. 14(12):1317-1320, 2006.

VAN DEN HURK, JA; MEIJ, IC; SELEME, MC; KANO, H; NIKOPOULOS, K e cols. **L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development.** *Hum Mol Genet.* 16: 1587-1592, 2007.

VELAZQUEZ, M; DIEZ, CN; MORA, C; DIOSQUE, P; MARCIPAR, IS. **Trypanosoma cruzi: An analysis of the minicircle hypervariable regions diversity and its influence on strain typing.** *Exp Parasitol.* 120(3): 235-41, 2008.

VICCO, MH; FERINI, F; RODELES, L; CARDONA, P; BONTEMPI, I; LIOI, S; BELOSCAR, J; NARA, T; MARCIPAR, I; BOTTASSO, OA. **Assessment of Cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease.** *Rev Esp Cardiol.* 2013.

VLAHOVICEK, K.; KAJAN, L.; PONGOR, S. **DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS.** *Nucleic Acids Res.* 31(13):3686-3687, 2003.

WERREN, JH. **Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation.** *PNAS.* 108(2): 10.863-10.870, 2011.

WESTENBERGER, SJ; CERQUEIRA, GC; EL-SAYED, NM; ZINGALES, B; CAMPBELL, DA; STURM, NR. **Trypanosoma cruzi mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region.** *BMC Genomics.* 7(60), 2006.

WETERMAN, MAJ; DIJKHUIZEN, MWT; BERG, E. KESSEL, G. **Fine mapping on the 1q21 breakpoint of the papillary renal cell carcinoma-associated (X;1) translocation.** *Hum genet.* 98: 16-21, 1996.

WITHERSPOON, DJ; MARCHINI, EE; WATKINS, WS; OSTLER, CT e cols. **Human population genetic structure and diversity inferred from polymorphic L1 (LINE-1) and Alu insertions.** *Hum Hered.* 62:30-46, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of Chagas disease: second report of a WHO Expert Committee.** *Technical Report Series N<sup>o</sup>.* 905, 120p, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research Priorities for Chagas Disease, HAT and Leishmaniasis.** *Technical report series* N° 975, 110p, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** *Annual report*, 75-81, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases.** *Secretariat Report*. A66/20, 2013.

YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity.** *Parasitology International*, 57: 105–109, 2008.

ZINGALES, B; MILES, MA; CAMPBELL, DA; TIBAYREC, M; MACEDO, AM; TEIXEIRA, MMG; SCHIJMAN, AG e cols. **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Infection, Genetics and Evolution* .12: 240-253, 2012.

## ANEXO 1

**Tabela A1 – Sequências de DNA de humano com integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi***

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
A	1406	MBH159	1-294 523-554	286-521	AATCGAACC/ CTCCGGTGTACAGCTCCCA	0.0	92%	2e <sup>-111</sup>	99%	14	AL049875.2 (LINE-1)
A	1406	MBH178	35-153 331-488	139-280 223-337 474-546	CCCTCCCAAGACTAA/ TAGACCA/ CCCTCCCAAGACTAA	9e <sup>-33</sup> 2e <sup>-21</sup>	88% 91%	2e <sup>-40</sup> 5e <sup>-43</sup> 3e <sup>-20</sup>	87% 96% 93%	X	AL732374.14 (LINE-1)
A	1406	MBH179	137-417	1-137	GACCGCCC	6e <sup>-21</sup>	91%	1e <sup>-55</sup>	96%	?	AC234421.2 (Indeterminado)
A	1406	MBH180	36-188	180-227	CCCTCCCAA	6e <sup>-5</sup> 7e <sup>-17</sup>	94%	1e <sup>-12</sup>	98%	3	AC027296.21 (LINE-1)
A	1406	MBH181	183-450	1-189	GAAGGCCC	1e <sup>-17</sup>	93%	3e <sup>-89</sup>	99%	6	NG_008678.1 (LINE-1)
A	1406	MBH182	35-428 461-526	420-467 518-565	TTTGAACGCCCTCCCAA/ ACACCAA/ CCCTCCCAA	9e <sup>-21</sup> 5e <sup>-05</sup>	91% 93%	5e <sup>-11</sup> 4e <sup>-12</sup>	96% 98%	3	AC027296.21 (LINE-1)
A	1406	MBH183	168-411	11-186 400-445	ATAATGTACGGGTGAGATG/ CTCCCAAGACTA	6e <sup>-21</sup>	91%	4e <sup>-74</sup> 2e <sup>-8</sup>	93% 97%	10	AC073585.8 (Indeterminado)
A	1406	MBH184	314-716	1-323 703-750	GAAGGCCCT/ CCCTCCCAAGACTA	1e <sup>-20</sup>	91%	3e <sup>-154</sup> 6e <sup>-12</sup>	98% 98%	X 3	Z84481.1 (LINE-1) AC027296.21 (LINE-1)
A	1419	MBH188	197-478	23-182	GAAGGCCCC	4e <sup>-30</sup>	88%	7e <sup>-65</sup>	96%	18	AC079052.4 (Indeterminado)
A	1419	MBH191	1-531 667-802	516-675 803-865	CCCCCTCCAAAACC/ GAAGGCCCC	5e <sup>-20</sup> 7e <sup>-18</sup>	94% 89%	3e <sup>-67</sup> 4e <sup>-15</sup>	97% 94%	18 9	AC079052.4 (Indeterminado) NG_008246.1 (Indeterminado)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
A	1419	MBH205	74-222 248-432	12-92 212-263	CTCCGGTGTACAGCTCCCA/ CCCATGGAACC/ CTCCGG	2e <sup>-29</sup> 6e <sup>-14</sup>	86% 80%	2e <sup>-27</sup> 4e <sup>-16</sup>	96% 100%	12	AC129028.3 (Indeterminado) NG_031854.1 (Gene)
A	1419	MBH206	1-530 562-663	508-561	CCAATGGAACCTCTCTCC TGTG	1e <sup>-24</sup> 3e <sup>-5</sup>	86% 97%	2e <sup>-15</sup>	98%	12	NG_031854.1 (Gene)
A	1419	MBH215	90-239 345-781	11-98 240-363	GAAGCCCCC/ GAAGCCCCCTCCCAAACC	1e <sup>-8</sup> 2e <sup>-25</sup>	87% 76%	1e <sup>-33</sup> 2e <sup>-49</sup>	99% 97%	18 1	AC018522.7 (ERV) NG_012122.1 (Gene REN)
A	1420	MBH193	209-292 430-608	13-226 293-445 609-849	GACGCCCCCTCCCAAAAC/ GAAGCCCCCTCCCAAA	5e-11 1e-11	98% 98%	2e-95 2e-63 2e-113	97% 97% 99%	13 8 7	AL356580.13 (SINE) DQ835666.1 (Indeterminado) AC011992.3 (Indeterminado)
A	1420	MBH194	1-538	523-619	CCACCCCAAAGGTTGA	6e <sup>-10</sup>	98%	4e <sup>-24</sup>	89%	11	AC239832.3 (Indeterminado)
A	1420	MBH198	20-109 212-310 345-401	98-226 302-357 392-488	CTACAGTCCCCA/ TGAAGCCCCCTCCCA/ CAGTCCCCA/ GACGCCCCCTCCC/ CCACCCCAAA	2e <sup>-28</sup> 1e <sup>-75</sup> 5e <sup>-10</sup>	98% 80% 90%	2e <sup>-52</sup> 8e <sup>-14</sup> 5e <sup>-23</sup>	97% 95% 88%	X 9 11	AL450472.14 (ERV) AL391056.25 (Indeterminado) AC139749.4 (Indeterminado)
A	1420	MBH200	37-380 477-633	1-44 366-483 619-735	TACACCAA/ CCTTCCCAAGACTAA/ TACACCA/ CCCTCCCAAGACTAA	1e <sup>-25</sup> 6e <sup>-24</sup>	95% 94%	5e <sup>-6</sup> 8e <sup>-42</sup> 6e <sup>-37</sup>	91% 94% 92%	X	AL732374.14 (LINE-1)
A	1420	MBH203	38-156 251-407 433-579	1-45 141-257 393-440 575-647	TACACCAACCCTCCCAAG/ ACTAAC / TACACCA/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACCAA / CCCTC	2e <sup>-35</sup> 5e <sup>-24</sup> 5e <sup>-24</sup>	91% 94% 94%	1e <sup>-6</sup> 4e <sup>-37</sup> 2e <sup>-09</sup> 6e <sup>-23</sup>	91% 92% 94% 96%	X	AL732374.14 (LINE-1)
A	1420	MBH225	1-263	260-420	AACC	2e <sup>-8</sup>	74%	4e <sup>-29</sup>	93%	X	AL732374.14 (LINE-1)



Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
A	1420	MBH226	1-634	631-791	AACC	6e <sup>-37</sup>	80%	9e <sup>-29</sup>	93%	X	AL732374.14 (LINE-1)
A	1420	MBH227	1-602	603-828	-	3e <sup>-22</sup>	80%	6e <sup>-44</sup>	92%	X	AL732374.14 (LINE-1)
A	1420	MBH231	1-36 80-463	37-92	GAAGCCCCCTCCC	2e <sup>-26</sup>	88%	5e <sup>-15</sup>	96%	7	NG_009261.1 (Indeterminado)
B	1488	MBH01	1-263	246-719	ACCAACCCCAATCGAACC	2e <sup>-5</sup>	84%	0.0	99%	12	AC084364.20 (Alu)
B	1488	MBH104	15-185 293-468	174-292	CCCAATCGAACC	8e <sup>-26</sup>	88%	1e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1488	MBH109	190-472	6-199	GACCGCCCCT	4e <sup>-10</sup>	84%	1e <sup>-85</sup>	97%	10	AC026225.5 (LINE-1)
B	1491	MBH03	20-239 347-710	228-346	CCCAATCGAACC	1e <sup>-25</sup> 3e <sup>-27</sup>	87% 88%	2e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (LINE-1 e ERV)
B	1491	MBH117	148-430	15-151	GAAG	3e <sup>-10</sup>	84%	1e <sup>-60</sup>	99%	X	AJ973596.1 (Gene PQBP1)
B	1492	MBH09	1-199	191-414	GGGAGATGC	1e <sup>-21</sup>	92%	4e <sup>-105</sup>	99%	6	CR936913.7 (Indeterminado)
B	1492	MBH10	1-687	684-845	AACC	3e <sup>-27</sup>	88%	4e <sup>-32</sup>	96%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1492	MBH14	1-263	246-719	ACCAACCCCAATCGAACC	2e <sup>-5</sup>	84%	0.0	99%	12	AC084364.20 (Alu)
B	1492	MBH128	848-1180	5-906	GAAGCCCC	3e <sup>-10</sup>	84%	0.0	99%	2	AC007363.3 (LINE-2 e Alu)
B	1493	MBH21	1-376 461-659	365-483	CCCAATCGAACC/ ACAGCTCCGGTCTACAGCT CCCA	1e <sup>-11</sup> 1e <sup>-25</sup>	100% 88%	1e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
B	1493	MBH135	26-240 348-524	229-347	CCCAATCGAACC	2e <sup>-26</sup> 6e <sup>-28</sup>	88% 88%	5e <sup>-48</sup>	97%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1493	MBH138	1-389	378-496	CCCAATCGAACC	1e <sup>-11</sup>	100%	1e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1494	MBH154	39-177	1-46 183-395	TACACCAA	2e <sup>-27</sup>	96%	2e <sup>-95</sup>	97%	5	AC129713.1 (LINE-1)
B	1386	MBH27	55-501	8-63 493-580	GAAGCCCCC	1e <sup>-24</sup>	87%	2e <sup>-15</sup> 4e <sup>-31</sup>	96% 97%	3 8	AC007917.15 (Indeterminado) NG_012005.1 (LINE-1)
B	1386	MBH28	1-487 700-1114	479-720	CAGTCCCCA / GAGGCCCTCCCAAAACC AT	9e <sup>-25</sup> 2e <sup>-21</sup>	87% 85%	1e <sup>-109</sup>	98%	21	AP001685.1 (ERV)
B	1386	MBH31	82-463 495-615	3-87 455-510	GAACCC/ ACAGTCCCC/ GAACCCCTCCCAA	2e <sup>-22</sup> 1e <sup>-4</sup>	86% 89%	8e <sup>-27</sup> 3e <sup>-13</sup>	96% 95%	2 14	AC009307.4 (Indeterminado) AL121839.3 (Indeterminado)
B	1386	MBH32	21-176 202-269 308-387	165-261 270-314	TCCCAAGACTAA / TACACCAA/ ACACCAA	4e <sup>-41</sup> 2e <sup>-19</sup>	94% 94%	3e <sup>-12</sup> 1e <sup>-9</sup>	100% 96%	8	NG_012005.1 (LINE-1)
B	1386	MBH35	20-210 243-392 496-646	204-249 385-501	CCCCTCCCAA/ ACACCA/ ACGCCCTCCAA/ ACACCAA	5e <sup>-23</sup> 1e <sup>-30</sup> 3e <sup>-20</sup>	94% 90% 90%	3e <sup>-38</sup> 3e <sup>-7</sup>	92% 91%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1386	MBH39	355-711	1-364	GAAGCCCCCT	6e <sup>-23</sup>	75%	1e <sup>-170</sup>	98%	9	AC243410.2 (Indeterminado)
B	1389	MBH43	70-313	7-74	ACACC	2e <sup>-24</sup>	94%	8e <sup>-17</sup>	89%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1389	MBH45	1-182	172-441	CCCAATCGAACC	4e <sup>-25</sup>	86%	5e <sup>-129</sup>	99%	Y	NG_001153.3 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
B	1389	MBH47	117-274 300-457	6-123 260-307 443-586	TACACCA/ CCCTCCCAAACTAA/ TACACCA/ CCCTCCCAAACTAA	4e <sup>-24</sup> 4e <sup>-24</sup>	94% 94%	6e <sup>-41</sup> 1e <sup>-5</sup> 2e <sup>-48</sup>	93% 88% 94%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1389	MBH48	1-204 644-1045	187-657	ACCAACCCCAATCGAACC / CATATAGCATCTCA	2e <sup>-10</sup>	89%	0.0	99%	12	AC084364.20 (Alu)
B	1389	MBH49	117-374 471-628 725-853	7-123 360-477 614-731	TACACCA/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACCA/ CCCTCCCAGACTAA/ TACACCA	6e <sup>-24</sup> 6e <sup>-24</sup> 3e <sup>-21</sup>	94% 94% 91%	5e <sup>-38</sup> 2e <sup>-43</sup> 4e <sup>-39</sup>	92% 95% 92%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1389	MBH51	118-274 327-524	7-124 260-332 510-627	ATACACCA/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA	5e <sup>-23</sup> 5e <sup>-23</sup>	93% 93%	1e <sup>-36</sup> 5e <sup>-23</sup> 1e <sup>-43</sup>	91% 96% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1389	MBH53	1-410 458-640	400-467 630-683	CCAATGGAACC/ GCTCCCATCT/ CCAATGGAACC	7e <sup>-16</sup> 1e <sup>-13</sup>	84% 79%	7e <sup>-16</sup> 3e <sup>-14</sup>	91% 96%	12	NG_031854.1 (Gene)
B	1389	MBH54	193-672	10-211 662-729	CTCCGGTGTACAGTCCCA/ CCAATGGAACC/ CCTCCGGTGTACAGTCCC ATCT	4e <sup>-25</sup> 2e <sup>-14</sup>	87% 96%	1e <sup>-89</sup> 8e <sup>-16</sup>	98% 91%	4 12	AC096768.3 (ERV) NG_031854.1 (Gene)
B	1389	MBH55	85-218 271-428	16-85 204-276 414-486	A/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACC/ CCTTCCCAAGACTAA	2e <sup>-13</sup> 3e <sup>-25</sup>	93% 95%	2e <sup>-21</sup> 1e <sup>-24</sup> 5e <sup>-22</sup>	96% 97% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1389	MBH56	38-194 247-403 456-612	1-45 180-252 389-461 598-670	TACACCA/ CCTTCCCAAGACTAA/ TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACC/ TCCCAAGACTAA	5e <sup>-24</sup> 1e <sup>-25</sup> 1e <sup>-25</sup>	94% 95% 95%	2e <sup>-9</sup> 7e <sup>-22</sup> 7e <sup>-22</sup> 7e <sup>-22</sup>	96% 95% 95% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1474	MBH57	1-365 446-598	336-451 588-680	ACACCA/ CCTCCCAAGAC	4e <sup>-31</sup> 6e <sup>-23</sup>	78% 93%	7e <sup>-41</sup> 4e <sup>-31</sup>	94% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
B	1474	MBH59	69-185 211-612	7-74 173-218 598-690	TACACC/ CTCCCAAGACTAA/ TACACCAA/ CCCTCCCAAACTAA	2e <sup>-35</sup> 2e <sup>-21</sup>	91% 91%	2e <sup>-16</sup> 6e <sup>-10</sup> 2e <sup>-28</sup>	89% 96% 92%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1474	MBH60	1-355 455-712 812-925 1025-1169	346-461 703-818 914-1031	CTCCCAAGAC/ TACACCA/ CTCCCAAGAC/ TACACCA/ CCCTCCCAAGAC/ TACACCA	2e <sup>-24</sup> 1e <sup>-22</sup> 4e <sup>-34</sup> 5e <sup>-20</sup>	85% 87% 90% 91%	1e <sup>-40</sup> 3e <sup>-42</sup> 2e <sup>-43</sup>	94% 95% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1474	MBH62	1-174 263-748	163-281 736-841	CCCAATCGAACC/ CTCCGGTCTACAGCTCCCA/ CCCAATCGAACC	2e <sup>-9</sup> 8e <sup>-29</sup>	95% 91%	8e <sup>-48</sup> 3e <sup>-40</sup>	97% 97%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1474	MBH63	1-152 559-654 742-795 839-1070	130-570 642-760 796-851	CCAACACCAACCCCAATCG AACC/ CTCCGGTGTACA/ CCCAATCGAACCC/ CTCCGGTCTACAGCTCCCA/ GAAGCCCCCTCC	1e <sup>-10</sup> 2e <sup>-20</sup> 7e <sup>-22</sup> 3e <sup>-29</sup>	98% 92% 98% 93%	0.0 2e <sup>-49</sup>	98% 98%	3 7 7	AC078793.13 (Indeterminado) AC012596.4 (ERV e LINE-1) NG_009261.1 (Indeterminado)
B	1474	MBH65	1-219 308-358	208-326	CCCAATCGAACC/ CTCCGGTCTACAGCTCCCA	1e <sup>-28</sup>	92%	7e <sup>-50</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1474	MBH66	1-426 515-620	415-533	CCCAATCGAACC/ CTCCGGTCTACAGCTCCCA	6e <sup>-28</sup> 9e <sup>-5</sup>	88% 94%	1e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1474	MBH70	62-121 321-645	1-57 118-319 637-697	ATAACGGGCTTTGATAC/ AACC/ CCCTCCCAA	8e <sup>-10</sup> 7e <sup>-32</sup>	93% 87%	5e <sup>-5</sup> 1e <sup>-45</sup> 5e <sup>-11</sup>	84% 83% 89%	10	AL513128.11 (LINE-1)
B	1487	MBH73	1-600	577-674	ATATCACACCAACCCCAATC GAAC	6e <sup>-42</sup>	88%	2e <sup>-23</sup>	87%	8	AC020783.8 (LINE-1 e LTR)
B	1487	MBH74	1-263 407-558	260-409	AACC/ GTT	7e <sup>-180</sup> 1e <sup>-62</sup>	95% 97%	4e <sup>-24</sup>	94%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1487	MBH75	1-263	260-336 363-491	AACC	6e <sup>-7</sup>	89%	9e <sup>-19</sup> 5e <sup>-47</sup>	90% 94%	X	AL732374.14 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
B	1487	MBH76	9-294 404-533	312-410	GACCGCC	1e <sup>-29</sup> 6e <sup>-28</sup>	93% 89%	7e <sup>-40</sup>	99%	6	AL773541.6 (Indeterminado)
B	1487	MBH78	11-738	727-845	CCCAATCGAACC	2e <sup>-29</sup>	93%	2e <sup>-49</sup>	98%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
B	1487	MBH82	39-444	1-45	ACACCAA	3e <sup>-24</sup>	94%	3e <sup>-12</sup>	100%	8	NG_012005.1 (LINE-1)
B	1487	MBH84	162-299	1-115 120-169 285-402	ACACCAA/ CCCTCCCAAGACTAA/ ACACCA	1e <sup>-28</sup>	80%	2e <sup>-40</sup> 5e <sup>-41</sup> 1e <sup>-11</sup>	94% 93% 94%	X 8	AL732374.14 (LINE-1) NG_012005.1 (LINE-1)
B	1487	MBH86	38-194 227-280	1-45 182-227	TACACCAA/ CTCCCAAGACTAA/ ACACCAA	3e <sup>-27</sup>	97%	2e <sup>-12</sup> 1e <sup>-7</sup>	100% 91%	8	NG_012005.1 (LINE-1)
B	1487	MBH87	385-584	27-401 573-645	GAACGCCCTCCCAAAA/ CCCTCCCAAAAC	2e <sup>-18</sup>	89%	0.0 3e <sup>-22</sup>	98% 95%	16 X	FP325312.10 (LINE-1 e Indeterminado) AL732374.14 (LINE-1)
B	1487	MBH88	1-48 185-522	59-196	GAAGCCCCCTCC	4e <sup>-4</sup> 8e <sup>-20</sup>	100% 90%	5e <sup>-60</sup>	99%	19	AC011497.6 (LINE-1)
B	1487	MB89	173-510	40-185	GAAGCCCCCTCCAAAACC	3e <sup>-98</sup>	93%	5e <sup>-60</sup>	97%	14	FJ515858.1 (Alu)
B	1487	MBH90	206-611	43-212	GAAGCCC	2e <sup>-20</sup>	91%	5e <sup>-80</sup>	100%	16	AC007216.2 AC007216 (Alu)
B	1487	MBH92	1-26 177-255	41-191 243-303	GAAGGCCCTCCCAA/ CCCTCCCAAAACC	2e <sup>-17</sup>	95%	7e <sup>-62</sup> 2e <sup>-11</sup>	96% 89%	1	AL606843.16 (LINE-1)
B	1487	MBH93	62-248 298-475	231-303 461-533	CCTCCCAAAACCAAACC/ TACACC/ CCCTCCCAAAACCAA/ CACC	6e <sup>-15</sup> 8e <sup>-39</sup>	93% 92%	2e <sup>-20</sup> 6e <sup>-22</sup>	93% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
B	1487	MBH94	1-48 187-408	52-200	GAACGCCCTCCCA	$3e^{-4}$ $9e^{-18}$	100% 89%	$2e^{-58}$	95%	18	NG_026271.1 (Indeterminado)
B	1487	MBH95	478-678	37-457 666-726	CCCTCCCAAACC	$1e^{-20}$	91%	$1e^{-139}$ $1e^{-12}$	86% 90%	1 18	AL138799.9 (Alu) AC015961.16 (LINE-1)
B	1487	MBH96	39-231	219-291	CCCTCCCAAACC	$2e^{-17}$	88%	$3e^{-22}$	95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
B	1487	MBH97	707-789	1-719 775-834	GACCGCCCCTCCC/ CCTCCCAAACCAAA	$5e^{-19}$	95%	0.0 $5e^{-12}$	99% 90%	19 12	AC011495.8 (Alu) AC068794.25 (LINE-1)
C	1466	MBH338	1-301 537-837	271-537	CCAATCGAACC/ G	$8e^{-07}$ $4e^{-05}$	90% 86%	$2e^{-132}$	99%	Y	NG_001153.3 (LINE-1)
C	1466	MBH340	1-292	282-551	CCAATCGAACC	$1e^{-139}$	100%	$1e^{-132}$	99%	Y	NG_001153.3 (LINE-1)
C	1466	MBH341	1-284	274-543	CCAATCGAACC	$2e^{-11}$	81%	$6e^{-130}$	99%	Y	NG_001153.3 (LINE-1)
C	1467	MBH347	1-804	788-840	CCAACCCCAATCGAACC	$9e^{-29}$	89%	$5e^{-13}$	96%	3	AC078793.13 (Indeterminado)
C	1467	MBH348	1-558 661-711	547-664	CCCAATCGAACC/ CTCC	$3e^{-27}$	88%	$4e^{-20}$	83%	21	CU638690.5 (Indeterminado)
C	1467	MBH349	1-230 531-655	217-547	AACC/ CTCCGGTGTACAGCTCC	$3e^{-27}$ $4e^{-4}$	94% 94%	$9e^{-161}$	98%	X	AC236972.3 (LINE-2 e ERV)
C	1467	MBH352	1-91 222-729	83-232	CAGTCCCCA/ GAAGCCCCCTC	$3e^{-22}$ $9e^{-7}$	71% 97%	$3e^{-66}$	99%	5	AC106825.2 (LINE-2)
C	1467	MBH354	1-412 635-792	408-650	GAACC/ GACGGCCCCTCCCAAA	$6e^{-28}$ $2e^{-12}$	71% 95%	$6e^{-107}$	96%	3	AC119039.2 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
C	1467	MBH355	229-735	1-248	GAGAACCCCCCTCCCAAAA C	1e <sup>-26</sup>	91%	1e <sup>-108</sup>	97%	6	AL035469.7 (LINE-2)
C	1467	MBH356	210-948	1-228	GACCCCCCTCCCAAAACC	7e <sup>-45</sup>	71%	1e <sup>-103</sup>	100%	2	AC093616.5 (ERV)
C	1467	MBH358	126-236 269-288	1-132 228-275 285-418	ACACCAA/ CCCTTCCCAA/ ACACCAA/ AACC	3e <sup>-51</sup>	96%	2e <sup>-47</sup> 2e <sup>-9</sup> 1e <sup>-49</sup>	94% 94% 94%	13	AL355974.19 (LINE-1)
C	1467	MBH360	91-110 234-357 377-396 520-539	1-97 107-240 393-526	ACACCAA/ AACC/ ACACCAA/ CCCCTCCAAGACTAAACC AGGA/ ACACCAA/ AACC/ ACACCAA/ AACC	2e <sup>-10</sup> 9e <sup>-54</sup> 2e <sup>-10</sup> 2e <sup>-10</sup>	100% 98% 100% 100%	3e <sup>-33</sup> 6e <sup>-18</sup>	95% 95%	13 2	AL355974.19 (LINE-1) AC010983.9 (LINE-1)
C	1467	MBH364	1-120 140-159 283-407 570-675	99-146 156-289 386-433 443-576	CCCTCCAAGACTAAACCA GGA/ ACACCAA/ AACC/ ACACCAA/ CCTTCCAAGACTAAACCA GGA/ ACACCAA/ AACC/ ACACCAA	3e <sup>-48</sup> 2e <sup>-49</sup> 3e <sup>-28</sup>	96% 95% 95%	1e <sup>-24</sup> 1e <sup>-24</sup> 2e <sup>-9</sup>	94% 97% 96%	13	AL355974.19 (LINE-1)
C	1461	MBH381	73-576	11-91	CTCCGGTGTACAGCTCCCA	2e <sup>-29</sup>	93%	2e <sup>-27</sup>	96%	12	AC129028.3 (Indeterminado)
C	1461	MBH383	1-190 294-536 639-898	193-321 583-666	CTACAGTCCCCA/ GAAGCCCCCTCCCA/ CTACAGTCCCCAT/ GAAGCCCCCTCCCA	6e <sup>-14</sup> 2e <sup>-14</sup> 6e <sup>-14</sup>	98% 100% 98%	2e <sup>-50</sup> 1e <sup>-46</sup>	96% 94%	X	AL450472.14 (ERV)
C	1461	MBH386	1-190 294-535 639-898	179-307 524-652	CTACAGTCCCCA/ GAAGCCCCCTCCCA/ CTACAGTCCCCA/ GAAGCCCCCTCCA	6e <sup>-14</sup> 2e <sup>-14</sup> 6e <sup>-14</sup>	98% 100% 98%	2e <sup>-50</sup> 1e <sup>-46</sup>	96% 94%	X	AL450472.14 (ERV)
C	1461	MBH387	7-400 570-757 832-1119	391-579 746-840	TCGGCCAAAG/ GACCGCCCT/ CTACAGTCCCCA/ GAGGGCCCC	2e <sup>-12</sup> 9e <sup>-11</sup> 9e <sup>-11</sup>	100% 98% 98%	3e <sup>-87</sup> 2e <sup>-37</sup>	99% 99%	2 17	AC093166.6 (ERV) AC016889.28 (Indeterminado)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
C	1461	MBH389	91-242 274-392 446-642 669-868	1-91 236-281 378-450 630-675	A/ CTCCCAA/TACACCAA/ CCTTCCCAAGACTAA/ ACACC/ CTCCCAAGACTAA/ ACACCAA	1e <sup>-27</sup> 5e <sup>-32</sup> 2e <sup>-42</sup> 1e <sup>-40</sup>	87% 88% 95% 94%	9e <sup>-29</sup> 9e <sup>-10</sup> 4e <sup>-20</sup> 9e <sup>-10</sup>	93% 96% 93% 96%	X	AL732374.14 (LINE-1)
C	1461	MBH393	38-156 182-300 326-443 496-614 640-760	1-45 144-189 288-333 429-501 602-647	TACACCAA/ CTCCCAAGACTAA/ TACACCAA/ TACACCAA/ TACACCAA / CCCTCCCAAAACCAA/ TACACC /CTCCCAAGACTAA/ TACACCAA	8e <sup>-35</sup> 2e <sup>-37</sup> 5e <sup>-38</sup> 2e <sup>-37</sup> 7e <sup>-17</sup>	90% 92% 92% 92% 97%	1e <sup>-6</sup> 4e <sup>-7</sup> 4e <sup>-7</sup> 9e <sup>-22</sup> 4e <sup>-7</sup>	91% 91% 91% 95% 91%	X	AL732374.14 (LINE-1)
C	1470	MBH396	1-322 471-610	319-480	AACC/ GTCTTGGGAG	3e <sup>-10</sup> 3e <sup>-20</sup>	98% 97%	2e <sup>-29</sup>	93%	X	AL732374.14 (LINE-1)
C	1470	MBH398	1-383	371-484	CCCCAATCGAACC	9e <sup>-20</sup>	97%	5e <sup>-48</sup>	99%	21	CR382287.7 (LINE-1)
C	1470	MBH404	1-152 553-684	136-586	CCAACCCCAATCGAACC/ CCCGGACACTCTCCGGTGT ACAGCTCCCATCTCC	4e <sup>-12</sup> 5e <sup>-24</sup>	100% 91%	0.0	97%	19	AC138473.1 (LINE-1)
C	1470	MBH405	1-502 591-721	491-609	CCAATCGAACC/ CTCCGGTGTACAGTCCCA	1e <sup>-25</sup> 3e <sup>-28</sup>	73% 92%	7e <sup>-48</sup>	97%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)
C	1470	MBH406	1-244 371-504	225-382	TCTCCGGTCTACAGTCCCC A/ GACGCCCCCTCC	5e <sup>-23</sup> 6e <sup>-8</sup>	86% 93%	2e <sup>-66</sup>	97%	1	NG_017035.2 (Indeterminado)
C	1470	MBH409	1-260 314-411 460-817	247-318 403-473	GTCTACAGTCCCCA/ GACGG/ CAGTCCCCA/ GACCGCCCCCTCCCA	8e <sup>-10</sup> 2e <sup>-10</sup> 8e <sup>-23</sup>	82% 93% 83%	6e <sup>-24</sup> 1e <sup>-21</sup>	99% 96%	6 1	AL359380.16 (ERV) NG_032046.1 (LINE-1)
C	1470	MBH415	115-294 344-495	22-114 277-349	CCCTCCCAAAGCCAAACC/ TACACC	1e <sup>-38</sup> 1e <sup>-25</sup>	92% 78%	4e <sup>-30</sup> 2e <sup>-20</sup>	94 93%	X	AL732374.14 (LINE-1)
C	1470	MBH417	1-216 269-387 440-557 610-727 781-861	202-274 373-445 543-615 716-786	CCCTCCCAAAACCAA/ TACACC/ CCCCTCCCAAAACCAA/ TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA/	6e <sup>-25</sup> 2e <sup>-37</sup> 3e <sup>-35</sup> 5e <sup>-32</sup> 3e <sup>-22</sup>	78% 92% 90% 88% 93%	8e <sup>-23</sup> 4e <sup>-20</sup> 8e <sup>-23</sup> 8e <sup>-23</sup> 2e <sup>-23</sup>	96% 93% 96% 96% 97%	X	AL732374.14 (LINE-1)



Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
					TACACC/ CTCCCAAGACTA/ TACACC						
C	1471	MBH424	1-53	32-163	GGGAGATGCTGTACTTTCT GGG	2e <sup>-4</sup>	84%	2e <sup>-34</sup>	95%	14	AL135746.3 (Indeterminado)
C	1471	MBH425	1-241 323-789	231-329	ACAGTCCCCAA/ GACCGCC	1e <sup>-13</sup> 2e <sup>-12</sup>	92% 90%	1e <sup>-38</sup>	98%	6	NG_025928.1 (Pseudogene)
C	1471	MBH428	1-114 331-952	105-349 941-1059	CAAACGAACC/ CTCCGGTGTACAGCTCCCA/ CCCAATCGAACC	2e <sup>-45</sup> 2e <sup>-15</sup>	96% 96%	2e <sup>-113</sup> 2e <sup>-47</sup>	98% 97%	8 7	AF311103.5 (LINE-1) AC012596.4 (ERV)
C	1471	MBH430	74-176 266-395	12-92 165-283	CTCCGGTGTACGGCTCCCA / CCCAATCGAACC/ TCCGGTGTACAGCTCCCA	2e <sup>-7</sup> 8e <sup>-25</sup>	90% 86%	8e <sup>-25</sup> 4e <sup>-48</sup>	94% 97%	12 7	AC129028.3 (Indeterminado) AC012596.4 (ERV)
C	1471	MBH431	1-495 703-797	487-721	ACCCTACACCAACCCCAAT CGAACC/ CTCCGGTGTACAGCTCCCA	6e <sup>-51</sup> 2e <sup>-5</sup>	69% 94%	4e <sup>-109</sup>	98%	14	AL049875.2 (LINE-1 e ERV)
C	1471	MBH440	1-214 261-384 431-482 629-655	200-260 370-430 479-628	CCCTCCCAAGACTAAACCA GGA/ CCTTCCCAAGACTAA/ AACC/ GGCTCTGA	6e <sup>-61</sup> 6e <sup>-61</sup> 3e <sup>-14</sup> 3e <sup>-10</sup>	96% 96% 78% 100%	2e <sup>-15</sup> 4e <sup>-19</sup> 6e <sup>-61</sup>	93% 98% 96%	6	NG_023443.1 (LINE-1)
C	1460	MBH446	221-444	11-232	CTCCGGTGTACA	2e <sup>-28</sup>	88%	3e <sup>-101</sup>	98%	2	AC007358.2 (Alu)
C	1460	MBH447	596-747	11-599	CCCA	7e <sup>-25</sup>	87%	0.0	99%	X	AC231759.3  (LINE-1)
C	1460	MBH453	1-201	182-396	ACACCAACCCCAATCGAAC C	3e <sup>-12</sup>	88%	4e <sup>-93</sup>	96%	11	AC090159.12 (Indeterminado)
C	1460	MBH454	1-75	60-293	CCACCCCAAAGGTTGA	3e <sup>-10</sup>	89%	2e <sup>-77</sup>	89%	11	AC239832.3 (Indeterminado)
C	1460	MBH456	1-95 130-211	82-146	GTCTACAGTCCCCA/ GACCGCCCTCCCAAAA	8e <sup>-30</sup> 3e <sup>-15</sup>	91% 93%	3e <sup>-14</sup>	88%	14	AC016526 (Indeterminado)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
C	1460	MBH457	1-226	208-439	TCTCCGGTCTACAGTCCCC	1e <sup>-43</sup>	82%	1e <sup>-105</sup>	98%	16	AC007603.5 (SINE-2)
C	1460	MBH458	1-273 407-680 711-935	256-419 668-723	TCCGGTCTACAGTCCCCA/ GAAGCCCCCTCCC/ CCGGTCTACAGTC/ GAAGCCCCCTCCC	1e <sup>-20</sup> 1e <sup>-8</sup> 5e <sup>-7</sup>	91% 95% 93%	4e <sup>-72</sup> 1e <sup>-14</sup>	98% 96%	2 7	NG_007959.1 (Indeterminado) NG_009261.1 (Indeterminado)
C	1460	MBH460	19-394	376-443	TCCGGTCTACAGTCCCCA	1e <sup>-23</sup>	87%	1e <sup>-16</sup>	93%	1	AL136529.14 (Indeterminado)
C	1460	MBH470	36-226 329-485 511-553 745-856 888-967	1-43 219-335 474-518 548-751 848-894	TACACCAA/ CCTCCCA/ TACACCA/ TCCCAAGACTAA/ TACACCAA/ AACCCAC/ TACACCA/CCCTCCCAA/ TACACCA	7e <sup>-26</sup> 7e <sup>-39</sup> 2e <sup>-38</sup> 6e <sup>-12</sup> 1e <sup>-16</sup>	93% 91% 90% 98% 89%	4e <sup>-8</sup> 1e <sup>-40</sup> 3e <sup>-9</sup> 5e <sup>-83</sup> 1e <sup>-08</sup>	95% 94% 96% 95% 94%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1929	MBH253	1-48 166-371 492-649	34-165 372-498 635-707	CCCTCCCAAGACTAA/ TACACCA/ CCCTCCCAAGACTAA	9e <sup>-9</sup> 2e <sup>-24</sup> 4e <sup>-20</sup>	94% 95% 90%	1e <sup>-45</sup> 5e <sup>-44</sup> 7e <sup>-23</sup>	92% 93% 96%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1930	MBH256	1-581	569-631 613-707	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCTGGTTTAGTCT	3e <sup>-27</sup>	90%	2e <sup>-18</sup> 3e <sup>-28</sup>	97% 92%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	1930	MBH258	1-293	281-339 325-490	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCTGGTTTA	5e <sup>-30</sup>	93%	3e <sup>-19</sup> 3e <sup>-45</sup>	98% 93%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	1930	MBH263	1-276 302-736	265-331	CCAATGGAACCT/ CCGACACTCTCCGGTGTAC AGCTCCCATCT	1e <sup>-27</sup> 3e <sup>-22</sup>	90% 86%	3e <sup>-9</sup>	86%	12	NG_031854.1 (Gene)
D	1930	MBH264	1-218 307-845	207-325	CCCCAATCGAACC/ CTCCGGTGTACAGTCCCCA	1e <sup>-8</sup> 2e <sup>-25</sup>	95% 87%	1e <sup>-46</sup>	97%	7	AC012596.4 (ERV e LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
D	1930	MBH514	1-78 225-306 359-554	79-236 292-364 550-620	GACGCCCCCTCC/ CCCTCCCAAGACTAA/ TACACC	5e <sup>-11</sup> 1e <sup>-37</sup> 5e <sup>-12</sup>	98% 91% 89%	2e <sup>-66</sup> 2e <sup>-24</sup> 2e <sup>-24</sup>	97% 97% 99%	1 X	NG_017035.2 (Indeterminado) AL732374.14 (LINE-1)
D	1930	MBH515	1-582 715-841	569-726	TCTCCGGTCTACAG/ GACCCCCCTCC	3e <sup>-28</sup> 5e <sup>-5</sup>	89% 93%	2e <sup>-65</sup>	96%	1	NG_017035.2 (Indeterminado)
D	1956	MBH484	1-291 437-680	288-448	AACC/ TTAGTCTTGGGA	2e <sup>-5</sup> 5e <sup>-37</sup>	97% 90%	7e <sup>-29</sup>	93%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1956	MBH498	4-117 196-352	103-196 338-385 436-546	CCCTCCCAAGACTAA/ A/ CTCTCCCAAGACTAA	2e <sup>-41</sup> 1e <sup>-19</sup>	95% 83%	4e <sup>-19</sup> 2e <sup>-9</sup> 7e <sup>-47</sup>	98% 94% 99%	6	NG_023443.1 (LINE-1)
D	1956	MBH499	1-149 198-388 448-664	150-204 380-452 650-848	ACACCAA/ CCCTCCCAA/ ACACC/ CCTTCCCAAGACTAA	2e <sup>-5</sup> 6e <sup>-12</sup> 1e <sup>-20</sup>	77% 83% 91%	2e <sup>-6</sup> 2e <sup>-17</sup> 2e <sup>-37</sup>	88% 90% 85%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1956	MBH501	1-175 291-313 422-539 581-697 805-884	160-290 314-429 526-585 694-805	CCCTCCCAAGACTAAC/ TAGACCAA/ CCTCCCAAGACTAA/ TCTGA/ AACC/ A	5e <sup>-26</sup> 2e <sup>-12</sup> 5e <sup>-39</sup>	96% 96% 92%	2e <sup>-17</sup> 2e <sup>-17</sup> 2e <sup>-17</sup> 7e <sup>-43</sup>	91% 98% 97% 96%	6	NG_023443.1 (LINE-1)
D	1957	MBH265	73-840	1-93	GACGCCCCCTCCCAAAACC AT	5e <sup>-26</sup>	71%	3e <sup>-28</sup>	93%	4	NG_029721.1 (LTR)
D	1957	MBH269	1-181 296-793	170-289	GTCCCCACCTCC/ GAAGCCCCCTCCCAAAACC AT	4e <sup>-8</sup> 1e <sup>-27</sup>	93% 69%	7e <sup>-43</sup>	94%	5	AC136605.2 (LINE-2)
D	1957	MBH273	38-98 206-360 390-529	1-45 76-206 349-396 526-637	TACACCAA/ ATTACACCAACCCCAATCG AACC/ A/ CCCTCCCAAGAC/ ACACCAA/ AACC	5e <sup>-82</sup> 5e <sup>-39</sup> 2e <sup>-48</sup>	81% 92% 87%	3e <sup>-9</sup> 2e <sup>-48</sup> 6e <sup>-11</sup> 1e <sup>-45</sup>	96% 100% 96% 98%	6	NG_023443.1 (LINE-1)
D	1957	MBH274	1-260 368-559	242-368 551-598	CACCAACCCCAATCGAACC/ A/ CCCTCCCAA	2e <sup>-31</sup> 4e <sup>-26</sup>	83% 72%	2e <sup>-48</sup> 5e <sup>-11</sup>	100% 96%	6	NG_023443.1 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
D	1957	MBH275	151-782	38-156 779-835	ACACCA/ ACACCAACCCCAATCGAAC C	3e <sup>-35</sup>	92%	2e <sup>-42</sup> 4e <sup>-08</sup>	94% 88%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1957	MBH278	1-192 232-323 411-490	171-231 320-431	CCCTCCCAAGACTAAACCA GGA/ AACCC/ CTCCCAAGACTAAACCAGG AA	4e <sup>-6</sup> 3e <sup>-27</sup>	76% 99%	4e <sup>-18</sup> 6e <sup>-47</sup>	97% 99%	6	NG_023443.1 (LINE-1)
D	1957	MBH531	601-772	1-614 758-830	GAACCCCCCTCCCA/ CCCTCCCAAAACCAA	1e <sup>-24</sup>	89%	0.0 9e <sup>-23</sup>	98% 96%	16 X	AC135012.2 (Indeterminado) AL732374.14 (LINE-1)
D	1958	MBH279	1-434	422-465 466-631	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-27</sup>	88%	2e <sup>-12</sup> 4e <sup>-45</sup>	100% 93%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	1958	MBH280	1-147	135-197 179-415	CCCCAATCGAACC/ CTTCTCCTGGTTTAGTCT	3e <sup>-9</sup>	95%	3e <sup>-16</sup> 4e <sup>-48</sup>	94% 91%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	1958	MBH281	1-722	710-772 754-848	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCTGGTTTAGTCT	3e <sup>-28</sup>	89%	2e <sup>-18</sup> 3e <sup>-29</sup>	97% 93%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	1958	MBH285	1-206	189-662	ACCAACCCCAATCGAACC	2e <sup>-93</sup>	98%	0.0	98%	12	AC084364.20 (Alu)
D	1958	MBH286	1-668 929-979	654-942	AACCCCAATCGAACC/ CTCCGGTGTACAGC	5e <sup>-13</sup> 3e <sup>-5</sup>	80% 95%	3e <sup>-137</sup>	98%	6	AL137181.8 (Indeterminado)
D	1958	MBH287	1-417 452-809	407-474	CCAATCGAACC/ CCTCCGGTGTACAGCTCCC ATCT	2e <sup>-25</sup> 2e <sup>-23</sup>	90% 88%	4e <sup>-14</sup>	90%	12	NG_031854.1 (Gene)
D	1958	MBH302	66-482 509-568	1-58 468-515	CCCTCCCAAGACTAA/ ACACCAA	6e <sup>-23</sup>	93%	2e <sup>-17</sup> 2e <sup>-9</sup>	98% 94%	19	AC124608.1 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
D	1958	MBH303	34-310 364-495	1-40 296-368	ACACCAA/ AACGCCCTCCCAAGACTA A/ ACACC	1e <sup>-25</sup>	95%	1e <sup>-6</sup> 6e <sup>-22</sup>	95% 95%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	1958	MBH304	1-288	276-343	CCCCAATCGAACC	8e <sup>-25</sup>	86%	3e <sup>-17</sup>	95%	1	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> )
D	1958	MBH473	1-117	109-201	CCCTCCCAA	5e <sup>-82</sup>	93%	2e <sup>-34</sup>	97%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	2011	MBH305	1-287	275-337 319-413	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCCTGGTTTAGTCT	8e <sup>-26</sup>	87%	9e <sup>-19</sup> 3e <sup>-31</sup>	97% 94%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	2011	MBH307	110-366 420-479	1-115 354-424	ACACCA/ CTCCCAAGACTAA/ ACACC	9e <sup>-26</sup>	95%	2e <sup>-40</sup> 7e <sup>-21</sup>	94% 94%	X	AL732374.14 (LINE-1)
D	2011	MBH472	1-296	284-346 328-492	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCCTGGTTTAGTCT	1e <sup>-25</sup>	87%	3e <sup>-19</sup> 2e <sup>-46</sup>	97% 94%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	2015	MBH320	1-291	271-341 323-417	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCCTGGTTTAGTCT	9e <sup>-26</sup>	87%	1e <sup>-18</sup> 1e <sup>-29</sup>	97% 93%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	2015	MBH322	1-431	419-481 463-628	CCCCAATCGAACC/ CTTATTCCTGGTTTAGTCT	1e <sup>-25</sup>	88%	2e <sup>-19</sup> 1e <sup>-50</sup>	97% 96%	1 X	BC137023.1 (Gene RO <sub>1-17</sub> ) AL732374.14 (LINE-1)
D	2015	MBH323	1-290	273-894	ACCAACCCCAATCGAACC	6e <sup>-26</sup>	87%	0.0	98%	14	AL591768.2 (LINE-1)
D	2015	MBH324	1-225	222-323 292-496	AACC/ TTCCTGGTTTAGTCTTGGGA AGGTGTATGTGT	1e <sup>-24</sup>	95%	1e <sup>-24</sup> 8e <sup>-52</sup>	95% 94%	8 X	AC104006.6 (LINE-1) AL732374.14 (LINE-1)

Família	Paciente	Clone	kDNA	DNA Humano	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Cromossomo	Locus
D	2015	MBH328	21-71 175-841	1-39 60-178	CTCCGGGTGACAGCTCCCA/ CCCAATCGAACC/ CTCCGGGTGACAGCTCCCA	3e <sup>-29</sup>	90%	3e <sup>-4</sup> 9e <sup>-48</sup>	92% 97%	7	AC012596.4 (LINE-1 e ERV)
D	2015	MBH331	160-858	7-161	GAACCCCCCTCCC	2e <sup>-23</sup>	88%	5e <sup>-70</sup>	99%	2	NG_007959.1 (Indeterminado)
D	2015	MBH333	1-232 302-399 655-811	221-310 390-665	CTACAGTCCCCA/ GACCCCCCT/ CAGTCCCCAG/ GAACGCCCTC	2e <sup>-63</sup> 7e <sup>-75</sup> 5e <sup>-38</sup>	83% 80% 98%	5e <sup>-32</sup> 3e <sup>-130</sup>	97% 98%	8 3	AC127034.2 (ERV) AC026188.6 (Indeterminado)

## ANEXO 2

**Tabela A2 – Sequências de DNA humano com integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* resultantes da *tpTAIL*-PCR específica para o gene RO<sub>1-17</sub> do locus BC137023.1.**

Família	Paciente	Clone	kDNA	Locus RO <sub>1-17</sub>	Micro-homologia	kDNA <i>E-value</i>	kDNA Identidade	DNA humano <i>E-value</i>	DNA humano Identidade	Observação
C	1457	MBH235	1-89	77-307	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-30</sup>	92%	2e <sup>-113</sup>	100%	-
C	1457	MBH236	1-89	77-306	CCCCAATCGAACC	9e <sup>-30</sup>	91%	1e <sup>-109</sup>	99%	-
C	1457	MBH237	1-175	163-393	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-41</sup>	96%	1e <sup>-110</sup>	99%	-
C	1470	MBH240	1-582	570-800	CCCCAATCGAACC	5e <sup>-37</sup>	92%	5e <sup>-113</sup>	100%	-
C	1471	MBH248	1-94	82-312	CCCCAATCGAACC	4e <sup>-35</sup>	96%	2e <sup>-113</sup>	100%	-
C	1471	MBH250	1-94	82-312	CCCCAATCGAACC	2e <sup>-32</sup>	93%	1e <sup>-110</sup>	99%	-
D	1958	MBH480	1-355	339-568	CCCCAATCGAACCACCA	1e <sup>-22</sup>	92%	4e <sup>-111</sup>	99%	-
D	1958	MBH481	1-275 327-500	655-885	CCCTCCCAA/ CCCTC	5e <sup>-23</sup> 1e <sup>-25</sup>	95% 95%	4e <sup>-114</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 267-326 (2e <sup>-16</sup> /95%) 496-613 (5e <sup>-43</sup> /95%)
D	1958	MBH482	1-155	143-373	CCCCAATCGAACC	6e <sup>-52</sup>	83%	1e <sup>-111</sup>	99%	-

Família	Paciente	Clone	kDNA	Locus RO <sub>1-17</sub>	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Observação
D	1929	MBH502	1-412	400-630	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-23</sup>	93%	7e <sup>-113</sup>	100%	-
D	1929	MBH503	1-262	250-476	CCCCAATCGAACC	1e <sup>-17</sup>	86%	5e <sup>-111</sup>	100%	-
D	1930	MBH506	1-420	408-637	CCCCAATCGAACC	2e <sup>-38</sup>	92%	2e <sup>-112</sup>	100%	-
D	1930	MBH507	1-300	288-518	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-20</sup>	85%	4e <sup>-113</sup>	100%	-
D	1930	MBH508	1-264	252-482	CCCCAATCGAACC	3e <sup>-38</sup>	92%	2e <sup>-111</sup>	99%	-
D	1930	MBH509	74-190 245-709	686-916	TACACC/ CCCTCCCAAACC/ TACGCC/ CCCCCAATCGAACCA	1e <sup>-35</sup> 9e <sup>-26</sup>	91% 87%	3e <sup>-111</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (9e <sup>-23</sup> /96%) 178-250 (5e <sup>-20</sup> /93%)
D	1930	MBH510	1-144 944-1133	1121-1351	GGGGGAGATGC/ CCCCAATCGAACC	2e <sup>-54</sup> 1e <sup>-49</sup>	94% 93%	7e <sup>-112</sup>	99%	Cromossomo 14 AL096869.8 (Indeterminado) 134-943 (0.0/99%)
D	1930	MBH511	1-198 257-374	435-665	CCCTCCCAA/ TACACC/ CCCTCCCAAACCAA	6e <sup>-17</sup> 4e <sup>-38</sup>	95% 92%	5e <sup>-113</sup>	100%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 190-261 (1e <sup>-24</sup> /97%) 360-431 (2e <sup>-21</sup> /94%)



Família	Paciente	Clone	kDNA	Locus RO <sub>1-17</sub>	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Observação
D	1930	MBH512	1-137 190-307 360-729	717-947	CCCTCCCAAGACTAA/ TACACC/ CCCTCCCAAAAACCAA/ TACACC/ CCCCAATCGAACC	5e <sup>-14</sup> 3e <sup>-35</sup> 3e <sup>-35</sup>	92% 90% 91%	2e <sup>-110</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 123-195 (1e <sup>-24</sup> /97%) 293-365 (4e <sup>-23</sup> /96%)
D	1930	MBH513	1-327	315-545	CCCTAATCGAACC	3e <sup>-38</sup>	92%	2e <sup>-110</sup>	99%	-
D	1930	MBH517	74-375	363-592	CCCCAATCGAACC	4e <sup>-23</sup>	85%	2e <sup>-109</sup>	99%	-
D	1956	MBH518	1-226	214-444	CCCCAATCGAACC	4e <sup>-19</sup>	90%	3e <sup>-113</sup>	100%	-
D	1956	MBH519	67-732	833-1055	TACACC	5e <sup>-27</sup>	91%	3e <sup>-105</sup>	99%	Cromossomo X AC233279.2 (LINE-1) 22-72 (5e <sup>-8</sup> /90%) 733-818 (1e <sup>-28</sup> /95%)
D	1956	MBH520	1-210	336-566	CCCTCCCAAAAACCAA/	5e <sup>-17</sup>	80%	3e <sup>-102</sup>	97%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 196-333 (6e <sup>-35</sup> /89%)
D	1957	MBH522	1-313	301-530	CCCCAATCGAACC	6e <sup>-26</sup>	94%	3e <sup>-109</sup>	99%	-
D	1957	MBH523	74-190	295-525	TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA	9e <sup>-33</sup>	90%	2e <sup>-110</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (1e <sup>-20</sup> /93%) 176-293 (7e <sup>-44</sup> /95%)

Família	Paciente	Clone	kDNA	Locus RO <sub>1-17</sub>	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Observação
D	1957	MBH524	74-191	252-482	TACACC/ CCTTCCCAAACCAA	6e <sup>-35</sup>	91%	2e <sup>-111</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (1e <sup>-20</sup> /93%) 177-249 (3e <sup>-22</sup> /95%)
D	1957	MBH525	74-192 245-383	444-674	TACACC/ CCCTCCCAAACCAA/ TACACC/ CCCTCCCAAACCAA	8e <sup>-35</sup> 5e <sup>-25</sup>	90% 78%	2e <sup>-111</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (3e <sup>-19</sup> /92%) 178-250 (5e <sup>-23</sup> /96%) 369-441 (3e <sup>-19</sup> /92%)
D	1957	MBH526	74-230	455-685	TACACC/ CCCTCCCAAGACTAA	1e <sup>-25</sup>	95%	4e <sup>-113</sup>	100%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (8e <sup>-22</sup> /95%) 216-333 (2e <sup>-43</sup> /95%)
D	1957	MBH527	68-185	286-508	TACACC/ CCCTCCCAAACCAA	1e <sup>-36</sup>	92%	1e <sup>-106</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 5-73 (6e <sup>-18</sup> /92%) 171-244 (1e <sup>-21</sup> /95%)
D	1957	MBH528	74-212 265-456	446-673	TACACC/ CCCTCCCAAACCAA/ TACACC/ CCAATCGAACC	9e <sup>-27</sup> 5e <sup>-36</sup>	79% 91%	3e <sup>-109</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (3e <sup>-23</sup> /96%) 198-270 (3e <sup>-22</sup> /95%)

Família	Paciente	Clone	kDNA	Locus RO <sub>1-17</sub>	Micro-homologia	kDNA E-value	kDNA Identidade	DNA humano E-value	DNA humano Identidade	Observação
D	1957	MBH529	1-264	509-739	CCTCCCAAGACTAA	2e <sup>-24</sup>	93%	6e <sup>-113</sup>	100%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 250-367 (2e <sup>-43</sup> /95%)
D	1957	MBH530	1-141	244-474	CCCTCCCAAACCA	1e <sup>-18</sup>	97%	2e <sup>-111</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 129-201 (5e <sup>-23</sup> /96%)
D	2011	MBH536	74-279	267-497	TACACC/ CCCCAATCGAACC	6e <sup>-23</sup>	94%	2e <sup>-110</sup>	99%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (3e <sup>-20</sup> /93%)
D	2011	MBH538	74-239	227-457	TACACC/ CCCCAATCGAACC	6e <sup>-23</sup>	87%	4e <sup>-113</sup>	100%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 7-79 (3e <sup>-19</sup> /92%)
D	2011	MBH539	1-284	272-502	CCCCAATCGAACC	2e <sup>-10</sup>	68%	4e <sup>-113</sup>	100%	-
D	2011	MBH540	3-540	528-683	CCCCAATCGAACC	2e <sup>-92</sup>	89%	9e <sup>-71</sup>	99%	-
D	2015	MBH545	63-180 233-371 424-542	603-841	ACACC/ CCCTCCCAAACCAA/ TACACC/ CCCTCCCAAACCAA/ TACACC/ CCCTCCCAAACCAA	3e <sup>-34</sup> 4e <sup>-21</sup> 4e <sup>-33</sup>	90% 76% 89%	3e <sup>-90</sup>	93%	Cromossomo X AL732374.14 (LINE-1) 1-67 (3e <sup>-16</sup> /93%) 166-238 (4e <sup>-20</sup> /93%) 357-429 (1e <sup>-21</sup> /95%) 528-600 (1e <sup>-21</sup> /95%)