



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



Transferência vertical de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no modelo *Gallus gallus*

Ester Cardoso Paes Rose

Orientador: Dr. Antonio R. L. C. Teixeira

Co-orientadora: Mariana M. Hecht

Brasília – DF

2013

Ester Cardoso Paes Rose

**Transferência vertical de minicírculos de kDNA de
Trypanosoma cruzi no modelo *Gallus gallus***

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

Orientador: Dr. Antonio R. L. C. Teixeira

Co-orientadora: Mariana M. Hecht

Brasília – DF

2013

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

Financiamento: CNPq / CAPES

Aprovada em 01 de outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antônio Raimundo Lima Cruz Teixeira (presidente)

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Fabio Pittella Silva

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Vicente de Paulo Martins

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Alessandro Oliveira de Sousa (suplente)

Universidade de Brasília - UnB

*“Cristo, em quem estão escondidos
todos os tesouros da sabedoria
e da ciência.”
Cl 2:3*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a **Deus**, por sua constante presença. Estou certa de que nada conseguiria fazer sem Ele.

“Nada há melhor para o homem do que comer, beber e fazer que a sua alma goze o bem do seu trabalho. No entanto, vi também que isto vem da mão de Deus, pois, separado deste, quem pode comer ou quem pode alegrar-se?”

A **meus pais**, por ter dado sempre todo o carinho e apoio. Por todos os esforços que fizeram para minha educação, pelo encorajamento diário, pela paciência, e pelas caronas e companhia nos vários finais de semana que tive de fazer experimentos no laboratório.

À minha irmã, **Sara**, que é também a minha melhor amiga. Obrigada por todo o carinho. Obrigada por ter me ajudado tantas vezes para que este trabalho fosse feito.

Agradeço também a meu orientador **Antonio Teixeira**, por ter acreditado e investido em meu potencial. Agradeço por todo o cuidado e atenção para que se pudesse redigir esta dissertação.

À minha co-orientadora **Mariana Hecht**, que, sempre presente e me instruiu para a realização dos experimentos. Por toda a dedicação e paciência que permitiram a realização deste trabalho.

À professora **Nadjar Nitz**, que também sempre esteve disposta a tirar minhas dúvidas e que tanto ajudou na padronização e resolução de problemas envolvendo a parte experimental deste estudo.

Aos meus colegas e amigos do **LMPDC**, **Marol**, **Manu**, **Tamires**, **Lou**, **Marcelle**, **Adriano**, **Ale**, **Rafa**, **Perla**, **Cássia**, e tantos **outros** que compartilharam comigo sua cooperação e ensinamentos. Aos meus estagiários **Dany**, **Bernard**, e também **Búzios** e **Bruna**, que muito colaboraram neste trabalho. Vocês todos tornaram o ambiente de pesquisa mais agradável, e fizeram do LMPDC um lar.

À minha querida **família**: avós, tias-avós, tios e tias, primos e primas. Obrigada porque vocês são parte indispensável na minha vida.

Ao **Luís**, por ter me dado tanto apoio. Obrigada pela cooperação, pelo cuidado, pelo carinho, e por toda a ajuda que me deu no desenvolvimento desta pesquisa.

Às minhas queridas amigas de toda a vida, **Sandra** e **Taynara**. Obrigada porque vocês fazem parte da minha vida.

A todos os meus amigos do saudoso **1/2007**. Agradeço pela amizade tão boa que se mantém até hoje! Em especial, agradeço a **Aline**, **Luiza** e **Stefania**, pela amizade e por sempre ouvirem meus desabafos! Também a **Diêgo** e **Chael**, por ter me auxiliado neste processo. Meu obrigada também a **Thiago**, que sempre teve paciência e disposição para opinar sobre a metodologia deste estudo.

A meus amigos e irmãos da **IPN**, porque sempre pude contar com vocês. Agradeço ao meu Pequeno Grupo (Grupo da Galera), pela amizade e contantes orações. Obrigada a todos os “**deBoazes**” também, por alegrar meus dias. A Diretoria UMP 2013, **Helder**, **Pedro**, **Bela**, **Pirula**, **Buzios** e **Marquinhos**, sem vocês meu ano não seria o mesmo!

E agradeço também a meus queridos **NVCistas**. Embora não pude passar tanto tempo com vocês neste período, agradeço porque vocês sempre farão parte da minha vida! Muito obrigada por todos os ensinamentos e por todo o carinho.

Enfim, agradeço a todos que, juntos, colaboraram direta e indiretamente na elaboração desta dissertação de mestrado.

RESUMO

A transferência de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma do hospedeiro tem repercussão na biologia evolutiva e na medicina. A este respeito, a integração de minicírculos de kDNA em vários *loci* do genoma de aves e mamíferos implica em modificações genótípicas que estariam associadas com a patogênese da doença de Chagas. Nesse estudo, tal associação foi comprovada no modelo *Gallus gallus*, refratário ao *T. cruzi*. A inoculação de formas tripomastigotas do *T. cruzi* via orifício sobre a bolha de ar do ovo fértil de aves congênicas de Praga resultou na eclosão de pintos sem a infecção ativa, mas o kDNA do protozoário ficou retido no genoma. A reprodução das aves adultas kDNA-positivas gerou progêneses com as mutações. O mapeamento dos sítios de integração dos minicírculos de kDNA feitos com a técnica *tpTAIL*-PCR revelou as mutações quimeras em múltiplos *loci* em vários cromossomos de células germinativas, no sêmen e nos ovócitos das aves. As integrações de kDNA ocorreram em *loci* preferenciais (*hotspots*), tais como genes constitutivos e do metabolismo celular, e em elementos transponíveis. A hipervariabilidade da sequência de nucleotídeos dos minicírculos explica a imensa diversidade das mutações de parentais e de progêneses, porque gametas com integrações de kDNA diferentes geraram progêneses com mutações diferentes no mesmo *locus* do genoma. Este tipo de herança não-Mendeliana favorece a diversidade genética e contribui para a especiação. A mobilização dos minicírculos e a recombinação das quimeras em outros sítios secundários do genoma também foi documentada. A topologia das integrações do kDNA foi analisada nas quimeras formadas nos genes da distrofina (NW_001471534.2) e da enzima málica (NW_003763650.1). Verificou-se que na maioria desses casos a região variável da sequência era diferente ou se achava recombinada. Especificamente, o estudo sugere que as integrações frequentes do kDNA do *T. cruzi* nos genes da distrofina e da enzima málica, modificando a fisiologia celular, podem ter um papel na patogênese da doença.

Palavras-chave: *Gallus gallus*, *Trypanosoma cruzi*, transferência gênica horizontal, transferência gênica vertical, kDNA, herança das mutações, distrofina, enzima málica, patogênese, doença de Chagas.

ABSTRACT

The transfer of the *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences to the host's genome is considered important to the evolutionary biology and medicine. It has been hypothesized that the integration of the minicircle sequences induces the host's genotype modifications that may be associated with the pathogenesis of Chagas disease. In this study, the *Gallus gallus* chicken model system refractory to the *T. cruzi* infections was used. The inoculation of *T. cruzi* trypomastigotes through small orifice on the egg shell above the air chamber generated infection-free chicks, which retained the protozoan kDNA minicircle in the genome. The vertical transfer of the kDNA mutations was obtained by breeding kDNA-positive aves. The kDNA chimeras were documented by the *tpTAIL*-PCR, and the minicircle integrations were shown in several *loci* of germ line cells. The minicircle sequences integrated at several *hotspots* in coding regions and in transposable elements. The highly diverse minicircle sequences may explain the unlimited differences in the chimeras documented in parental and progeny. The gametes harboring diverse kDNA chimeras translated progeny with different patterns of mutation at single *locus*. This non-Mendelian heritage favors the unbridled diversity that contributes to speciation. The minicircle mobilization and chimera recombination was also documented. The topology of the kDNA mutations were examined in the dystrophin (NW_001471534.2) and in the malic enzyme (NW_003763650.1) genes. In these *hotspots*, the differences among the minicircle variable regions may be the result of *hitchhiking* and recombination at the secondary site. This study suggests that multiple kDNA integrations in the dystrophin and in the malic enzyme genes, introducing modification in the cell physiology, may be associated to the pathogenesis of Chagas disease.

Key words: *Gallus gallus*, *Trypanosoma cruzi*, horizontal gene transfer, vertical gene transfer, kDNA, mutation heritage, dystrophin, malic enzyme, pathogenesis, Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

| | p. |
|---|----|
| Figura 1. Rotas migratórias da América Latina e número estimado de infectados em cada país | 01 |
| Figura 2. Curso de evolução do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro mamífero. | 03 |
| Figura 3. Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> definidas pela posição do flagelo e corpo basal do cinetoplasto. | 06 |
| Figura 4. Ciclo de vida simplificado do <i>T. cruzi</i> . | 07 |
| Figura 5. DNA do cinetoplasto (kDNA). | 09 |
| Figura 6. Fragmentos truncados de minicírculos na cópia de LINE-1 do cromossomo Y. | 13 |
| Figura 7. Mecanismo de integração de LINE. | 19 |
| Figura 8. Esquema das alterações no sítio alvo em integrantes LINE no DNA hospedeiro. | 20 |
| Figura 9. Representação gráfica do retrotransposon <i>non</i> -LTR CR1. | 25 |
| Figura 10. Heredogramas da Família 1 , 2 e 3. | 31 |
| Figura 11. Presença de kDNA e ausência de nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células germinativas de <i>Gallus gallus</i> . | 47 |
| Figura 12. Distribuição das integrações de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma das aves congênicas de Praga. | 48 |
| Figura 13. Caracterização das regiões do genoma de <i>G. gallus</i> flangeadoras dos sítios de integração de sequências de minicírculos de kDNA do <i>T. cruzi</i> . | 49 |
| Figura 14. Integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma da galinha. | 52 |
| Figura 15. Integração de minicírculo e <i>hitchhiking</i> de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma de <i>Gallus gallus</i> . | 53 |
| Figura 16. Integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> em retrotransposon inserido em gene de <i>Gallus gallus</i> . | 54 |
| Figura 17. Integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no mesmo <i>locus</i> do genoma de <i>Gallus gallus</i> . | 55 |
| Figura 18. Alinhamento de duas sequências com integração no mesmo <i>locus</i> . | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Alinhamento de sequências de aves diferentes com integração no mesmo <i>locus</i> . | 57 |
| Figura 20. Alinhamento e similaridade de sequências com integração no mesmo <i>locus</i> de aves diferentes. | 57 |
| Figura 21. Eventos de integração de minicírculo de kDNA com a mesma região variável integrado em diferentes <i>loci</i> de <i>Gallus gallus</i> . | 59 |
| Figura 22. Diferenças entre as sequências flanqueadoras hospedeira e homologia dos minicírculos de kDNA integrado no genoma das aves. | 60 |
| Figura 23. Alinhamento de sequências quimeras de célula germinativa e de célula somática quimeras, exibindo kDNA no mesmo <i>locus</i> . | 61 |
| Figura 24. Resultado de alinhamento de sequências de célula germinativa e somática com integração de minicírculo de kDNA com a mesma sequência. | 62 |
| Figura 25. Sítio de integração do kDNA no <i>locus</i> NW_003763650.1, da enzima málica NADP-dependente mitocondrial. | 64 |
| Figura 26. Região de microhomologia antes e depois da integração no <i>locus</i> NW_003763650.1. | 65 |
| Figura 27. Representação gráfica das tensões que geram curvaturas e capacidade de se dobrar na região original do sítio da enzima málica mitocondrial. | 65 |
| Figura 28. Diferenças entre sequência de kDNA integrado no gene da enzima málica em aves da mesma família. | 66 |
| Figura 29. Herança de kDNA integrado no gene da enzima málica. | 67 |
| Figura 30. Recombinação do kDNA integrado entre diferentes gerações. | 68 |
| Figura 31. Deleção de parte do kDNA integrado no gene da enzima málica. | 69 |
| Figura 32. Análise conformacional de sequências de minicírculos de kDNA integradas no gene da enzima málica. | 70 |
| Figura 33. Diversidade de integrações de kDNA no gene da distrofina de uma mesma ave. | 71 |
| Figura 34. Análise conformacional de sequências quimeras kDNA-distrofina. | 72 |
| Figura 35. Herança de kDNA integrado no gene da distrofina. | 73 |
| Figura 36. Mutações similares em aves F2. | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 37. Identificação de mutação similar em células germinativas e somáticas de aves congênicas de Praga. | 74 |
| Figura 38. Provável mecanismo de integração do minicírculo de kDNA no genoma do hospedeiro. | 78 |
| Figura 39. Diversidade de minicírculos integrados no mesmo <i>locus</i> genético. | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | p. |
|---|-----|
| Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR | 41 |
| Tabela 2. Regiões codificadoras do genoma da galinha que receberam integração de minicírculos de kDNA. | 50 |
| Tabela 3. Elementos repetitivos do genoma da galinha onde ocorreu integração de minicírculos de kDNA | 51 |
| Tabela A1. Sequências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> . | 107 |
| Tabela A2. Sequências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no <i>locus</i> NADPME | 118 |
| Tabela A3. Sequências de DNA de <i>Gallus gallus</i> com integração de minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> no <i>locus</i> Distrofina | 120 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| A | Adenina |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BLASTn | <i>Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide query</i> |
| C | Citosina |
| CR1 | <i>Chicken repeat 1</i> |
| CSB | <i>Constant sequence block</i> - bloco de região conservada |
| DAPC | Complexo proteico associado a distrofina |
| DIRS | Dictyostelium transposable element |
| DSB | <i>Double-strand break</i> – Quebra de dupla fita |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – Ensaio imunoenzimático |
| ERV | Retrovírus endógeno |
| G | Guanina |
| GIRI | <i>Genetic Information Research Institute</i> |
| gRNA | RNA guia |
| ICGEB | <i>International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology</i> |
| ICGSC | <i>International Chicken Genome Sequencing Consortium</i> |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| kDNA | <i>Kinetoplast DNA</i> – DNA do cinetoplasto |
| kb | Quilobase |
| LINE | <i>Long interspersed element</i> - elemento entrecassado longo |
| LTR | <i>Long terminal repeats</i> - longas repetições terminais |
| ME3 | Enzima málica 3 (NADP dependente, mitochondrial) |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> - complexo principal de histocompatibilidade |
| NADPME | Enzima málica NADP-dependente (sítio de integração do kDNA) |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| nDNA | DNA nuclear |
| NK | células <i>Natural killer</i> |
| ORF | <i>Open reading frame</i> - fase de leitura aberta |

| | |
|------------------------|--|
| pb | Pares de base |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> - reação de polimerização em cadeia |
| PGC | <i>Primordial germ cells</i> – células germinativas primordiais |
| RNA_m | RNA mensageiro |
| RNA_r | RNA ribossomal |
| SINE | <i>Short interspersed element</i> - elemento entrecruzado curto |
| T | Timina |
| TAIL-PCR | <i>Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i> |
| TCR | Receptor de célula T |
| TGH | Transferência gênica horizontal |
| TGV | Transferência gênica vertical |
| T_m | Temperatura média |
| tpTAIL | <i>Target-primer Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i> |
| UTR | <i>Untranslated region</i> – Região não traduzida |

ÍNDICE

| | p. |
|---|----|
| I. Introdução | 01 |
| 1) A Doença de Chagas | 01 |
| 1.1) Formas de Transmissão | 01 |
| 1.2) Manifestações Clínicas | 02 |
| 1.3) Diagnóstico | 03 |
| 1.4) Tratamento | 04 |
| 2) O <i>Trypanosoma cruzi</i> | 05 |
| 2.1) Ciclo de Vida | 06 |
| 2.2) Cinetoplasto e kDNA | 07 |
| 3) A patogenia da doença de Chagas | 10 |
| 3.1) Persistência do Parasito | 10 |
| 3.2) Autoimunidade | 11 |
| 3.2.1) O papel do kDNA | 13 |
| 4) A transferência gênica horizontal (TGH) | 14 |
| 4.1) Os retrotransposons | 17 |
| 5) A transferência gênica vertical (TGV) | 21 |
| 6) O modelo <i>Gallus gallus</i> | 23 |
| 6.1) O Genoma de <i>Gallus Gallus</i> | 24 |
| 6.1.1) O papel do kDNA | 24 |
| 6.2) O Sistema imunológico de <i>Gallus gallus</i> | 25 |
| 6.3) Células germinativas, reprodução e embriologia | 27 |
| II. Objetivos | |
| 1) Objetivo geral | 29 |
| 2) Objetivos específicos | 29 |
| III. Metodologia | 29 |
| 1) Modelo Animal | 30 |
| 1.1) Amostragem | 30 |
| 1.2) Inoculação de tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos ovos férteis | 30 |
| 1.3) Cruzamento de aves | 32 |

| | | |
|------|--|----|
| 2) | Extração de DNA | 32 |
| 2.1) | Do esperma | 32 |
| 2.2) | Do ovário | 32 |
| 2.3) | <i>T. cruzi</i> | 32 |
| 2.4) | kDNA do <i>T. cruzi</i> | 33 |
| 2.5) | Quantificação e análise do DNA extraído | 33 |
| 3) | Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) | 33 |
| 3.1) | PCR de kDNA | 33 |
| 3.2) | PCR de nDNA de <i>T. cruzi</i> | 35 |
| 3.3) | PCR direta do gene da enzima málica | 36 |
| 4) | <i>tpTAIL</i> -PCR | 36 |
| 4.1) | <i>tpTAIL</i> -PCR específica para o gene da distrofina | 38 |
| 4.2) | <i>tpTAIL</i> -PCR específica para o gene da enzima málica | 40 |
| 5) | Transferência dos produtos de PCR para a membrana de <i>nylon</i> | 42 |
| 6) | Clonagem dos Produtos da <i>tpTAIL</i> -PCR | 42 |
| 6.1) | Preparo de células compententes | 42 |
| 6.2) | Transformação | 43 |
| 6.3) | Transferência de colônias de bactérias transformadas para membrana de <i>nylon</i> | 43 |
| 6.4) | Extração de DNA plasmidial | 43 |
| 7) | Sondas Radioativas | 43 |
| 7.1) | Marcação e purificação de sondas radioativas | 44 |
| 7.2) | Hibridização com sonda radioativa | 44 |
| 8) | Análise de Sequências em Banco de Dados | 45 |
| IV. | Resultados | 46 |
| 1) | Integração de kDNA em células germinativas de aves eclodidas de ovos inoculados com <i>Trypanosoma cruzi</i> | 46 |
| 2) | Análises dos sítios de integração de kDNA | 48 |
| 2.1) | Integrações de kDNA no mesmo <i>locus</i> genético | 54 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.2) | Homologias em sequências de kDNA integradas no genoma | 58 |
| 2.3) | Alinhamento das sequências obtidas de células germinativas e de células somáticas das mesmas aves | 60 |
| 3) | Análises das integrações no <i>locus</i> da enzima málica mitocondrial NADP dependente | 62 |
| 4) | Análises das integrações no <i>locus</i> da Distrofina | 70 |
| V. | Discussão | 75 |
| 1) | Mapeamento de sequências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> integradas em células germinativas de <i>Gallus gallus</i> | 75 |
| 2) | A relevância das integrações nos dois sítios estudados: enzima málica NADP-dependente e distrofina | 79 |
| 2.1) | Integração na enzima málica NADP dependente | 79 |
| 2.2) | Integração no gene da distrofina | 81 |
| 3) | A herança do kDNA: estudo em famílias | 82 |
| 3.1) | A sequência de minicírculo integrada no parental pode não ser a mesma encontrada na progênie. | 83 |
| 3.2) | Mobilização do kDNA integrado | 86 |
| 3.3) | Recombinação nas quimeras | 87 |
| 3.4) | Herança e fixação do kDNA | 89 |
| VI. | Conclusões | 90 |
| VII. | Referências Bibliográficas | 91 |
| VIII. | Anexo I | 107 |
| IX. | Anexo II | 118 |
| X. | Anexo III | 120 |

I. Introdução

1) A Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou Tripanosomíase Americana, foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico Carlos Chagas. Seu trabalho identificou o inseto vetor (Hemiptera: Triatominae), o protozoário *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico), e seus principais sintomas (Chagas, 1909). Ela foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (Rassi Jr e cols, 2010). A ocorrência da doença acontece principalmente na América Latina, mas o aparecimento de infectados em regiões não endêmicas, como América do Norte e Europa, tem crescido nas últimas décadas (Tanowitz e cols 2011; Coura e Viñas, 2010) (Figura 1). O número de infectados em 2009, segundo a Organização Mundial de Saúde, era de 10 milhões (WHO, 2010). Aproximadamente 100 milhões de pessoas têm o risco de adquirir a infecção (Biolo e cols, 2010). Em 2001, 14 mil mortes foram atribuídas à infecção por *T. cruzi* (Schmunis, 2007).

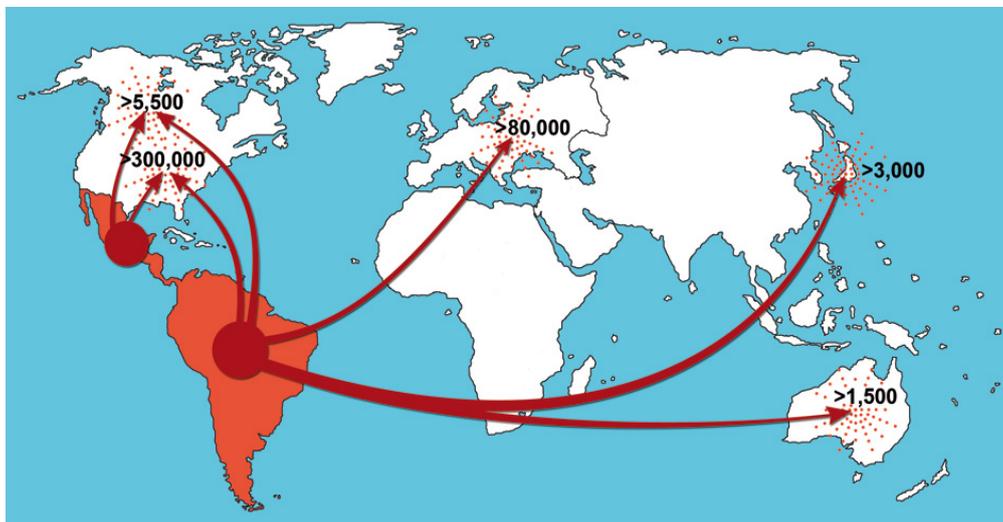


Figura 1. Rotas migratórias da América Latina e número estimado de infectados em cada país (Retirado de Coura e Viñas, 2010)

1.1) Formas de transmissão

A transmissão primária do *T. cruzi* é feita pela contaminação do hospedeiro com fezes de triatomíneos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e várias outras que têm hábitos hematófagos (Barrett e

cols, 2003). Outras formas conhecidas de transmissão incluem a ingestão de alimentos contaminados (Yoshida, 2008), transfusão de sangue (Wendel, 2010) e transplante de órgãos contaminados (Ferraz e Figueiredo, 1993; Kun e cols, 2009). A infecção também pode ser adquirida congenitamente da mãe para o feto (Bisio e cols, 2011), e, ocasionalmente, por acidentes na manipulação do parasito, como em hospitais e laboratórios de pesquisa (Herwaldt, 2001).

1.2) Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da doença são divididas em fase aguda e crônica, formas indeterminada ou sintomática. A fase aguda caracteriza-se por uma alta parasitemia, sendo na maioria dos casos, assintomática. Mas os casos agudos sintomáticos (5%) cursam com febre, diarreia, dores musculares, sonolência, distúrbios respiratórios e cianose (Teixeira e cols, 2006). Nos casos sintomáticos podem ser encontradas lesões de porta de entrada do *T. cruzi* no hospedeiro (chagoma de inoculação ou sinal de Romana), quando a transmissão é vetorial (Figura 2). Os casos agudos graves podem apresentar miocardite, hepatoesplenomegalia, adenopatia generalizada e edema (Coura e Borges-Pereira, 2010).

Após a fase aguda, a doença evolui para a fase crônica, quando a parasitemia torna-se subpatente, sendo rara a detecção de ninhos de amastigotas no coração. A infecção crônica, na ausência de manifestação clínica, é sugerida pela presença de anticorpos anti *T. cruzi* (Bonney e Engman, 2008). Cerca de 70 a 85% dos infectados permanecem com a infecção crônica sem manifestação clínica (Barrett e cols, 2003). Os 15 a 30% restantes desenvolvem a forma cardíaca e/ou digestiva da doença, algumas décadas após a infecção inicial (Figura 2). Na cardiomiopatia chagásica o coração aumenta de tamanho e surgem as arritmias e os bloqueios atrioventriculares, tromboembolismo e a miocardipatia que antecipa a insuficiência cardíaca, considerada a forma mais grave de manifestação da doença (Coura e Borges-Pereira, 2010; Rassi Jr e cols, 2012). A forma digestiva da doença está associada à miosite e à destruição dos neurônios dos plexos mioentéricos, antecipando o desenvolvimento de megaesôfago e/ou megacólon (Coura e Borges-Pereira, 2010).

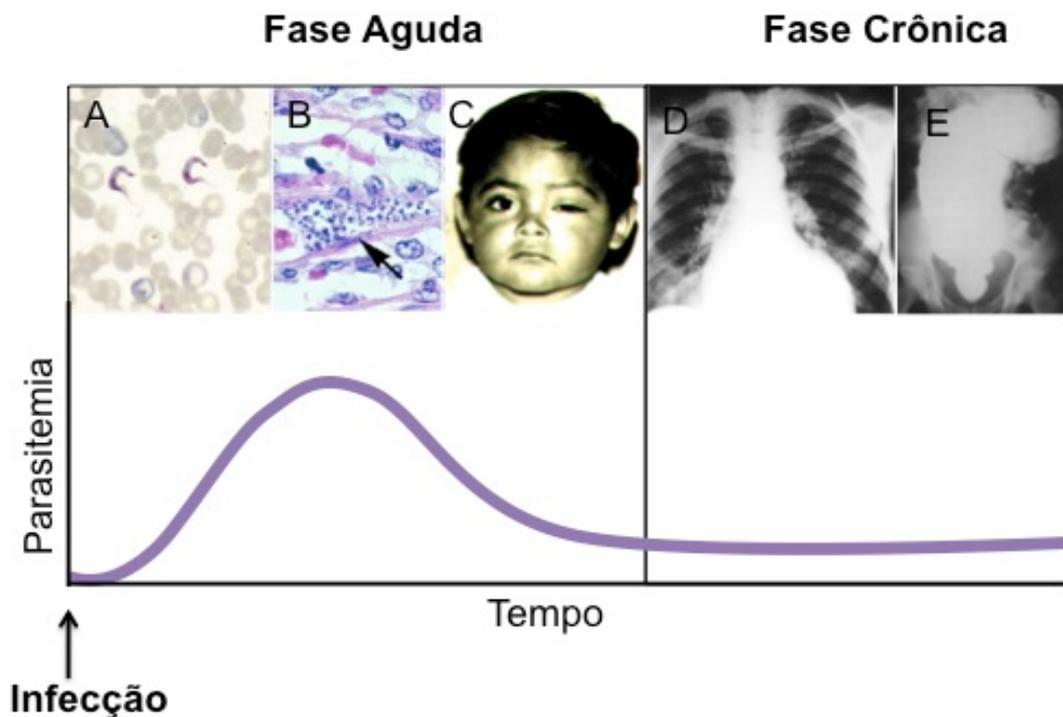


Figura 2. Curso de evolução da parasitemia do *T. cruzi* no hospedeiro mamífero. Note a diferença do nível da parasitemia nas fases aguda e crônica. Na fase inicial é comum detectar formas tripomastigotas no sangue (A) e ninhos de amastigotas nos tecidos (B). O sinal de Romaña (C) pode aparecer nesta fase, indicando a porta de entrada do *T. cruzi* pela transmissão vetorial. A fase crônica, quando sintomática, pode apresentar cardiomegalia (D) e/ou megaesôfago e megacólon (E). (Adaptado de Neves, 2005. Figuras: Barrett e cols, 2003 e Tanowitz, 2009)

1.3) Diagnóstico

Na fase aguda, o diagnóstico pode ser feito diretamente pela detecção de parasitos em esfregaços de sangue, em lâminas coradas com Giemsa (Teixeira e cols 2006, Machado e cols, 2012). Rotineiramente também são feitos testes sorológicos para detecção de imunoglobulina M, o anticorpo da fase aguda (Teixeira e cols, 2006). No entanto, o teste com IgM só é útil nos dois primeiros meses da infecção, e, a partir de então, a presença do *T. cruzi* é sugerida pelo anticorpo da classe IgG. O cultivo de amostras de sangue em meio de cultura também é usado, mas sua aplicação clínica esbarra na demora (usualmente semanas ou meses) para se obter os resultados (Machado e cols, 2012).

Os testes sorológicos que detectam IgG anti-*T. cruzi* são rotineiramente empregados para identificar os portadores da infecção crônica. Hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA são exames com taxas elevadas de

especificidade e sensibilidade (Barrett e cols, 2003; Teixeira e cols, 2006). No entanto, podem ocorrer reações cruzadas com outros patógenos, por exemplo *Leishmania sp*, *Plasmodium sp*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. (Teixeira e cols, 2006).

A técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) é muito sensível, e tem sido utilizada para diagnosticar casos crônicos associados a imunodeficiência (Machado e cols, 2012). Esta técnica requer padronização correta e manutenção do controle de qualidade do teste. Essas dificuldades e o alto custo limitam a generalização dos testes de PCR para o diagnóstico, exceto em laboratórios especializados (Teixeira e cols, 2006; Schijman, 2011).

1.4) Tratamento

O tratamento da doença de Chagas envolve uma terapia específica para o parasito juntamente com tratamentos que visem uma melhora na sintomatologia (Machado e cols, 2012). Não existem tratamentos profiláticos nem vacina (Salamanca-Dejour e cols, 2012).

As drogas tripanocidas nitroderivadas, que receberam nome comercial de nifurtimox e benzonidazol, são utilizadas para o tratamento das infecções chagásicas desde as décadas de 1960 e 1970, respectivamente (Barrett e cols, 2003). Os efeitos colaterais destes agentes quimioterápicos incluem reações colaterais adversas: anorexia, perda de peso, desconforto abdominal, náusea, vômitos, leucopenia, neuropatias periféricas, e outras (Bern, 2011). Estas drogas diminuem a parasitemia e podem até diminuir sintomas da infecção aguda, mas não erradicam o *T. cruzi*; a infecção crônica persiste e o paciente tratado pode ter a doença de Chagas (Cuervo e cols, 2010; Teixeira e cols, 2006). Estudo aprofundado sobre a biologia e metabolismo do protozoário é necessário para criar novas possibilidades de identificação de drogas efetivas para o tratamento (Fidalgo e Gille, 2011).

2) O *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) da ordem Kinetoplastida, cuja característica principal é a única mitocôndria, rica em DNA, denominada cinetoplasto (Fidalgo e Gille, 2011; Teixeira e cols, 2011b). O *T. cruzi* apresenta diferentes formas evolutivas ao longo de seu ciclo de vida em hospedeiros invertebrado e vertebrado. No hospedeiro invertebrado, a forma replicativa é a epimastigota extracelular, cujo cinetoplasto se posiciona anteriormente ao núcleo, com o flagelo livre emergindo da região anterior (Figura 3A). No hospedeiro vertebrado, a forma replicativa é a amastigota intracelular, de formato arredondado e flagelo bem reduzido (Figura 3B) (Neves, 2003; Teixeira D. e cols, 2011).

As formas tripomastigotas infectantes não são replicativas. O cinetoplasto está localizado na região posterior do corpo celular, de onde emerge o flagelo, que se torna livre na extremidade anterior (Figura 3C) . Os tripomastigotas ficam livres no intestino posterior do hospedeiro invertebrado (metacíclicos) e no sangue de vertebrados mamíferos (Neves, 2003; Teixeira D. e cols, 2011).

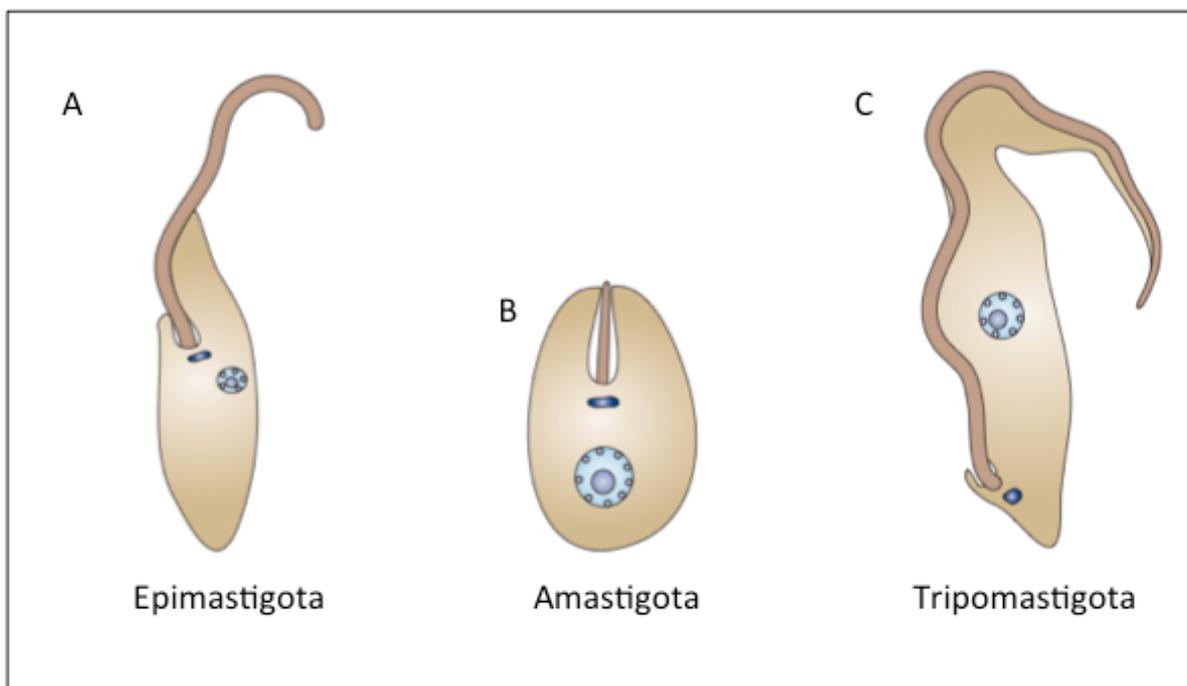


Figura 3. Formas evolutivas de *T. cruzi* definidas pela posição do flagelo e corpo basal do cinetoplasto. (A) Epimastigota extracelular replicativa no intestino do inseto-vetor; (B) Amastigota intracelular replicativa no hospedeiro vertebrado; (C) Tripomastigota. (Adaptado de Docampo e cols, 2005).

2.1) Ciclo de Vida

O ciclo biológico do *T. cruzi* é heteroxênico com um estágio de vida no hospedeiro vertebrado e outro no hospedeiro invertebrado (Neves, 2003). O triatomíneo ingere formas tripomastigotas ao se alimentar do sangue de hospedeiros infectados (Figura 4). No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas e dividem-se por fissão binária. No intestino posterior e reto, as epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes do inseto, após o repasto sanguíneo (Machado, 2012; Rassi Jr, 2010).

O mamífero se infecta quando as fezes contaminadas com o parasito entram em contato com a mucosa oral, nasal, ou conjuntiva, ou ainda pelo orifício produzido pelo ferrão do inseto na pele durante a picada. Uma vez no interior do hospedeiro, a tripomastigota entra na célula hospedeira e se diferencia em amastigota, iniciando ciclo de replicação intracelular. Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, e rompem a célula hospedeira, sendo liberadas no meio externo. Na corrente sanguínea, as tripomastigotas infectam outras células-alvo. Qualquer célula nucleada de mamífero pode ser parasitada, particularmente células do sistema reticuloendotelial, tecidos adiposo, muscular liso e estriado, células endoteliais e células do sistema nervoso central e periférico. As tripomastigotas livres no sangue são ingeridas pelo inseto triatomíneo, fazendo o *T. cruzi* circular na natureza (Neves, 2003; Machado, 2012).

Centenas de espécies de mamíferos, pertencentes as ordens Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Perissodactyla, Primates, Rodentia e Xenarhra, servem como reservatório natural do *T. cruzi*. O indivíduo pode adquirir a infecção ao ser picado por barbeiros que, anteriormente, fizeram repasto de sangue em animais contaminados (Teixeira e cols, 2011b).

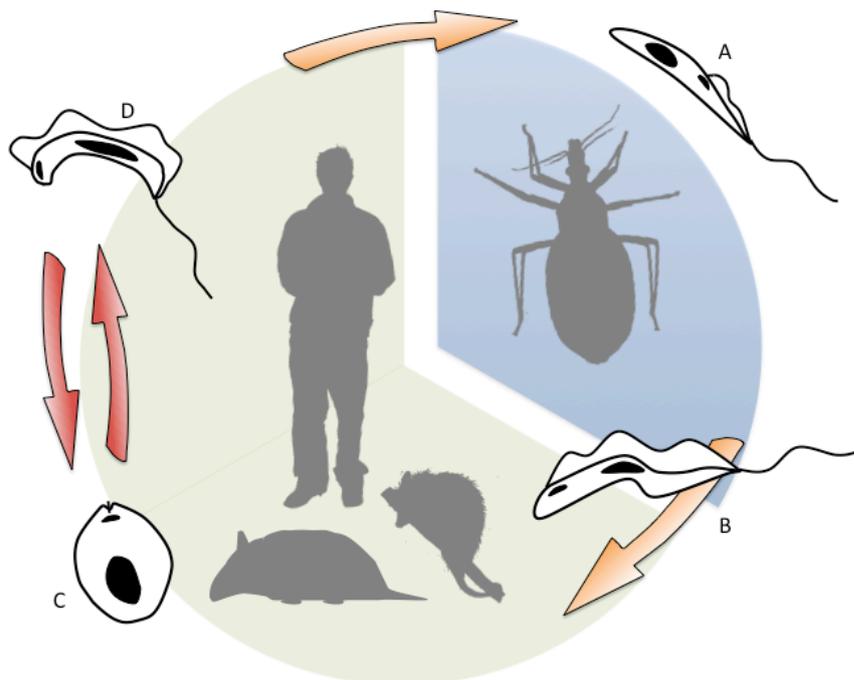


Figura 4. Ciclo de vida simplificado do *T. cruzi*. O inseto vetor (em azul) ingere formas tripomastigotas (D) de animais ou pessoas contaminados (região verde). As formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas (A) e replicam. No intestino posterior do barbeiro ocorre diferenciação para tripomastigota metacíclica (B), principal forma infectante. No interior do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* diferencia-se em amastigotas intracelulares (C), que replicam nos tecidos. Os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas (D), que vão para a corrente sanguínea. Essas tripomastigotas invadem células hospedeiras e diferenciam as amastigotas, ou ainda podem ser ingeridas por um inseto vetor durante o repasto sanguíneo.

2.2) Cinetoplasto e kDNA

A única mitocôndria em tripanosomatídeos tem estrutura peculiar quando comparada com àquela de organismos multicelulares. Dependendo do ambiente e dos recursos nutricionais disponíveis, a mitocôndria ocupa até 12% do volume celular. O DNA mitocondrial está contido numa estrutura incomum, conhecida como cinetoplasto, que, no *T. cruzi*, possui uma estrutura lamelar, quase em espiral. Este DNA é conhecido como kDNA. A posição do cinetoplasto relativamente ao núcleo varia dependendo do estágio de diferenciação. Mas geralmente se localiza perto do corpúsculo basal, ao qual está fisicamente ligado por um conjunto de filamentos (Fidalgo e cols, 2011; Souza e cols, 2009; Teixeira e cols, 2011b).

O kDNA do *T. cruzi* alcança até 30% do DNA total da célula (Fidalgo e cols, 2011; Souza e cols, 2009), incluindo duas classes de moléculas circulares de tamanhos diferentes, conhecidas como maxicírculos e minicírculos. Existe cerca de 50 cópias de maxicírculos, com um tamanho entre 20 e 40 kb, e cerca de 15000 cópias de minicírculos, com um tamanho médio de 1,4 kb. Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, e codificam RNAr e subunidades dos complexos respiratórios citocromo b, citocromo oxidase, adenosina trifosfato sintase, e unidades da NADH desidrogenase (Fidalgo e cols, 2011; Souza e cols, 2009; Teixeira e cols, 2011b).

Os minicírculos codificam RNAs guias (gRNAs) que modificam os transcritos do maxicírculo por meio de inserção ou deleção de uridina, num processo conhecido como editoração de RNA (Souza e cols, 2009; Teixeira e cols, 2011b). O minicírculo é composto de quatro regiões conservadas e quatro hipervariáveis, interespaçadas (Figura 5A). A região conservada possui blocos (CSB1, CSB2, CSB3) de sequências ricas em citosina e adenina (*CA-rich*), que são funcionalmente associadas ao sítio de origem de replicação, transcrição, recombinação, e de mediação da transferência de kDNA ao genoma do hospedeiro. A amplificação da região variável dos minicírculos geram fragmentos com cerca de 330 pb, enquanto que a amplificação da região conservada geram fragmentos de 120 pb (Teixeira e cols, 2011b; Junqueira e cols, 2005; Shapiro e Englund, 1995). Interessantemente, blocos *CA-rich* também são encontrados na região variável dos minicírculos.

Os minicírculos e os maxicírculos estão organizados no cinetoplasto de forma concatenada, formando uma rede (Figura 5B e 5D). A decatenação da rede pode ser feita pela enzima topoisomerase II, pela qual os maxicírculos e minicírculos podem ser linearizados (Figura 5C). *In vivo*, a rede permanece compactada na matriz mitocondrial em formato de disco (Figura 5E). (Shapiro e Englund, 1995; Liu e cols, 2005).

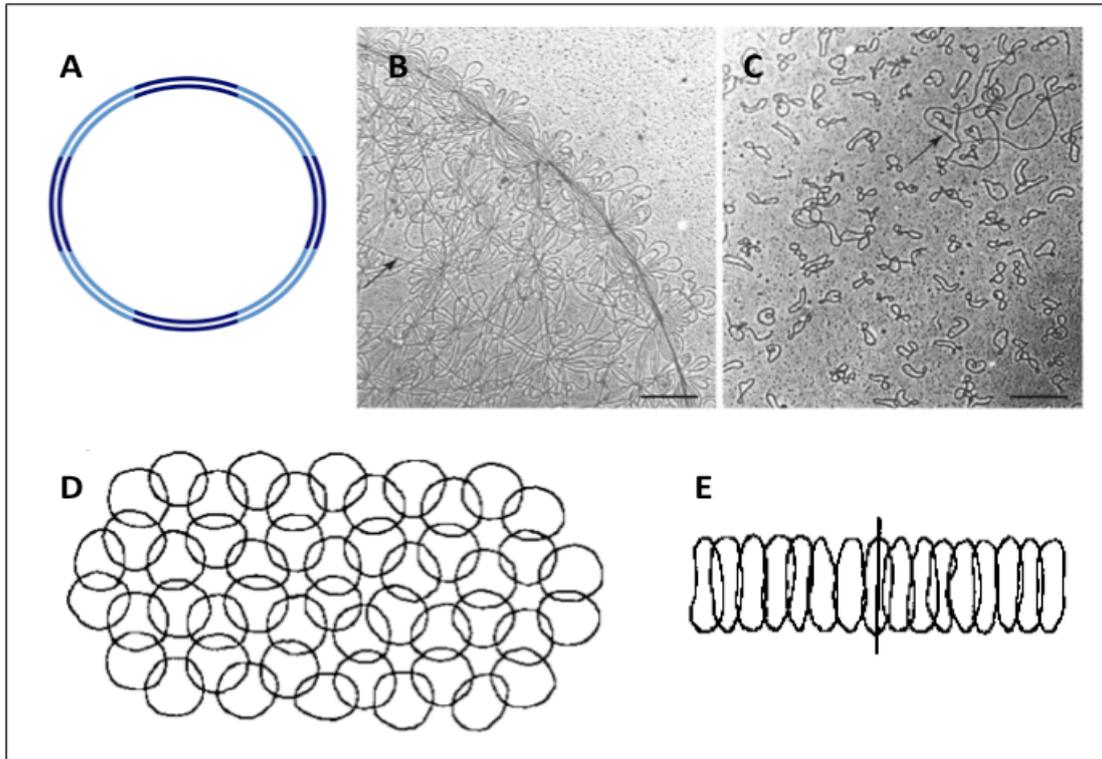


Figura 5. DNA do cinetoplasto (kDNA). A) Esquema onde as quatro regiões conservadas do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* aparece na cor azul escuro e as quatro regiões variáveis em azul claro. B) Micrografia eletrônica de uma rede intacta de kDNA de *Crithidia fasciculata*, onde são vistas alças de minicírculos, e maxicírculos em longos fios (seta). C) Rede decatenada pela topoisomerase II, mostrando minicírculos isolados e único maxicírculo (seta). D) Esquema com segmento da rede de kDNA de *C. Fasciculata*, onde os minicírculos estão dispostos num plano topologicamente ligado em três unidades. E) Idem, de segmento do disco do cinetoplasto, onde *in vivo* cada minicírculo situa-se perpendicularmente ao plano. (Adaptado de Liu e cols, 2005 e Shapiro e Englund, 1995)

A replicação do kDNA ocorre durante período próximo à fase S da replicação celular, e depende do conjunto de proteínas que são agregadas ao disco de kDNA no início da divisão e desagregadas quando o ciclo se completa. Como o anel de DNA está interligado a outros anéis, para que eles possam se replicar é necessária a liberação dos minicírculos da rede pela atividade da topoisomerase II. A decatenação é feita gradativamente e durante a fase S centenas de minicírculos liberados iniciam a replicação. Os minicírculos recém-sintetizados ficam ligados à rede também pela mediação da topoisomerase II. A duplicação de minicírculos é interrompida quando se completa a rede. Isto significa que cada unidade é replicada uma só vez (Liu e cols, 2005; Shapiro e Englund, 1995).

3) A patogenia da doença de Chagas

Os mecanismos patogênicos da doença de Chagas ainda não foram completamente elucidados, pois o assunto é controverso. Ao longo dos anos, foram propostas explicações para o dano cardíaco e de outros tecidos em pacientes chagásicos, entre elas a persistência do parasito e a autoimunidade (Teixeira e cols, 2006). Durante a cardiomiopatia da fase crônica, observa-se hipertrofia das fibras do miocárdio e dilatação das cavidades, com formação de trombos, fibrose e afinamento do ápice do ventrículo esquerdo (Coura e Borges-Pereira, 2010). Nas lesões é comum encontrar uma grande quantidade de células do sistema imune no tecido cardíaco, principalmente linfócitos T CD4+ e T CD8+ (Rassi Jr e cols, 2010). O infiltrado imunológico pode ser visto como resposta contra o parasito. Tal resposta certamente depende da genética do hospedeiro, visto que alguns desenvolvem a doença, outros não (Bonney e Engman, 2008; Gutierrez e cols, 2009; Teixeira e cols, 2011b).

3.1) Persistência do Parasito

A teoria da persistência do parasito, descrita inicialmente em 1911 por Gaspar Vianna (Coura e Borges-Pereira, 2010), sugere que o parasito tem papel ativo na indução da patologia, à medida que promove ruptura mecânica das células parasitadas e o desenvolvimento da doença (Tarleton e Zhang, 1999; Gutierrez e cols, 2009). A inflamação crônica seria um mecanismo de reparo para diminuir o dano produzido pelo parasito, ao romper a célula hospedeira (Torres, 1930).

Um obstáculo para a aceitação desta teoria é o fato de o processo inflamatório raramente ocorrer em proximidade física com os ninhos de amastigotas no tecido lesado (Bonney e Engman, 2008). Os defensores da teoria da persistência, no entanto, afirmam que apesar do parasito raramente ser encontrado pelas técnicas histológicas, a presença tem sido detectada com técnicas mais sensíveis, tais como PCR ou imunohistoquímica (Gutierrez, 1999, Junqueira e cols, 2010). Todavia, a necessidade de técnicas muito sensíveis demonstra a escassez de formas do parasito nos tecidos lesados.

3.2) Autoimunidade

A ausência de ninhos de amastigotas nas regiões do infiltrado inflamatório durante a fase crônica, a presença de células auto-reativas e autoanticorpos, e a interação citotóxica entre linfócitos sensibilizados com *T. cruzi* e células cardíacas alogênicas não parasitadas são os elementos que levaram à validação da teoria da autoimunidade da doença de Chagas (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Teixeira e cols, 2006; Bonney e Engman, 2008).

A teoria da autoimunidade foi levada ao conhecimento quando se demonstrou que linfócitos de coelhos infectados com *T. cruzi* reagem contra fibras cardíacas saudáveis de fetos de coelho não-infectado (Santos-Buch e Teixeira, 1974). Desde então, inúmeras pesquisas sobre autoimunidade revelam outros possíveis mecanismos de destruição do coração na doença de Chagas experimental.

Ainda não se sabe exatamente quando a autoimunidade se inicia na doença. Uma possibilidade é ela ser induzida logo no contato inicial com o parasito, durante a fase aguda. Anticorpos contra miosina, actina e laminina podem ser detectados na fase aguda da doença (Leon e Engman, 2001). No entanto, como 95% dos pacientes na fase aguda são assintomáticos, é possível que a autoimunidade se desdobre mais tardiamente, durante a fase crônica, ou ainda há a possibilidade de que, durante a fase aguda, a autoimunidade seja subclínica, e que, só depois na fase crônica ela possua um potencial patogênico (Teixeira e cols, 2011b). É possível que uma inflamação crônica persistente seja necessária para a estimulação e expansão de células auto-reativas, ao superar o limiar do dano cardíaco ou produzir um ambiente inflamatório adequado (Leon e Engman, 2000).

Vários estudos sugerem que o mecanismo de autoimunidade na doença de Chagas seria desencadeado por antígenos de reação cruzada. Isto significa que poucos aminoácidos numa proteína (epítipo) do coração teria a mesma configuração em outra proteína no *T. cruzi*. Então, ao reagir contra o antígeno do parasito, os linfócitos imunes destruiriam também aquele epítipo cardíaco. Diversos antígenos do *T. cruzi* têm sido apontados como possíveis indutores de uma resposta específica contra proteínas de mamíferos (Bonney e Engman, 2008). É o caso da proteína B13 do protozoário, dos antígenos Cha, cruzipaina e calreticulina, que podem levar a uma reação cruzada contra a miosina, e outras proteínas do hospedeiro (Teixeira e cols, 2011b).

Adicionalmente ao mimetismo molecular, pode ocorrer ativação policlonal, ativação de células *bystander*, e disseminação do epítipo para potencializar a reação. A ativação policlonal levaria à patologia ao estimular uma proliferação intensa de linfócitos auto-reativos não deletados no timo. Vários antígenos de *T. cruzi* podem estimular a proliferação de células T e B sem que haja especificidade para os antígenos indutores (Bonney e Engman, 2008). O mecanismo de ativação *bystander* afirma que o próprio ambiente inflamatório (rico em citocinas, óxido nítrico e quimiocinas) induz a ativação de linfócitos autoreativos, e que a miocitólise libera proteínas da célula hospedeira, expondo auto-antígenos (Leon e Engman, 2001; Bonney e Engman, 2008).

O epítipo críptico é aquele antígeno que normalmente não é apresentado às células imunes na vigência da tolerância central e periférica. Durante a infecção por *T. cruzi*, os antígenos crípticos são apresentados, e isso leva a ativação de linfócitos quando ocorre a ruptura da tolerância, gerando a autoimunidade (Leon e Engman, 2001; Bonney e Engman, 2008). Por fim, a disseminação do epítipo sugere que o auto-antígeno que leva a autoimunidade pode não ser o mesmo auto-antígeno envolvido no desenvolvimento da doença. A autoimunidade contra um epítipo pode causar dano tecidual, pela liberação de outros auto-antígenos, inclusive os que se forma *de novo* pela atividade de enzimas proteolíticas (Bonney e Engman, 2008).

Embora esses mecanismos tenham sido propostos e existam inúmeras evidências para explicá-los, ainda não se tem comprovado o que levaria exatamente à ativação dos linfócitos autoreativos e à destruição das fibras cardíacas. Que autoanticorpos são formados, não se questiona, mas são necessários muitos estudos para se afirmar que são significativos na patogênese (Tarleton e Zhang, 1999; Lescure e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011b).

Muitas questões ficam sem respostas, e uma hipótese para explicar a origem da autoimunidade na doença de Chagas sugere que sua patogênese está relacionada às mutações resultantes de transferência horizontal de DNA do parasito para o hospedeiro (Teixeira e cols, 2006).

3.2.1) O papel do kDNA

A possibilidade de trocas genéticas entre o parasito e o hospedeiro foi sugerida, inicialmente, pelas técnicas de citogenética e hibridização *in situ*, quando foi possível detectar a presença de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de células do hospedeiro (Teixeira e cols, 1991; Teixeira e cols, 1994). Em seguida as técnicas PCR com *primers* específicos e *Southern blot* e hibridização com sonda de kDNA mostraram a aquisição do kDNA do parasito em humanos e em modelos animais (Simões-Barbosa, 1999; Teixeira e cols, 2006; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a; Teixeira e cols, 2011b).

Os estudos mostraram que o kDNA possui um sítio preferencial de integração no genoma de humanos, que é o elemento retrotransponível LINE-1 (Hecht e cols, 2010). A adaptação da técnica de TAIL-PCR (Liu e Whittier, 1995), utilizando-se *primers* específicos (chamada de *tpTAIL-PCR*), seguida de sequenciamento, permitiu obter várias sequências quimeras hospedeiro-kDNA (Hecht e cols, 2010), como mostra a Figura 6.

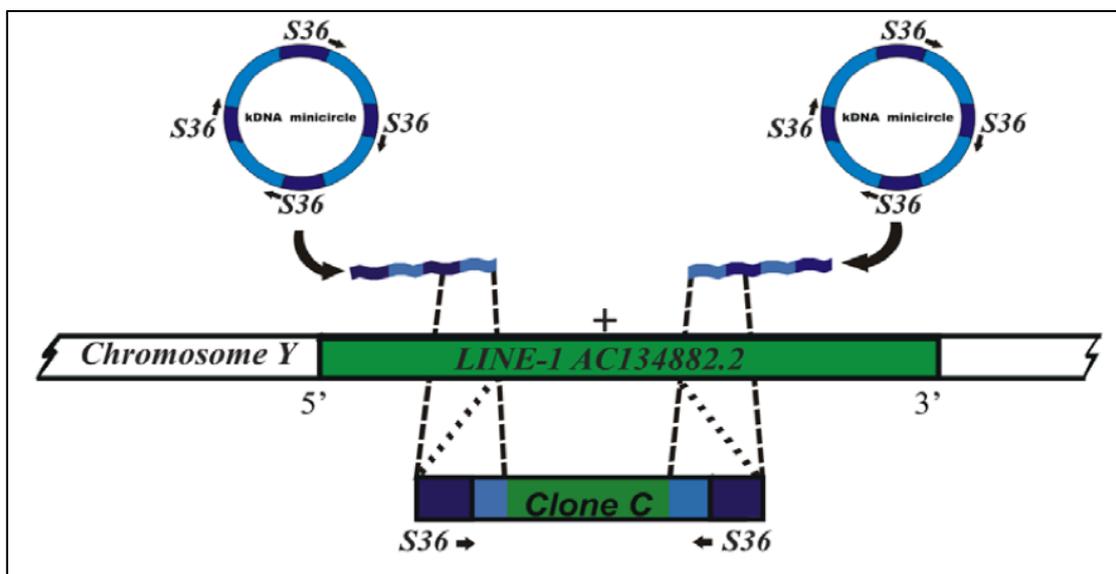


Figura 6. Fragmentos truncados de minicírculos na cópia de LINE-1 do cromossomo Y. A região conservada (azul escuro) seguida de região variável truncada (azul claro) aparece nos flancos do LINE 1 (verde) do clone C. Retirado de Hecht e cols, 2010.

Acredita-se que a integração do DNA exógeno pode ter um papel na patogênese da doença. A investigação em linhagem de macrófagos evidenciou que a integração de kDNA pode alterar sua expressão gênica (Simões-Barbosa, 1999). Ademais, foram encontrados integrações de kDNA em *loci* específicos que codificam

proteínas com funções importantes, tais como genes que codificam MHC de classe 1 (Hecht e cols, 2010), e também foram detectados *knockouts* putativos de genes em casos com manifestação evidente da doença. Por exemplo, os genes PARP-1 (poliADP-ribose polimerase 1), CLEC5 (codificador de lectina tipo C ou domínio semelhante a lectina tipo C – CTL/CTLD), proteína quinase C, e outros (Hecht e cols, 2010) tiveram ruptura das fases de leitura aberta (ORFs). Diante da evidência, foi postulado que cada *locus* afetado pela integração de kDNA adquire uma importância patofisiológica distinta. A transferência lateral de kDNA poderia portanto desencadear a patologia autoimune (Teixeira e cols, 2011b).

Foi proposto então que a autoimunidade na doença de Chagas poderia acontecer pelos seguintes intermediários: *i*) acumulação gradual de sequências de kDNA integradas nas células somáticas; *ii*) ruptura de ORFs de genes importantes na regulação do crescimento e diferenciação celular; *iii*) alteração dos genes das respostas imunes. Em consequência, o dano cardíaco produzido pelos infiltrados linfocíticos e lise das células alvo parece depender da proliferação clonal de linfócitos que aderem e rejeitam células cardíacas. De interesse, a inexistência de anticorpos contra antígenos de transcritos quimeras sugeriu que a patogênese da autoimunidade na doença de Chagas seja antígeno-independente (Teixeira e cols, 2011b).

Um grande avanço no estudo do efeito destas integrações foi a utilização de um modelo refratário ao *T. cruzi*, eliminando-se de uma vez a possibilidade de uma infecção críptica. Desta forma, foi possível descartar a presença do parasito na patogênese da doença de Chagas, visto que aves com mutação de kDNA adquiridas na fase embrionária adquirem sintomas cardíacos semelhantes aos do chagásico humano (Teixeira e cols, 2011a).

4) A transferência gênica horizontal (TGH)

Transferência gênica horizontal é a passagem e incorporação de material genético de uma espécie em outra (Andersson, 2009). Este fenômeno é um importante fator na evolução do genoma, por meio do qual foi possível criar quimeras genômicas (Andersson, 2009; Thomas, e cols, 2010). A aquisição lateral de genes pode representar vantagem adaptativa. Os genes adquiridos podem conferir novas funções metabólicas. Um exemplo é a presença da enzima glicosil hidrolase, que degrada celulose, presente tanto em fungos como em bactérias que

colonizam o rúmen. Esta vantagem teria sido decorrente da transferência do gene da glicosil hidrolase para indivíduos de espécies filogeneticamente distantes que compartilham o mesmo nicho ecológico. Outro exemplo é a respiração anaeróbica dos cinetoplastidas, que teria adquirido o gene da dihidroorotato desidrogenase de procariotos, e isto teria feito com que a enzima se tornasse independente da membrana mitocondrial (Andersson, 2009). Há muito tempo o pensamento dos cientistas tentam explicar seus achados de genes redundantes em espécies diferentes pela evolução convergente. A TGH possivelmente é um dos mecanismos que explicam este fenômeno (Wallau e cols, 2012).

As primeiras evidências de TGH foram encontradas no genoma de procariotos, e tais eventos têm sido estudados com certa frequência. De fato, a maioria das bactérias realizam trocas de DNA entre si (Alberts e cols, 2004; Gilbert e cols, 2010b). Muitos casos de transferência gênica horizontal de procariotos para eucariotos já foram descritos, mas ainda existem poucos casos na literatura de TGH entre eucariotos, especialmente os multicelulares (Keeling e Palmer, 2008). Em Fungi, foram detectadas trocas de DNA entre membros do reino. Acredita-se que transferências de DNA de eucarioto para eucarioto foram até aqui subestimadas, e que os procedimentos de rastreamento dessas transferências privilegiaram os procariotos (Andersson, 2009).

Por algum tempo, a TGH em eucariotos era considerada inexistente ou então um evento raro, tendo sido demonstrada apenas no caso de genes (Thomas e cols, 2010; Wallau e cols, 2012). No entanto, surgem cada vez mais evidências que um tipo particular de transferência horizontal, a mediada por elementos transponíveis, é um processo muito difundido entre os eucariotos (Thomas e cols, 2010).

A maior parte do genoma dos organismos multicelulares é constituída de DNA sem função gênica, em grande parte proveniente da atividade replicativa de elementos transponíveis (Gilbert e cols, 2010b). Os elementos transponíveis são segmentos de material genético capazes de se mobilizar e de replicar no genoma do hospedeiro, via diversos mecanismos. Sua mobilidade e multiplicação são a base de vários processos de plasticidade gênica, representando uma abundante fonte de variação e inovação genética. E essa capacidade inerente de replicar e integrar no genoma permite que os elementos transponíveis sejam sítios privilegiados para eventos de TGH (Gilbert e cols, 2010b; Thomas e cols, 2010). Tal atividade tem sido proposta como uma parte essencial do ciclo de vida de alguns transposons, por

permitir que o elemento “DNA parasita” colonize novos genomas, onde tem a persistência assegurada pelos mecanismos intrínsecos de replicação (Thomas e cols, 2010; Wallau, 2012).

A forma como o elemento transponível atravessa barreiras celulares para se integrar em outro genoma ainda não está completamente elucidada. Provavelmente, as relações parasita-hospedeiro podem facilitar a transferência horizontal (Gilbert e cols, 2010b), e a incorporação de DNA pode ocorrer via fagocitose ou transdução viral (Andersson, 2009). Existem evidências de que elementos transponíveis de diferentes vertebrados estão presentes no genoma do inseto hematófago transmissor da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus*, sugerindo uma troca de DNA entre estes animais, de maneira direta, ou por meio de intermediários virais ou tripanossomas (Gilbert e cols, 2010a; Gilbert e cols, 2010b). Já foi detectado também elemento transponível OC1 (OposCharlie1) capaz de infiltrar nas células germinativas de diversos mamíferos (Gilbert e cols, 2010a). O próprio DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* já foi encontrado em hospedeiros, como dito anteriormente (Hecht e cols, 2010).

Alguns autores propõem que a propensão a uma transferência horizontal depende do mecanismo de replicação dos transposons (Thomas e cols, 2010). Mesmo assim, a bibliografia apresenta exemplos de TGH que envolvem os principais tipos de elementos transponíveis (Gilbert e cols, 2010b).

Os elementos transponíveis podem ser classificados com base no seu mecanismo de locomoção no genoma. Se eles se movem via um intermediário de RNA são classificados como de classe 1, e se eles se movem via um intermediário de DNA, são classificados como de classe 2 (Thomas e cols, 2010). Os de classe 2 são o mais antigo grupo de transposons presente em todos os reinos. São divididos em duas subclasses: a primeira são aqueles chamados “corta e cola” e a segunda compreende transposons circulares, chamados *Helitrons*, e transposons que se auto-sintetizam, chamados *Maverick* ou *Polintons* (Thomas MC e cols, 2010). Ainda não foram identificados transposons de DNA ativos no genoma de mamíferos (Goodier e Kazazian, 2008). A maioria dos transposons exógenos em mamíferos codificam uma enzima transposase que facilita a inserção no sítio específico (Thomas MC e cols, 2010).

Os elementos transponíveis de classe 1 necessitam da transcrição reversa de um RNA intermediário para inserir o DNA complementar em um novo sítio do

genoma, movimento conhecido como “copia e cola”. São por isso também chamados de retrotransposons (Goodier e Kazazian, 2008; Thomas MC e cols, 2010).

4.1) Os retrotransposons

Os eucariotos possuem mais genes de transcriptase reversa do que genes para qualquer outra proteína codante (Finnegan, 2012). Os elementos que contêm esses genes de transcriptase reversa são chamados de retrotransposons. Eles podem ser divididos em dois tipos principais, de acordo com a estrutura da sequência de DNA e mecanismo de transposição: os “semelhantes a vírus”, com longas repetições terminais (LTR); e os retrotransposons “não retrovirais”, ou não-LTR (Alberts e cols, 2002; Goodier e Kazazian, 2008). Os retrotransposons podem ser autônomos, ou seja, promover sua própria replicação, e não autônomos, que são aqueles que não possuem proteínas replicativas, logo dependem de um elemento autônomo para se propagar (Goodier e Kazazian, 2008).

Os retrotransposons LTR, além das extremidades repetitivas, possuem em sua estrutura pelo menos duas fases de leitura aberta (ORFs), que codificam proteínas semelhantes às proteínas *gag* e *pol* dos retrovírus, cujos produtos formam o “núcleo” do vírion, com duas cópias do RNA genômico associadas com transcriptase reversa, RNaseH, integrase e RNA transportador pareado que irá ser o *primer* para a transcrição reversa. Alguns retrotransposons LTR possuem uma outra fase de leitura aberta que possui um gene semelhante ao *env* viral, compondo um envelope formado pela membrana celular e proteínas codificadas. Alguns autores afirmam que elementos que possuem o gene *env* (presentes em alguns parasitas como *Ascaris lumbricoides* e *Schistosoma mansoni*) são capazes de entrar na célula do hospedeiro (Thomas MC, 2010; Finnegan, 2012).

A transcrição dos retrotransposons LTR começa em uma extremidade repetitiva e termina na outra. O RNAm é levado ao citoplasma onde ocorre sua tradução e a formação de uma partícula semelhante à vírus. Por meio da transcriptase reversa, o RNA é convertido em DNA, formando uma dupla fita com extremidades LTR. Com a ajuda das proteínas virais, ele chega ao núcleo e é integrado ao sítio alvo pela enzima integrase (Thomas MC, 2010; Finnegan, 2012).

Os retrotransposons não-LTR, como o próprio nome diz, não possuem longas regiões repetitivas nas extremidades de suas sequências. Mas estes elementos são

flanqueados por duplicações diretas de 5 a 20 nucleotídeos em sua extensão (Thomas MC, 2010). Os dois maiores grupos de retrotransposons não-LTR em mamíferos são os LINEs (elementos repetitivos longos) e os SINEs (elementos repetitivos curtos). Os LINEs possuem em sua estrutura duas fases de leitura aberta (ORFs): a primeira codifica uma proteína ligante ao RNA e a segunda codifica uma nuclease, uma transcriptase reversa e, em alguns casos, um domínio RNase H. Em sua extremidade 3', é possível distinguir uma cauda poli-A (Goodier e Kazazian, 2008; Finnegan, 2012). Os SINEs também possuem uma extremidade poli-A, mas não podem promover sua própria replicação, sendo portanto não autônomos. Possuem em sua estrutura um promotor para a RNA polimerase III, e sua região central podem conter sequências altamente variáveis (Thomas MC, 2010; Finnegan, 2012).

Estudos demonstram que a retrotransposição de elementos LINE1 ocorre em sua maioria durante o desenvolvimento embriológico, e apenas uma pequena porção ocorre em células germinativas e é herdável (Kano e cols, 2009).

O mecanismo de replicação dos retrotransposons não-LTR, em especial dos LINEs, envolve a transcrição de sua sequência, e o RNA resultante é o intermediário da transposição que codifica as proteínas requeridas. Em geral, o sítio preferencial de integração no genoma é rico em A/T. A cauda poli-A do RNA proveniente do LINE se liga às timidinas da fita do DNA cromossomal por microhomologia, que foi cortado por uma nuclease. A transcriptase reversa inicia assim a síntese de DNA, e a segunda fita é feita a partir da outra extremidade do cromossomo cortado. Enzimas de reparo finalizam a integração (Finnegan, 2012; Kajikawa e cols, 2012). A Figura 7 representa o mecanismo de integração de LINE.

É possível deduzir qual o mecanismo de integração a partir das características estruturais das sequências dos LINEs. A posição onde a segunda fita de DNA é quebrada para se obter a integração definirá o tipo de alteração no sítio alvo. Por exemplo, se a clivagem da segunda fita ocorre a jusante da clivagem da primeira fita, tem-se uma duplicação do sítio alvo. Se a clivagem ocorre no mesmo sítio para ambas as fitas, tem-se uma junção de extremidade cega, e se ocorrer a montante, surge um sítio alvo truncado (Kajikawa e cols, 2012). Estes mecanismos de junção estão resumidos na Figura 8. Tendo isto como base, Kajikawa e cols (2012) demonstram ser possível deduzir o mecanismo de integração observando-se as sequências LINEs.

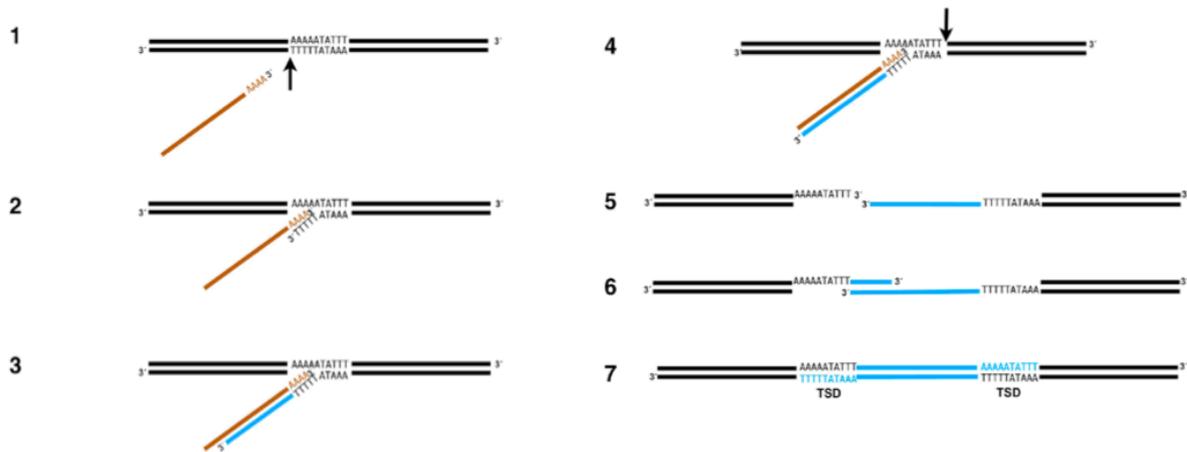


Figura 7. Mecanismo de integração de LINE. (1) O RNA intermediário da transposição (marrom), junto com a transcriptase reversa e uma nuclease associa-se a uma região do cromossomo (preto) rica em A/T. A nuclease provoca uma quebra de simples fita adjacente a uma série de timidinas, (2) e isso permite o pareamento da cauda poli-A do RNA à fita de DNA quebrada. (3) A transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA (azul). (4) A nuclease faz uma quebra na fita cromossomal oposta, alguns nucleotídeos de distância. (5) O RNA molde é removido pela RNase H, (6) permitindo a síntese da segunda fita de DNA. (7) Enzimas do sistema de reparo completam a integração. Adaptado de Finnegan, 2012.

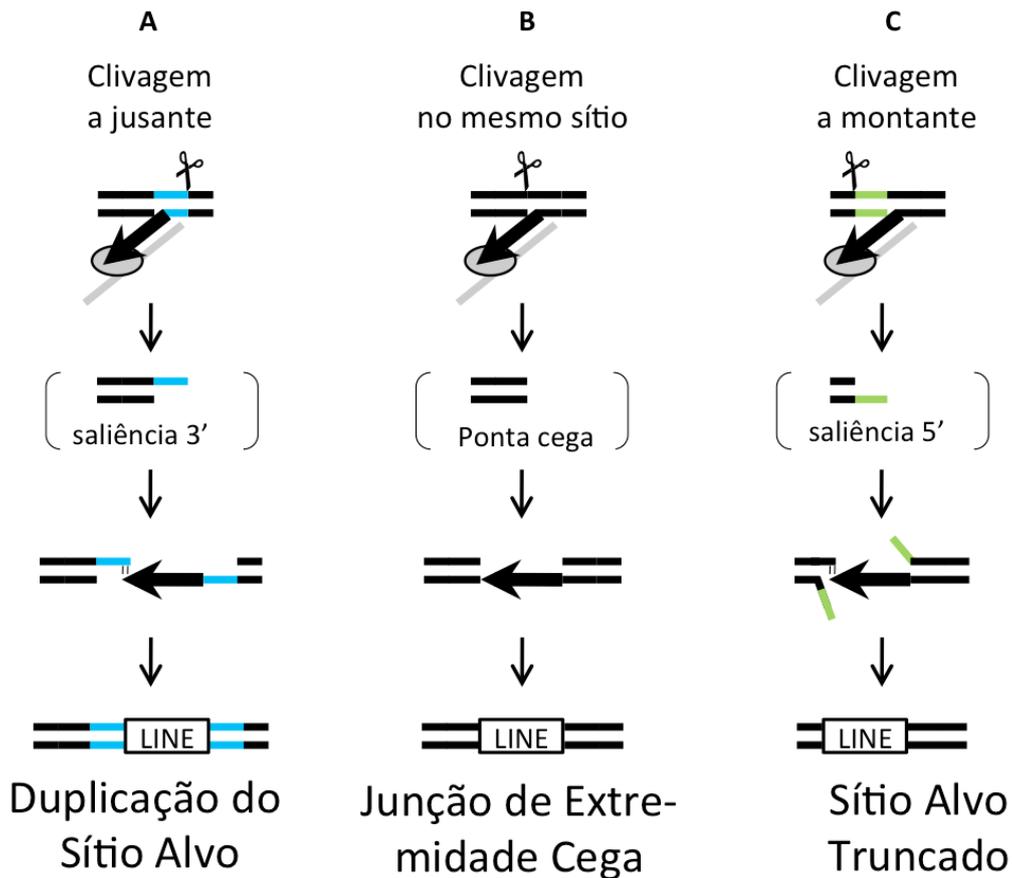


Figura 8. Esquema das alterações no sítio alvo mediante integração de LINE no DNA hospedeiro. A) Se a clivagem da segunda fita ocorrer a jusante da primeira, as extremidades da dupla fita terá uma saliência 3', levando a uma duplicação do sítio alvo. B) Se a clivagem ocorrer no mesmo sítio da primeira fita, será gerado uma ponta cega, e o resultado será uma junção de extremidade cega. C) Se a segunda fita for clivada a montante da primeira, a extremidade terá uma saliência 5', resultando num sítio alvo truncado (Adaptado de Kajikawa e cols, 2012).

Retrotransposons têm contribuído para a evolução de genomas de formas que vão muito além de simplesmente aumentar o tamanho do genoma. Eles inativam genes inserindo-se neles, mudam a expressão gênica ao separar um gene de uma sequência regulatória, altera os produtos gênicos ao alterar o padrão de *splicing* do RNA, permite um rearranjo genômico de alta escala por atuar como sítio de recombinação não-homóloga, dentre muitas outras funções (Finnegan, 2012).

5) A transferência gênica vertical (TGV)

A transferência gênica vertical é a base para o darwinismo clássico, ou seja, a transmissão de caracteres por meio da hereditariedade gera descendentes modificados e evolução (Darwin, 1859). A hereditariedade implica que a informação adquirida é de uma geração a outra (Thaler, 2009). Hoje se sabe que o genoma dos eucariotos não é formado apenas de caracteres herdados, mas é uma combinação da transmissão vertical (de pai para filho) e lateral (trans-espécie), como descrito no tópico anterior (Katz, 2002).

Quando se fala em herança, existem pesquisadores que têm pensado em algo além da simples transmissão de informação genética. Enquanto a TGH transfere apenas DNA, a herança vertical implica em transmissão de DNA cuja funcionalidade depende de regulação pelas proteínas do citoplasma em conformidade com a estrutura das sequências. Alguns cientistas afirmam que a viabilidade e a função de alguns cromossomos vai diferir dependendo do tipo filogenético de citoplasma em que estão inseridos. Esta hipótese limita a capacidade de qualquer sequência de DNA reprogramar uma célula por inteiro, ou seja, a informação terá resultados diferentes em sistemas diferentes, por ter diferentes matérias-primas (Thaler, 2009). Em organismos separados, cada gene está livre para desenvolver funções bioquímicas diferentes. A abrangência da função de um gene pode expandir para a inclusão de atividades adicionais ou de função de outro gene quando tais funções forem críticas para o organismo (Gogarten e cols, 2002).

Toda variação fenotípica para ter uma influência na evolução dos organismos precisa ser herdável (Griffiths e cols, 2000). Muitas mutações têm a tendência de reduzir a capacidade do indivíduo em gerar descendentes, dessa forma, genes prejudiciais tendem a ser eliminados da população e apenas os variantes mais favoráveis permanecem (Mossey, 1999).

Além disso, mutações genéticas só são transmitidas para a geração seguinte se contidas na linhagem de células germinativas (Strachan e cols, 1999). Mutações que ocorrem após a fertilização só irão afetar uma determinada proporção de células do indivíduo, levando ao mosaicismo. Se estas mutações ocorrerem em células somáticas, a progênie do indivíduo não ficará comprometida. Mutações em células somáticas podem trazer risco ao portador, provocando uma proliferação descontrolada de células mutantes, levando a um câncer, ou que ocorrendo em um estágio inicial de desenvolvimento do embrião produza alterações nas células

mutadas, que podem ou não ser incompatíveis com a sobrevivência (Mossey, 1999; Strachan e cols, 1999). Mutações somáticas em indivíduos adultos também podem levar ao aparecimento de doença autoimune (Goodnow, 2007)

A variação genética pode ser observada em dois níveis diferentes. As características genéticas mais simples, que são aquelas cujo genótipo é expresso em um único *locus*, em geral, adquirem um padrão mendeliano de herança, e as frequências gênicas podem ser estimadas. Nesses casos, é possível detectar mais facilmente caracteres dominantes e recessivos (Mossey, 1999; Strachan e cols, 1999). Existem também características que são descritas como não mendelianas. Estas em geral dependem de vários *loci* genéticos, da penetrância dos genes envolvidos nos diferentes indivíduos, da epigenética e da condição ambiental. Também pode ocorrer herança não mendeliana como resultado de uma nova mutação, por mosaicismo nas gônadas no parental (Heyningen e Yeyati, 2004).

A penetrância refere-se à frequência com que a pessoa manifesta a característica presente em seu genótipo. Muitas vezes uma característica dominante não é expressa em um indivíduo ou em uma população. As características genéticas, para serem manifestas, dependem de uma série de fatores, entre eles o *background* genético, o ambiente, estilo de vida, e, em alguns casos, a idade. (Strachan e cols, 1999).

É necessário salientar que nem todas as características fenotípicas são definidas por sequências codantes (Strachan e cols, 1999). A distrofia muscular fascio-scapulo-humoral, por exemplo, está associada a pequenas deleções na região microssatélite no cromossomo 4q35. Alguns autores afirmam que a mutação nesta região pode modificar a regulação dos genes próximos, levando a uma cascata de desregulações em diferentes estágios do desenvolvimento muscular (Broucqsault e cols, 2013).

É possível também ocorrer variações genéticas substanciais sem nenhuma alteração morfológica. São os chamados caracteres canalizados, que apresentam diferentes genótipos para um mesmo fenótipo em uma variedade de ambientes comuns para as espécies. As diferenças genéticas só são reveladas se os organismos forem colocados em um ambiente estressante, ou se uma mutação pressionar o desenvolvimento (Griffiths e cols, 2000).

Nem sempre fenótipos iguais correspondem a genótipos iguais. Muitas características são resultados de uma via complexa, e uma falha em qualquer ponto

desta via pode gerar um fenótipo alterado. Características assim possuem heterogeneidade de *locus*. Isso é claro quando pais com alguma característica recessiva têm filhos fenotipicamente normais, como no exemplo da surdez congênita. Este evento é chamado de complementação, e ocorre porque os pais carregam mutações em *loci* diferentes. (Strachan e cols, 1999).

Além da heterogeneidade de *locus*, mutações diferentes em um mesmo *locus* podem causar diferentes fenótipos. Essa diferença pode ser de grau: existem mutações que apenas inativam parcialmente um gene, levando a um fenótipo, enquanto mutações que inativam completamente o mesmo gene produzem outro fenótipo. Por exemplo, mutações parciais no gene da distrofina levam à distrofia muscular de Becker, enquanto a completa inativação deste gene leva à forma mais severa de distrofia muscular de Duchenne (Strachan e cols, 1999).

6) O modelo *Gallus gallus*

Um excelente modelo para o estudo do efeito da integração de kDNA no genoma do hospedeiro é o modelo de aves. As aves são naturalmente resistentes à infecção por *Trypanosoma cruzi* (Dias, 1944), devido à destruição dos tripomastigotas pelo sistema complemento (Kierszenbaum e cols, 1976; Brener, 1980).

No estágio embrionário inicial, as aves são susceptíveis à infecção (Brener, 1973; Kierszenbaum e cols, 1976), mas eliminam o parasito num estágio mais tardio, precisamente após o oitavo dia do estágio embrionário (Teixeira e cols, 2006; Teixeira e cols, 2011a). Desta forma, aves cujos ovos foram inoculados com cepas de *T. cruzi* nasceram sem o parasito mas com a mutação de kDNA, e isto foi confirmado por meio de PCR com *primers* específicos para o DNA nuclear do *T. cruzi* (indicando infecção ativa) e *primers* específicos para kDNA (sugerindo integração). Estas aves desenvolveram, após adultas, cardiomegalia e miocardite inflamatória semelhantes às encontradas no humano (Teixeira e cols, 2011a; Teixeira e cols, 2011b). O genoma destas aves foi submetido também à técnica de *tp*-TAIL-PCR, e foram obtidas sequências quimeras kDNA-hospedeiro, comprovando-se a transferência lateral de kDNA (Teixeira e cols, 2011a).

As aves kDNA mutadas foram acasaladas, e sua progênie também apresentou mutações de kDNA e infiltrado inflamatório no coração (Teixeira e cols, 2011a). Este achado leva a necessidade de uma análise da herança destas

mutações. Um estudo inicial utilizando-se ovário e esperma já demonstrou a presença destas integrações no genoma das células germinativas (Nitz e cols, 2004; Teixeira e cols, 2011a).

6.1) O Genoma de *Gallus gallus*

O genoma da galinha é relativamente pequeno, correspondendo a um terço do genoma de um mamífero, e tem 11% do total composto de regiões repetitivas, contrapondo-se a 40-50% de elementos repetitivos em mamíferos (Burt, 2005). Essas regiões repetitivas incluem repetições curtas em tandem (teloméricas e centroméricas) assim como numerosas famílias de repetições interespaçadas que são comumente derivadas de elementos transponíveis (Wicker e cols, 2011).

As aves possuem uma grande variedade no tamanho de seus cromossomos. A fêmea é o sexo heterogamético, com uma cópia dos cromossomos Z e W. O macho possui duas cópias do cromossomo Z. O cromossomo W das aves possui similaridades superficiais com o cromossomo Y de mamíferos, mas o Z não reflete o X de mamíferos. Não existe dosagem compensatória dos genes do cromossomo Z, ao contrário do que ocorre no X (Clinton, 1998). Além dos cromossomos sexuais, as galinhas possuem 38 pares de autossomos. Destes, 5 são macrocromossomos, 5 são intermediários, e 28 são microcromossomos (International Chicken Genome Sequencing Consortium - ICGSC, 2004; Burt, 2005).

A taxa de crossing-over dos cromossomos das galinhas é maior que nos humanos, sendo mais alta nos microcromossomos. Isto faz da galinha um modelo ideal para o estudo de *genetic linkage* (Burt, 2005).

A densidade de genes é mais alta nos microcromossomos, ou seja, os macrocromossomos são mais ricos em regiões intergênicas e elementos repetitivos. Os microcromossomos também são mais susceptíveis a mutações na linhagem germinativa (Burt, 2005).

6.1.1) Retrotransposons de *G. gallus*

Os elementos transponíveis mais abundantes no genoma da galinha são os retrotransposons não-LTR da família CR1, correspondendo a mais de 80% de todas as regiões repetitivas do genoma (ICGSC, 2004; Wicker e cols, 2011). Ainda não foi encontrado nenhum SINE ativo no genoma destas aves. (ICGSC, 2004)

O elemento CR1 completo tem aproximadamente 4,5 kb e contém uma região 5'UTR, duas ORFs e uma região 3'UTR, rica em G (Ver Figura 9) (John e Quinn, 2008; Wicker e cols, 2011). Aproximadamente 0,6% das cópias de CR1 são truncadas na extremidade 5', o que caracteriza o notável sucesso de CR1 no genoma da galinha, já que sequências próximas à extremidade 5' são necessárias para a retrotransposição (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

Os LINES de mamíferos são mais promíscuos e capazes de retrotranspor mais RNAm que os elementos interespaçados de aves (Burt, 2005). Isto pode ser explicado pela alta especificidade da transcriptase reversa do elemento CR1 (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

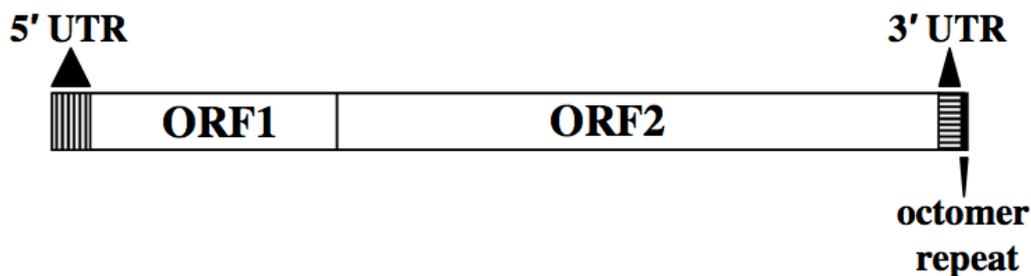


Figura 9. Representação gráfica do retrotransposon *não*-LTR CR1. As duas ORFs (ORF 1 e ORF2) codificam proteínas necessárias para a retrotransposição. A região 5' UTR e 3' UTR flanqueiam as duas ORFs. Adjacente a 3'UTR está a repetição do octâmero (TTCTGTGA)_N (Retirado de John e Quinn, 2008).

6.2) O Sistema imunológico de *Gallus gallus*

Embora o sistema imunológico de aves compartilhe algumas similaridades com os sistemas de outras espécies, ele também tem muitas diferenças, em termos de genes, moléculas, células, órgãos e mecanismos funcionais. Desta forma, extrapolar para aves o modelo imunológico de mamíferos pode prejudicar a qualidade do entendimento das relações parasito-hospedeiro, dentre outras, se esta extrapolação for feita sem a crítica essencial (Kaiser, 2010).

Comparada com mamíferos, as galinhas têm diferentes repertórios de receptores semelhantes a *Toll*, defensinas, citocinas, quimiocinas, anticorpos e

outras moléculas. As aves não possuem eosinófilos funcionais, e o equivalente funcional do neutrófilo é o heterófilo (Kaiser, 2010).

Os macrófagos estão presentes nas aves e são formados na medula óssea. Os monócitos entram na corrente sanguínea onde constituem o maior componente fagocítico da galinha. Nos tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos. Estas células têm um papel importante tanto na imunidade inata quanto na adquirida, como célula apresentadora de antígenos (Qureshi, 2003). Estudos indicam a presença de células NK em galinhas, mas ainda não se tem evidências concretas da sua real importância no combate de patógenos (Rogers e cols, 2008).

O sistema complemento é o componente-chefe da imunidade inata, e tem o papel importante na defesa contra microorganismos patogênicos, ao opsonizar e induzir uma resposta inflamatória. O componente chave para o sistema complemento é o fator C3, que é ativado via clivagem proteolítica. As aves, como os mamíferos, também apresentam uma via clássica, uma via dependente de lectina e uma via alternativa, mas há algumas diferenças nas moléculas envolvidas (Juul-Madsen e cols, 2008). O sistema complemento tem um papel na resistência das galinhas à infecção por *T. cruzi* (Kierszenbaum, 1976).

As aves não possuem linfonodos, mas têm um órgão linfático primário, chamado Bursa de Fabricius, que é o sítio de desenvolvimento do repertório de células B (Kaiser, 2010). A bursa, após o amadurecimento sexual da ave, tende a involuir. Estudos mostram que, apesar de o microambiente bursal ser essencial para o amadurecimento de linfócitos B, existem outros sítios alternativos onde células B podem se desenvolver, porém com um repertório celular mais restrito (Jalkanen e cols, 1984; Mansikka e cols, 1990). Existem imunoglobulinas de aves que são homólogas às imunoglobulinas de mamíferos, como IgM, IgG (também conhecida como IgY em aves) e IgA, com algumas diferenças estruturais entre os dois grupos, o que pode levar a diferenças funcionais na resposta imune (Lundgvist, 2006).

O controle da resposta imune celular ocorre no timo, que é essencial para o amadurecimento das células T. Sabe-se que os linfócitos T são capazes de expressar vários marcadores de superfície homólogos aos mamíferos, como CT2, CT1, CT5, CT4 e CT8. CT4, como nos mamíferos, tem função de auxiliar, e CT8 tem atividade citotóxica (Sharma, 1991). As galinhas possuem receptores de células T (TCRs) $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ como os mamíferos (Vainio e Imhof, 1995). Já foram caracterizadas

células CD4+CD25+ com propriedades T reguladoras supressivas em galinhas (Shanmugasundaram e Selvaraj, 2011).

6.3) Células germinativas, reprodução e embriologia

As células germinativas são o *link* entre gerações, por produzirem gametas que propagam informação genética dos pais para a progênie. As células germinativas primordiais (PGCs) são o único tipo celular do embrião capaz de transmitir informação genética para a geração seguinte. Em aves, as PGCs usam a circulação sanguínea para se transportar para a futura região gonadal, onde migram através da veia dorsal mesentérica e são coletadas na crista germinal (Nakamura e cols, 2013).

Vários estudos têm tentado explicar o desenvolvimento das gônadas nas aves. Sabe-se que mecanismo de determinação do sexo em galinhas é claramente cromossomal (Clinton, 1998). O sexo seria determinado em cada célula do corpo, independentemente de sinalização hormonal (Chue e Smith, 2011). As gônadas tendem a aparecer no dia 3,5 do estágio embrionário, e o começo de sua diferenciação só é evidente histologicamente no dia 6,5 (Smith e Sinclair, 2004).

Em aves, é notável uma assimetria nas gônadas em formação. As galinhas possuem apenas o ovário esquerdo totalmente desenvolvido, e em galos, o testículo esquerdo é levemente maior que o direito (Clinton, 1998). PGCs geneticamente masculinas se diferenciam em espermatogônias no 13^o dia de incubação, e entram numa fase de repouso. Somente após 10 semanas depois de sair do ovo é que a espermatogônia recomeça seu processo de divisão celular e diferenciação. As células germinativas masculinas só atingem um nível substancial de proliferação após a maturidade sexual, que é quando começa a espermatogênese, levando ao desenvolvimento de esperma maduro (Nakamura e cols, 2013).

No sexo feminino as PGCs começam a diferenciação dos ovócitos primários no ovário esquerdo após 8 dias de incubação. O óvulo primário só retoma a primeira divisão meiótica algumas horas antes da ovulação. A segunda divisão meiótica ocorre imediatamente depois, mas pára na fase de metáfase até a ovulação ocorrer. O óvulo é capturado no infundíbulo do oviduto onde a fertilização ocorre. Em aves, a fertilização é polispérmica, e muitos núcleos de espermatozoides são

encontrados na membrana vitelínica, mas apenas um espermatozoide irá fertilizar o ovo (Nakamura e cols, 2013).

Após a fertilização, a primeira divisão meiótica ocorre nas próximas 3h a 5h. As divisões mitóticas do blastodisco começam a ocorrer ainda no corpo da galinha, onde recebe a deposição da casca. Durante a postura, o blastoderma já possui algumas camadas celulares de espessura. Após a postura do ovo, o embrião não irá se desenvolver até ser incubado numa temperatura adequada (Fasenko, 2007).

Devido à fácil manipulação, os embriões de galinha são comumente usados para a manipulação de genes e transgenia, ou seja, a inserção de material genético (Brown e cols, 2003; Han, 2007).

II. Objetivos

1. Objetivo geral

Evidenciar a ocorrência de transmissão vertical (via células germinativas), herança e fixação dos minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em gerações de aves refratárias à infecção.

2. Objetivos específicos:

- Caracterizar quais os sítios de integração de kDNA nas células germinativas de *G. gallus*:
 - a) em espermatozoides;
 - b) em óvulos (não fertilizados) com até 0.5 mm de diâmetro.

- Demonstrar a herança e fixação das mutações de kDNA mediante mapeamento das principais mutações em regiões codificadoras do genoma das aves parentais e seus descendentes.

III. Metodologia

1) Modelo Animal

Aves congênicas de Praga (*Gallus gallus*) foi o modelo utilizado neste trabalho. Os ovos dessas aves foram doados pelo Instituto de Genética Molecular da Academia de Ciências de Praga, República Tcheca. Esta pesquisa foi devidamente submetida e aprovada pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As aves foram mantidas no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, onde havia o controle de luz, com ventilação e temperatura adequados, ou em galinheiros no lado externo ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas.

1.1) Amostragem

Este trabalho utilizou o material genético das células germinativas de 33 aves pertencentes a três famílias. As células somáticas das aves destas famílias foram utilizadas num estudo prévio (Guimaro, 2012). O heredograma das famílias das aves do estudo está ilustrado na Figura 10.

1.2) Inoculação de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* nos ovos férteis

As formas tripomastigotas, crescidas em cultura de células musculares L6 (DMEM, pH 7,2; soro fetal bovino a 10%, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 250 mM de L-glutamina) foram inoculadas através de um pequeno orifício de aproximadamente 1 mm de diâmetro na bolha de ar do ovo.

Aproximadamente 100 formas tripomastigotas (contadas em câmara de Neubauer) foram inoculadas e o orifício foi selado. Os ovos foram incubados a 37,5 °C por 3 semanas, com umidade a 65%. Após 19 dias, os ovos foram transferidos para os berçários onde nasceram os pintos.

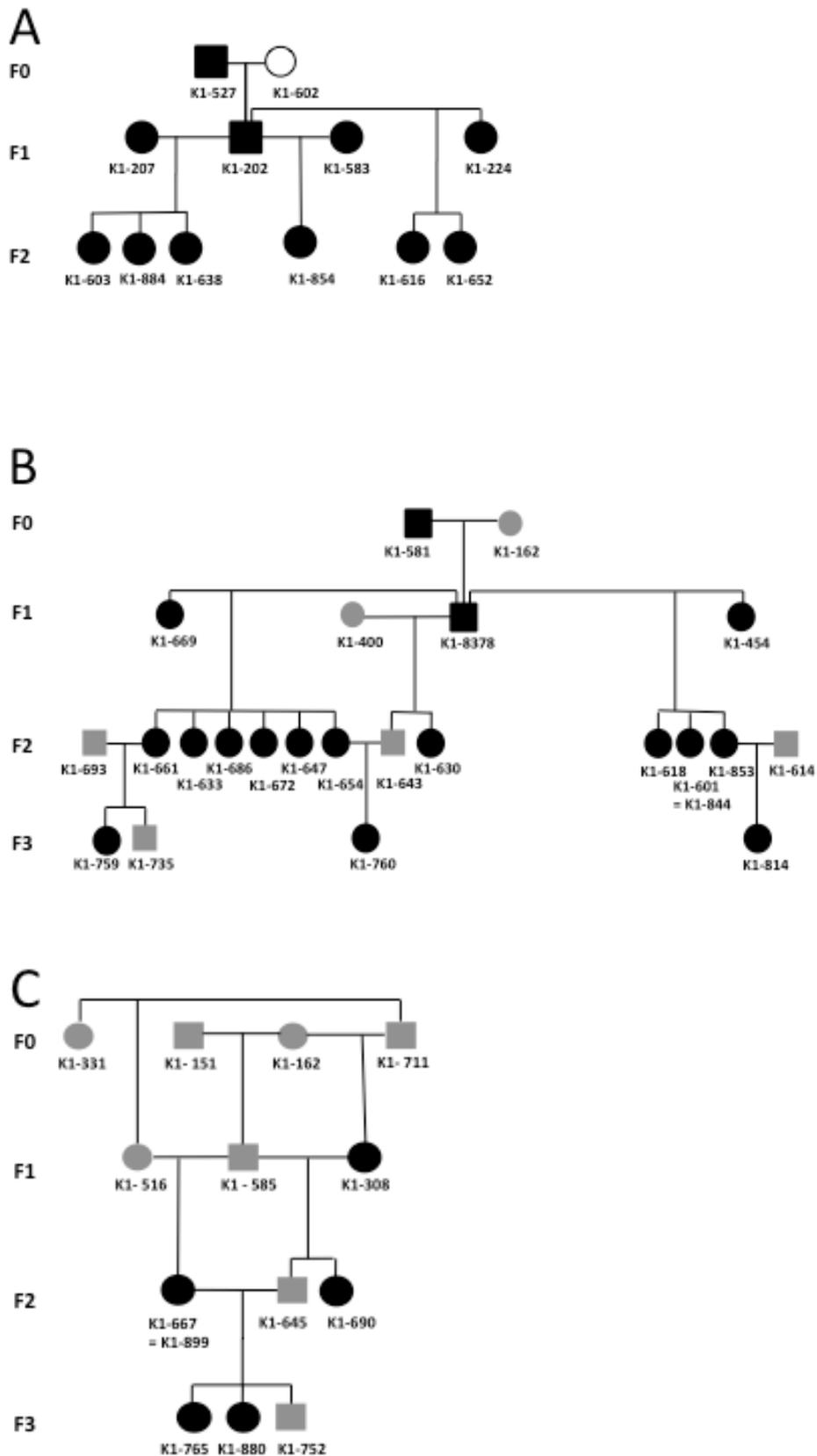


Figura 10. Heredogramas da Família 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Branco: ave proveniente de ovo não infectado com *T. cruzi*. As aves utilizadas no estudo estão realçadas de preto. Em cinza tem-se aves com células somáticas kDNA-positivas, mas que não foram usadas neste estudo.

1.3) Cruzamento de aves

Os pintos que ecolodiram dos ovos inoculados com *T. cruzi* e dos ovos sem infecção cresceram até a idade adulta e, ao alcançar a maturidade sexual aos 8 meses de idade, foram inseminados artificialmente. O galo com as pernas puxadas para a frente era massageado sobre o dorso para eliminar o esperma que era colhido em tubo e usado para inseminação no canal do magnum evertido da fêmea. Os ovos dessas galinhas inseminadas geraram a progênie F1 e, seguindo o mesmo procedimento, foram obtidas as progênies F2 e F3 (Figura 10).

2) Extração de DNA

2.1) Do esperma

Ao esperma colhido foi acrescentado meio DMEM sem soro fetal bovino, pH 7,4, na proporção de 1: 2. A suspensão foi incubada a 37 °C (5% CO₂) por 30 min. O sobrenadante contendo gametas, colhido e sedimentado por centrifugação, foi usado para extração do DNA com solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (proporção 25: 24: 1), e com clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1), conforme descrito por Sambrook e Russel (2001).

2.2) Do ovário

Os ovócitos foram colhidos das aves que faleceram naturalmente ou que foram eutanasiadas. Os ovócitos não férteis (<5mm) foram macerados e suspensos em 10 V de tampão de extração com proteinase K (100 µg/mL), a 37 °C por 12 h. A extração de DNA foi feita pelo método de Sambrook e Russel, 2001). Após precipitação em álcool 100%, lavagem em álcool 70% e secagem, o DNA foi suspenso em TE 8,0 contendo RNase. As amostras foram guardadas a -20 °C.

2.3) *T. cruzi*

O DNA do *T. cruzi* foi extraído de formas epimastigotas crescidas em meio LIT, colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min. O sedimento foi lavado com TBS (Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl), ressuspenso em tampão de lise (na concentração de 5×10^7 células/mL), e incubado a 37 °C. Após 1 h de incubação, adicionou-se proteinase K (100 µg/mL), e deixou incubado por mais 12 h. Depois deste período, foram feitas extrações com clorofane e com clorofil. Precipitou-se o DNA com 2,5 V de etanol 100 % gelado e com 0,1 V de acetato de sódio 3M pH 4,7. O sedimento

obtido foi lavado duas vezes com etanol 70 % gelado e, após secagem, ressuspenso em tampão TE. O DNA total de *T. cruzi* foi guardado a -20 °C.

2.4) kDNA de *T. cruzi*

A extração de kDNA foi feita conforme descrito em Pérez-Morga e Englund (1993), utilizando-se solução tampão NET-100 (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 100mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl), SDS 10 %, seguida por suspensão com NET-100 e sacarose a 20%. Após centrifugação o sedimento de epimastigotas foi ressuspenso em água destilada, e o lisado foi submetido a extração com clorofane e clorofil, precipitado com 2,5 V de etanol 100 % gelado e 0,1 V de acetato de sódio 3 M, pH 8,0. O kDNA então foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e ressuspenso em 200 µL de tampão TE. O kDNA resultante foi estocado a -20 °C.

2.5) Quantificação e análise do DNA extraído

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE). A integridade do DNA foi testada pelo teste PCR específico para o gene constitutivo β -actina.

3) Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Foram feitas reações de amplificação em amostra de DNA das aves. PCRs foram conduzidas com iniciadores (*primers*) específicos para kDNA e para DNA nuclear de *T. cruzi* (nDNA). Bandas de kDNA no genoma das aves foram identificadas por hibridização com sonda específica de kDNA pelo método *Southern blot*. A Tabela 1 inclui os *primers* empregados neste estudo.

3.1) PCR de kDNA

Os *primers* utilizados são específicos para a região conservada de minicírculos de kDNA (*primers* S35, S36).

Os *primers* de kDNA permitem a amplificação de duas regiões conservadas de kDNA com uma região variável inteira entre elas, de tamanho aproximado de 330 pb (Sturm e cols, 1989). As amplificações foram realizadas em triplicata, e, além dos 200 ng das amostras, utilizou-se um controle branco (sem DNA), controle negativo

(com 200 ng de DNA de uma ave kDNA negativa), controle positivo (com 200 ng de DNA de uma ave kDNA positiva), e controle com 200 pg de DNA total de *T. cruzi*.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 0,2 μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu o seguinte programa:

95°C – 5 min
35x { 95 °C – 30s
62 °C – 1 min
72 °C – 1 min
72 °C – 5 min
4 °C - ∞

Os produtos resultantes de cada PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3%, e transferidos para membrana de nylon positivamente ativada, pela técnica de transferência alcalina por capilaridade (Sambrook e Russel, 2001). Esta foi submetida à hibridização com sonda específica para kDNA, marcada com α³²P- dATP, e exposta a um filme fotográfico.

3.2) PCR de nDNA de *T. cruzi*

Os *primers* Tcz1/Tcz2 utilizados são específicos para o DNA nuclear de *T. cruzi* gerando banda de 188 pb (Moser e cols, 1989), cujas sequências estão na Tabela 1. As amplificações foram feitas em triplicata, e, além dos 200 ng das amostras, utilizou-se um controle branco (sem DNA), controle negativo (com 200 ng de DNA de uma ave kDNA negativa), controle positivo (com 200 ng de DNA de um paciente humano TCZ-positivo), e controle com 200 pg de DNA total de *T. cruzi*. A reação correu com as seguintes condições: tampão de reação 10X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂ da Invitrogen; 0,2 μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu o seguinte programa:

95°C – 5 min
 35x { 95 °C – 30s
 68 °C – 30s
 72 °C – 1 min
 72 °C – 5 min
 4 °C - ∞

Os produtos resultantes de cada PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3%, e transferidos para membrana de nylon positivamente ativada, pela técnica de transferência alcalina por capilaridade (Sambrook e Russel, 2001). Esta foi submetida à hibridização por sonda específica para DNA nuclear de *T. cruzi*, marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ - dATP, e exposta a um filme fotográfico.

3.3) PCR direta do gene da enzima málica

Com base nos dados das sequências de integração de kDNA o gene da enzima málica NADP⁺ dependente (NADPME) foi selecionado para amplificação das regiões flanqueadoras da integração mediante PCR direta. Os *primers* foram obtidos da sequência NW_003763650.1 do banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov). Três combinações de *primers* foram planejadas para amplificar a partir da região externa para a mais interna (NADPME s1, s2, s3, as1, as2, as3). A PCR foi feita nas seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,2 μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. O produto de PCR amplificado com os *primers* internos S3 e aS3 foi utilizado como sonda radioativa específica para NADPME.

A amplificação correu com o seguinte programa:

95°C – 5 min
 30x { 95 °C – 30s
 63 °C – 1 min
 72 °C – 1,5 min
 72 °C – 5 min
 4 °C - ∞

4) *tp*TAIL-PCR

A *tp*TAIL-PCR (*target-primer* Thermal Asymmetric Interlaced PCR) foi adaptada da técnica TAIL-PCR (Liu e Whittier, 1995). Enquanto a TAIL-PCR original utiliza *primers* degenerados juntamente com *primers* específicos, a *tp*TAIL-PCR utiliza apenas *primers* específicos. Os *primers* específicos de kDNA e de DNA nuclear de galinha (Tabela 1) foram combinados para três ciclos de amplificação. Para evitar produtos de baixa especificidade a PCR foi conduzida em ciclos alternados de alta e baixa estringência, permitindo sucessivas reamplificações com *primers* aninhados internamente no kDNA, (Hecht, 2010). No primeiro ciclo os *primers* C31 foram combinados com *primers* de kDNA (S34 ou S67); No segundo ciclo, os produtos do primeiro ciclo (diluído 1:40) foi combinado com *primers* de kDNA mais internos (S35 ou S35R), mantendo-se os mesmos *primers* do DNA nuclear de galinha; No terceiro ciclo, os produtos obtidos no segundo ciclo (diluído 1:10) foram amplificados com *primers* de kDNA mais internos (S67R ou S36) e com os *primers* de C31 de galinha.

No primeiro ciclo utilizou-se 200 ng de DNA genômico em solução contendo 1 X de tampão de reação (20 mM Tris HCl pH8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM do *primer* de kDNA, 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen) e 1 mM de cada um dos *primers* de C31. Nos ciclos seguintes o DNA da ave foi substituído por diluições do produto de PCR anterior (1:40 e 1:10, respectivamente). Ao final, os produtos amplificados foram separados por eletroforese (agarose 1%), transferidos para a membrana de nylon, e expostos a uma sonda específica para kDNA (marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ - dATP).

Os *primers* C31, correspondentes a elemento retrotransponível CR1, foram obtidos de uma sequência quimera do clone C31, do cromossomo 3 do genoma de *Gallus gallus*. Apesar disso, os *primers* possuem um perfil randômico na reação. As sequências dos *primers* C31 e de kDNA estão na Tabela 1.

O programa de amplificação da *tp*TAIL PCR está descrito a seguir:

1ª amplificação:

95°C – 5 min

5x { **95 °C – 30s**
64 °C – 1 min
72 °C – 2 min

1x { **95 °C – 30s**
25 °C – 2 min
72 °C – 2 min

12x { **94°C – 30s**
64 °C – 1 min
72 °C – 2 min
94°C – 30s
64°C – 1 min
72oC – 2 min
94oC – 30 s
44oC – 1 min
72oC – 2 min

72 °C – 7 min

4 °C - ∞

2ª amplificação:

95°C – 4 min

12x { **94 °C – 30s**
64 °C – 1 min
72 °C – 2 min
94oC – 30 s
64oC – 1 min
72oC – 2 min
94oC – 30s
45oC – 1 min
72oC – 2 min

72 °C – 7 min

4 °C - ∞

3ª amplificação:

95°C – 5 min

20x { 94 °C – 30s
45°C – 1 min
72 °C – 2 min

72 °C – 7 min

4 °C - ∞

4.1) tpTAIL-PCR específica para o gene da distrofina

A mutação no gene da distrofina também foi selecionado para análise das regiões flangeadoras, a montante e a jusante do sítio de integração do kDNA (Teixeira e cols, 2011a), pela *tpTAIL*-PCR. Ao invés de *primers* para a região C31 da galinha, foram empregados *primers* específicos Gg s3 e Gg as2 que anelam no gene da distrofina (Tabela 1).

As reações foram conduzidas em três ciclos: O primeiro empregou *primers* do gene e *primers* de kDNA (S34 ou S67); o segundo, foi feito com os produtos do primeiro ciclo (diluído 1:40), combinado com *primers* de kDNA mais internos (S35 ou S35R) e os mesmos *primers* de galinha; e o terceiro, utilizou os produtos do segundo (diluído 1:10) com *primers* de kDNA mais internos (S67R ou S36) e com os *primers* do gene da galinha.

Os ciclos da *tpTAIL*-PCR específica para o gene da distrofina está descrito a seguir:

1ª amplificação:

95°C – 4 min

8x { 95 °C – 30s
61 °C – 1 min
72 °C – 2 min

1x { 94 °C – 30s
50 °C – 2 min
72 °C – 2 min

9x { 94°C – 30s
61 °C – 1 min
72 °C – 2 min
94oC – 30s
61oC – 1 min
72oC – 2 min
94oC – 30 s
50oC – 1,5 min
72oC – 2 min

72 °C – 7 min

4 °C - ∞

2ª amplificação:

95°C – 4 min

12x { 95 °C – 30s
61 °C – 1 min
72 °C – 2 min
94oC – 30 s
61oC – 1 min
72oC – 2 min
94oC – 30s
50oC – 1 min
72oC – 2 min

72 °C – 7 min

4 °C - ∞
 3ª amplificação:
 95°C – 4 min
 20x { 95 °C – 30s
 50 °C – 1 min
 72 °C – 2 min
 72 °C – 7 min
 4 °C - ∞

Após a realização das três rodadas, os produtos amplificados ao final da *tpTAIL*-PCR foram separados por eletroforese (agarose 1%), transferidos para a membrana de nylon, e expostos a uma sonda específica para kDNA (marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP).

4.2) *tpTAIL*-PCR específica para o gene da enzima málica

As análises pela *tpTAIL*-PCR também foram feitas para identificar as regiões flangeadoras ao ponto de inserção de kDNA no gene da enzima málica NADP-dependente (NADPME). No primeiro ciclo a PCR correu com *primers* do gene e *primers* de kDNA (S34 ou S67); No segundo ciclo, os produtos da primeira amplificação (diluído 1:40) foram combinados *primers* mais internos de kDNA (S35 ou S35R) com os mesmos *primers* de galinha; No terceiro, os produtos da segunda amplificação (diluído 1:10) foram combinados com *primers* de kDNA mais internos (S67R ou S36) e com os *primers* do gene da galinha. Ao final, os produtos amplificados foram separados por eletroforese (agarose 1%), transferidos para membrana de nylon, e expostos a uma sonda de kDNA marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. Sequências específicas NADPME foram obtidas com a combinação dos *primers* S2/aS2 do gene com os de kDNA (Tabela 1).

Os ciclos da *tpTAIL*-PCR específica para NADPME são idênticos ao ciclo da *tpTAIL* PCR específica para a distrofina.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de PCR

| Primer | DNA a ser amplificado | Sequências | Tm* |
|------------|------------------------------|---|------|
| S34 | kDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3' | 57,9 |
| S67 | kDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)T C 3' | 60,1 |
| S35 | kDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3' | 59,4 |
| S36 | kDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3' | 57,9 |
| TCZ 1 | nDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3' | 67,6 |
| TCZ 2 | nDNA de <i>T. cruzi</i> | 5' CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3' | 61,4 |
| C31 s1 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' AGA GAA CTG CTT GAA ACC TAC AGG 3' | 56,6 |
| C31 s2 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' GTG AAA GGC CTA TAT CAA GTC AGC 3' | 55,5 |
| C31 s3 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' CCA AGG AGC TGG TAG AGA GCA 3' | 58,5 |
| C31 as1 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' CCA CGC TGG GAG AAG AGT T 3' | 57,1 |
| C31 as2 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' CTC ACT TCC TCC CTT CCC A 3' | 56,1 |
| C31 as3 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' TGC TCT CTA CCA GCT CCT TGG 3' | 58,5 |
| NADPME s1 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' CTG ACC CTG AGG ACA CCA AAC 3' | 61,9 |
| NADPME s2 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5'CCA GAG GCA CAT GGG TGT AA 3' | 61,9 |
| NADPME s3 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' GGG ACT GCC TGA ATC ACT CTC 3' | 61,2 |
| NADPME as1 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' TGC TGA GGT GTG GCC AAG 3' | 62,1 |
| NADPME as2 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' TTG TCC TGC AGC CAT ATG G 3' | 60,6 |
| NADPME as3 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' TCA TTC TAC CTG AGG TGC CC 3' | 60,1 |
| Gg s3 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5' TTCTAGTCCGCTCCTGTTCAA 3' | 60,0 |
| Gg as2 | nDNA de <i>Gallus gallus</i> | 5'AAAGCATTCCAGTGGCAGAA 3' | 60,8 |

* Tm: temperatura média de anelamento em °C

5) Transferência dos produtos de PCR para a membrana de *nylon*

Conforme descrito anteriormente, os produtos de PCR foram transferidos para uma membrana de *nylon* por meio da técnica de transferência alcalina (Sambrook e Russel, 2001). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL, utilizando-se tampão TAE 1X. Após a corrida, o gel foi tratado com NaOH 0,4M por 20 min para desnaturar o DNA. Por capilaridade, utilizando-se NaOH 0,4M, os amplicons foram transferidos para a membrana de nylon positivamente carregada (HybondTM-N+, Amersham GE Healthcare). O processo de transferência ocorreu durante 8 a 12 h. Após este tempo, as membranas foram deixadas sobre a bancada para secar e posteriormente foram submetidas à hibridização com sonda radioativa.

6) Clonagem dos Produtos da *tpTAIL-PCR*

As amostras que amplificaram na reação de *tpTAIL-PCR*, após ter sido analisadas com hibridização com sonda radiomarcada específica para kDNA, foram ligadas a um plasmídeo pGEM T-Easy (PROMEGA), seguindo-se o protocolo do fabricante, e transformadas em *Escherichia coli* competente por choque térmico.

6.1) Preparo de células competentes

As células utilizadas para a transformação foram *E. coli* XL10-GOLD (Stratagene), que se tornaram competentes por meio de tratamento com RF1 (RbCl – 100mM, MnCl₂ - 50mM, Acetato de Potássio – 30mM, CaCl₂ 2H₂O – 10mM e Glicerol – 15%) e RF2 (MOPS – 10mM, RbCl₂ – 10mM, CaCl₂ – 75 mM, Glicerol – 15%). Foi seguido o protocolo da Promega (1996).

6.2) Transformação

A transformação pelo choque térmico, seguiu o protocolo: Para 100 µL de *E. Coli* XL-10 GOLD, acrescentou-se o produto da ligação no vetor (pGEM T-Easy), e deixou-se a mistura 30 min no gelo. Logo em seguida, os transformantes foram aquecidos a 42 °C por 2 min, e transferidos imediatamente para o gelo. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido, e as células transformadas foram deixadas crescer no agitador a 37 °C por 1 h e 30 min. Após este período, as células foram plaqueadas

em meio LB sólido contendo ampicilina e X-gal, a fim de selecionar as células resistentes ao antibiótico. As células azuis retiveram o plasmídeo vazio. Os insertos no vetor foram obtidos pela lise das células brancas.

6.3) Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon.

Apenas as colônias brancas foram escolhidas para serem replicadas em membrana de *nylon* sobre meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Isto porque as colônias azuis indicavam a presença do plasmídeo vazio no qual o gene da β-galactosidase íntegro produzia a coloração pela reação com X-Gal. As colônias replicadas na membrana foram também replicadas diretamente no meio LB com ampicilina, criando-se o molde espelho da membrana. Placas membrana-espelho foram incubadas *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, o DNA das bactérias na membrana, foi fixado pelo tratamento com solução SDS 10% por 10 min, seguida desnaturação em NaOH 0,4 M por 10 min, e lavagem em SSC 2X, também por 10 min. Após este tratamento, a membrana posta pra secar foi hibridizada com sonda radiomarcada específica. Para os produtos de *tpTAIL*-PCR utilizou-se apenas sonda específica para kDNA; as colônias que hibridizaram na membrana foram identificadas pelo molde placa-espelho para extração plasmidial e sequenciamento.

Quando a transformante do amplicon *tpTAIL* era gene-específica (distrofina ou NADPME), a membrana era hibridizada com a sondas do gene, e, após de-hibridização, hibridizada de novo com sonda de kDNA. Apenas as colônias que hibridizaram para ambas as sondas foram escolhidas para a extração plasmidial.

6.4) Extração de DNA plasmidial

As colônias desejadas foram inoculadas da placa espelho para 5 mL de meio LB líquido, onde cresceram 12 h a 37 °C. A extração foi realizada utilizando-se o kit Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante.

7) Sondas Radioativas

Tanto os produtos de PCR transferidos para a membrana de nylon (item 5) quanto as colônias transferidas para a membrana (item 6.3) foram submetidos à

hibridização com sonda radioativa a fim de avaliar a especificidade dos amplicons/insertos.

Neste trabalho utilizou-se quatro sondas radiomarcadas [α - 32 P]:

- I. Sonda específica para kDNA (Produto de PCR de DNA de *T. cruzi* amplificado com *primers* S35/S36 e purificado com o kit illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare)
- II. Sonda específica para DNA nuclear de *T. cruzi* (Produto de PCR de DNA de *T. cruzi* amplificado com *primers* TCZ1/TCZ2 e purificado com o kit illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare)
- III. Sonda específica para o gene da distrofina (Produto de PCR de DNA de *G. gallus* amplificado com *primers* GD-s1/GD-as1 e purificado com o kit illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare)
- IV. Sonda específica para o gene da enzima málica NADP-dependente (Produto de PCR de DNA de *G. gallus* amplificado com *primers* NADPME-s3/NADPME-as3 e purificado com o kit illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare)

7.1) Marcação e purificação de sondas radioativas

Para a marcação de sonda radioativa, utilizou-se o kit *Random Primer Labelling System* (Invitrogen); 30 ng dos fragmentos de DNA descritos acima foi misturado com dATP radiomarcado com α - 32 P. A marcação seguiu os protocolos do fabricante. Após uma reação de 3 h com dCTP, dGTP, dTTP, α - 32 P-dATP e enzima *Klenow* com atividade polimerase. Adicionou-se tampão de parada antes de purificar a sonda. A purificação da sonda radiomarcada foi feita em Coluna de Sephadex G50 com lã de vidro (Sambrook e Russel, 2001).

7.2) Hibridização com sonda radioativa

Antes da hibridização com sonda radiomarcada, as membranas foram pré-hibridizadas por pelo menos 2 h com solução de pré-hibridização (PEG 800 10%, SDS 7%, SSPE 1,5% e 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmão). Em seguida as sondas foram desnaturadas por fervura a 100 °C e adicionadas à solução de pré-hibridização. A hibridização transcorreu por aproximadamente 12 h, a 65 °C. Após este período, foi removido o excesso de sonda (ligação inespecífica) e as membranas foram lavadas com soluções de estringência crescente (SSC 2X / 0,1%

SDS e SSC 0,1X / 0,1% SDS) durante 15 min cada a 60 °C. Após a lavagem, as membranas úmidas foram revestidas em plástico filme de PVC e colocadas em cassete metálico para exposição a filme sensível a raios X (Kodak T-MAT). Os cassetes foram deixados a -80 °C para exposição do filme por tempo variável, dependendo da quantidade de DNA na membrana e da meia vida do radioativo. A revelação dos filmes foi feita em sala escura com reagentes comerciais Kodak.

8) Análise de Sequências em Banco de Dados

Os clones de interesse descritos no item 6.4 foram enviados para sequenciamento automático, onde se utilizou os *primers* T7 e SP6 para amplificação das seqüências. Os insertos foram analisados no algoritmo BLASTn, disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para análise dos insertos foram utilizados os seguintes parâmetros: *Database – Others (Nucleotide collection)* e *Somewhat similar sequences* para análise de seqüências de kDNA de *T. cruzi*, e, para a análise de seqüências de galinha: *Database – Gallus gallus (Genome reference only)* e *Somewhat similar sequences*. Apenas análises com *E-value* e identidade significativos foram consideradas.

Os elementos repetitivos nas seqüências quimeras foram identificados com ajuda do programa CENSOR-GIRI (Genetic Information Research Institute - <http://www.girinst.org>). As quimeras foram analisadas nos programas GENEIOUS e DNAMAN. A conformação espacial de alguns segmentos de DNA foram analisadas com as ferramentas de bioinformática do ICGEBnet, *bend.it* e *model.it*, disponíveis em: <http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/index.php> (Vlahovicek e cols, 2003).

IV. Resultados

1) Integração de kDNA em células germinativas de aves eclodidas de ovos inoculados com *Trypanosoma cruzi*.

As amostras de DNA de ovário e de sêmen das aves nas três famílias do estudo (Figura 10) foram submetidas aos testes de PCR com *primers* específicos para a região do minicírculo de kDNA e para o DNA nuclear de *T. cruzi*. As reações foram feitas em triplicatas e submetidas à hibridização com sonda específica. A Figura 11 mostra o resultado obtido nas reações específicas para as três famílias.

Confirmando a refratariedade das aves ao *T. cruzi*, todas as amostras de DNA tiveram resultado negativo para o DNA nuclear do parasito, e, portanto, não há infecção ativa em *Gallus gallus* que eclodiram de ovos inoculados. Os controles positivos de chagásico e de DNA do *T. cruzi* hibridizaram com a sonda específica (Figura 11), viabilizando o uso da técnica.

Por outro lado, a PCR feita com *primers* específicos para kDNA mostrou amplificação de sequências de minicírculos em todas amostras de DNA de sêmen e de ovócitos de aves eclodidas de ovos inoculados com *T. cruzi* (F0) ou de progênes F1, F2 e F3. Na figura 11, é possível ver a banda específica de 330 pb e seus catâmeros. A identificação de sequências de minicírculos de kDNA nas aves indicadas nas famílias 1, 2 e 3 é compatível com eventos de transferência horizontal (TGH) nas células germinativas destas aves. O fato de ter sido detectado kDNA nas progênes indica o fenômeno de herança do evento de integração pela transferência vertical (TGV) da mutação, que foi herdada via célula germinativa. A herdabilidade das mutações de kDNA do *T. cruzi* foi documentada em todas as aves, nas três famílias do estudo.

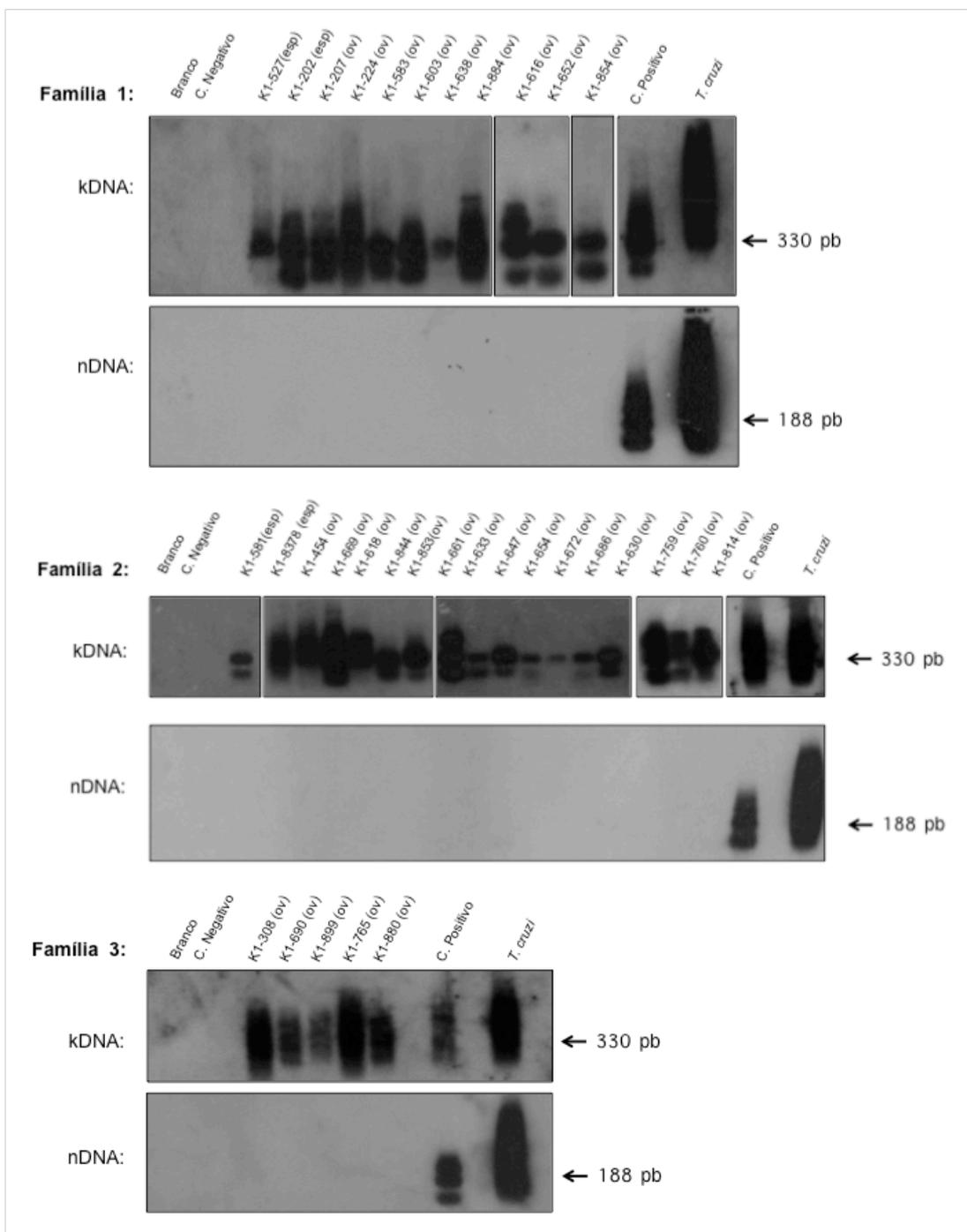


Figura 11. Presença de kDNA e ausência de nDNA de *Trypanosoma cruzi* em células germinativas de *Gallus gallus*. A hibridização dos produtos de PCR com sonda específica mostrou bandas positivas de kDNA, e ausência de nDNA. Note positividade dos controles positivos de kDNA e de nDNA (de chagásico). Branco: controle sem DNA; Controle Negativo: ave nascida de ovo não inoculado com *T. cruzi*; Controle Positivo: chagásico; *T. cruzi*: DNA total do parasito.

2) Análises dos sítios de integração de kDNA

A análise das sequências de kDNA inseridas no genoma da galinha, a fim de descrever eventos de TGH e TGV, foi possível pela técnica de *tpTAIL*-PCR. Do total de 298 clones enviados para sequenciamento, 29 clones apresentaram sequenciamento de baixa qualidade, com muitos nucleotídeos não identificados. Entre os 269 clones restantes, 45 exibiam apenas sequências de kDNA, e outros 27 só tinham fragmento de genoma de galinha. De interesse, 177 clones revelaram sequências quimeras de kDNA-DNA de galinha. Desses, 39 eram redundantes e 10 não tinham similares no banco de dados. O rendimento da técnica alcançou 68%, gerando 138 sequências quimeras não-redundantes oriundas das aves das três famílias. As sequências obtidas estão apresentadas no Anexo I. O número de integrações encontradas por ave variou de dois até dez. Em média, foram obtidas $4,3 \pm 2,1$ sequências por ave. Este rendimento é muito superior àquele obtido pela PCR direta (Hecht e cols. 2010).

Foram encontrados clones em 18 dos 38 autossomos da galinha, e também no cromossomo Z. A Figura 12 mostra a frequência de integrações de kDNA em cada cromossomo da galinha. Vê-se que mais de um quarto das integrações ocorreram no cromossomo 1. Os outros cromossomos que mais frequentemente tiveram as integrações foram aqueles de números 2, 5, 9, 12, e o cromossomo sexual Z. Em apenas 4,2% das sequências não foi possível identificar o cromossomo onde houve a integração.

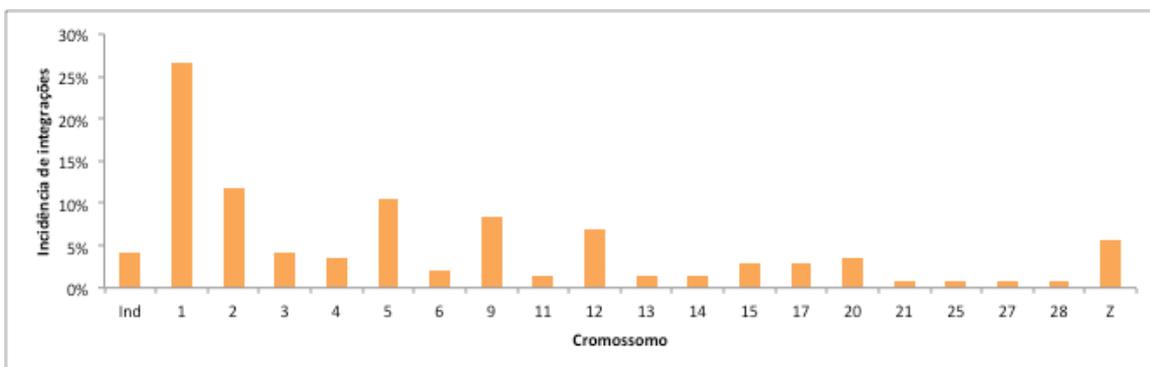


Figura 12. Distribuição das integrações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma das aves congênicas de Praga. Ind =indeterminado.

As análises no algoritmo Blastn (NCBI) e no GIRI revelaram que aproximadamente 29% das integrações ocorreram em genes reconhecidos no

genoma da galinha e que, em apenas 2% dos casos, a integração ocorreu em região codificadora de proteína não caracterizada. A Tabela 2 mostra os genes onde ocorreu evento de integração de kDNA. Em 29% dos casos a integração de kDNA foi encontrada em elementos transponíveis (Tabela 3). Em 15%, as integrações ocorreram em região de retrotransposons não-LTR. O total de 45% das integrações ocorreram em retrotransposons LTR, transposons de DNA, regiões satélites ou do centrômero, ou ainda, em regiões indeterminadas. Em 9% dos casos essas integrações estavam inseridas em retrotransposon CR1 contido em região gênica. Na Figura 13, as integrações de kDNA no genoma de *Gallus gallus* estão distribuídas de acordo com a sequência genômica identificada.

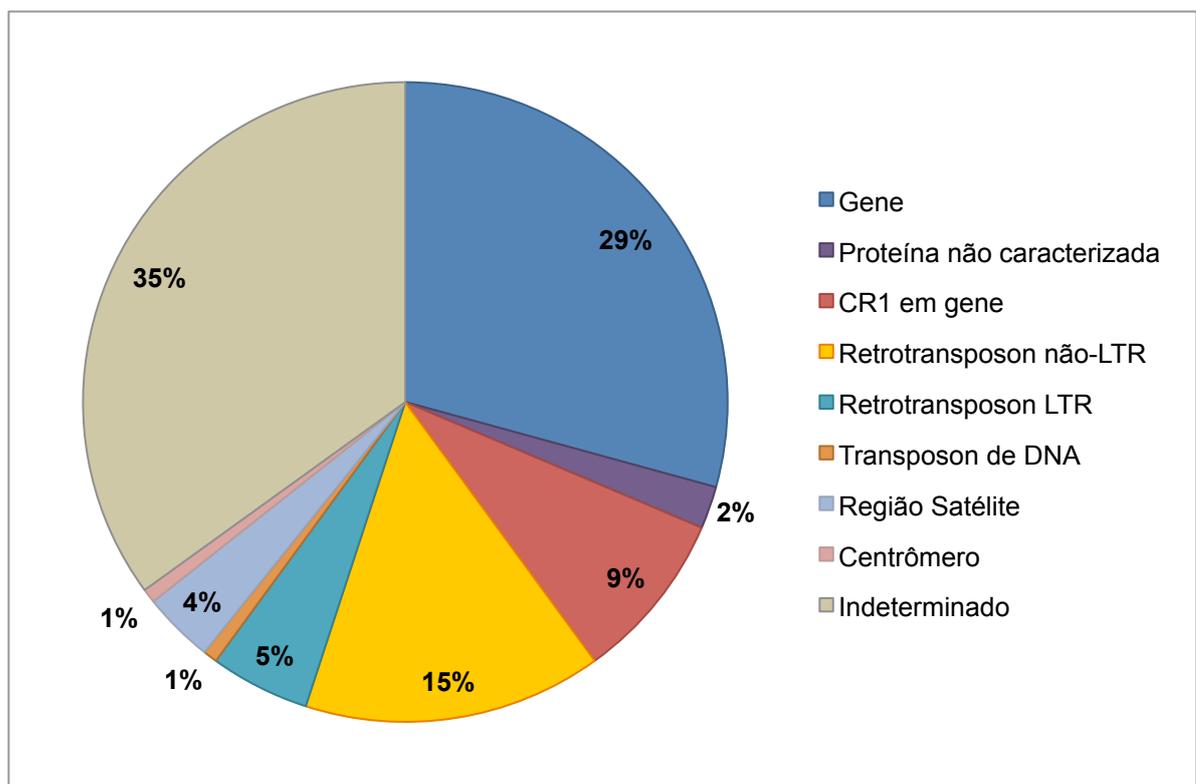


Figura 13. Caracterização das regiões do genoma de *Gallus gallus* flangeadoras dos sítios de integração de sequências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi*.

Tabela 2. Regiões codificadoras do genoma da galinha que receberam integração de minicírculos de kDNA.

| Locus | Tamanho da sequência | Gene | Frequência de integrações |
|----------------|----------------------|--|---------------------------|
| NW_001471668.2 | 185 pb | Provável palmitoiltransferase ZDHHC14 | 1 |
| NW_003763650.1 | 270 pb | Teneurina-4 | 1 |
| NW_003763812.1 | 162 pb | Similar a atractina 1, isoforma 2 | 1 |
| NW_003763785.1 | 124 pb | Tetraspanina 18 | 1 |
| NW_003763931.1 | 95 pb | Xilosiltransferase 1 | 1 |
| NW_003763785.1 | 207 pb | Inositol-trifosfatase 3-quinase A | 1 |
| NW_003764296.1 | 43 pb | Canal de cátion 1, sensível a amilorida, neuronal | 1 |
| NW_003764143.1 | 82 pb | Citidina desaminase | 1 |
| NW_001488830.2 | 51 pb | Succinil-CoA: 3-cetoácido-coenzima A transferase 1 | 1 |
| NW_003763881.1 | 114 pb | Preproteína colagenase tipo IV | 1 |
| NW_001471710.2 | 104 pb | RAC-alfa proteína serina/treonina quinase | 1 |
| NW_003763668.1 | 638 pb | E3 ubiquitina proteína ligase HECW1 | 1 |
| NW_003763903.1 | 619 pb | Proteína <i>Forkhead</i> | 1 |
| NW_003763913.1 | 641 pb | Carreador de soluto família 25 membro 48 | 1 |
| NW_003763693.1 | 534 pb | Proteína tirosina fosfatase tipo IVA 3 | 1 |
| NW_003764126.1 | 329 pb | Proteína tipo retinoblastoma 1 | 1 |
| NW_003763650.1 | 135 pb | Fator de crescimento D derivado de plaqueta | 1 |
| NW_001471461.2 | 56 pb | Citospina-A | 1 |
| NW_003763785.1 | 449 pb | Fator de transcrição SOX-6 | 2 |
| NW_003763680.1 | 166 pb | Proteína fosfatase mu | 2 |
| NW_001471673.2 | 652 pb | Peptodil-prolil cis-trans isomerase FKBP1B | 2 |
| NW_003764074.1 | 512 pb | Adenilato quinase 8 | 4 |
| NW_001471534.2 | 159 pb | Piruvato dehidrogenase quinase | 4 |
| NW_003763668.1 | 198 pb | Proteína PTHB1 | 5 |
| NW_003763650.1 | 100 pb | Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial | 15 |

Tabela 3. Elementos repetitivos do genoma da galinha onde ocorreu integração de minicírculos de kDNA.

| Classe Repetitiva | Frequência de Integrações | Tamanho (pb) |
|----------------------------|---------------------------|--------------|
| Satélite | 4 | 396 |
| <i>Transposon de DNA</i> | 1 | |
| hAT | 1 | 87 |
| Retrovírus Endógeno | 1 | |
| ERV3 | 1 | 55 |
| <i>Retrotransposon LTR</i> | 7 | |
| DIRS | 1 | 64 |
| BEL | 1 | 44 |
| <i>Hitchcock</i> | 2 | 161 |
| <i>Gypsy</i> | 3 | 58 |
| Retrotransposon não-LTR | 39 | |
| Crack | 1 | |
| I | 1 | 37 |
| CR1 | 35 | 133 |
| <i>Penelope</i> | 2 | 121 |
| Elementos Transponíveis | 48 | |

A Figura 14 mostra exemplo de sequência quimera encontrada na ave k1-633, da Família 2, com a integração de kDNA no *locus* NW_003763668.1 da proteína E3, ubiquitina ligase HECW1. Esta proteína é mediadora da ubiquitinação e subsequente degradação do DVL1, um gene relacionado à proliferação celular. Como se pode observar, existe uma região de microhomologia entre aquele *locus* do genoma e o kDNA integrado. As sequências deste trabalho apresentaram região de microhomologia, e em apenas três sequências, não foram localizados compartilhamento de nucleotídeos. Tais regiões nas diferentes quimeras exibem

blocos ricos em CA, e, em sua grande maioria, são semelhantes às regiões conservadas dos minicírculos de kDNA (CSB1, CSB2, CSB3). Essas microhomologias podem intermediar a integração do kDNA, quase sempre encontrado nos sítios repetidos e complementares presentes no genoma da galinha. Essas características evidenciam os *hotspots* e explicam a imensa variedade de

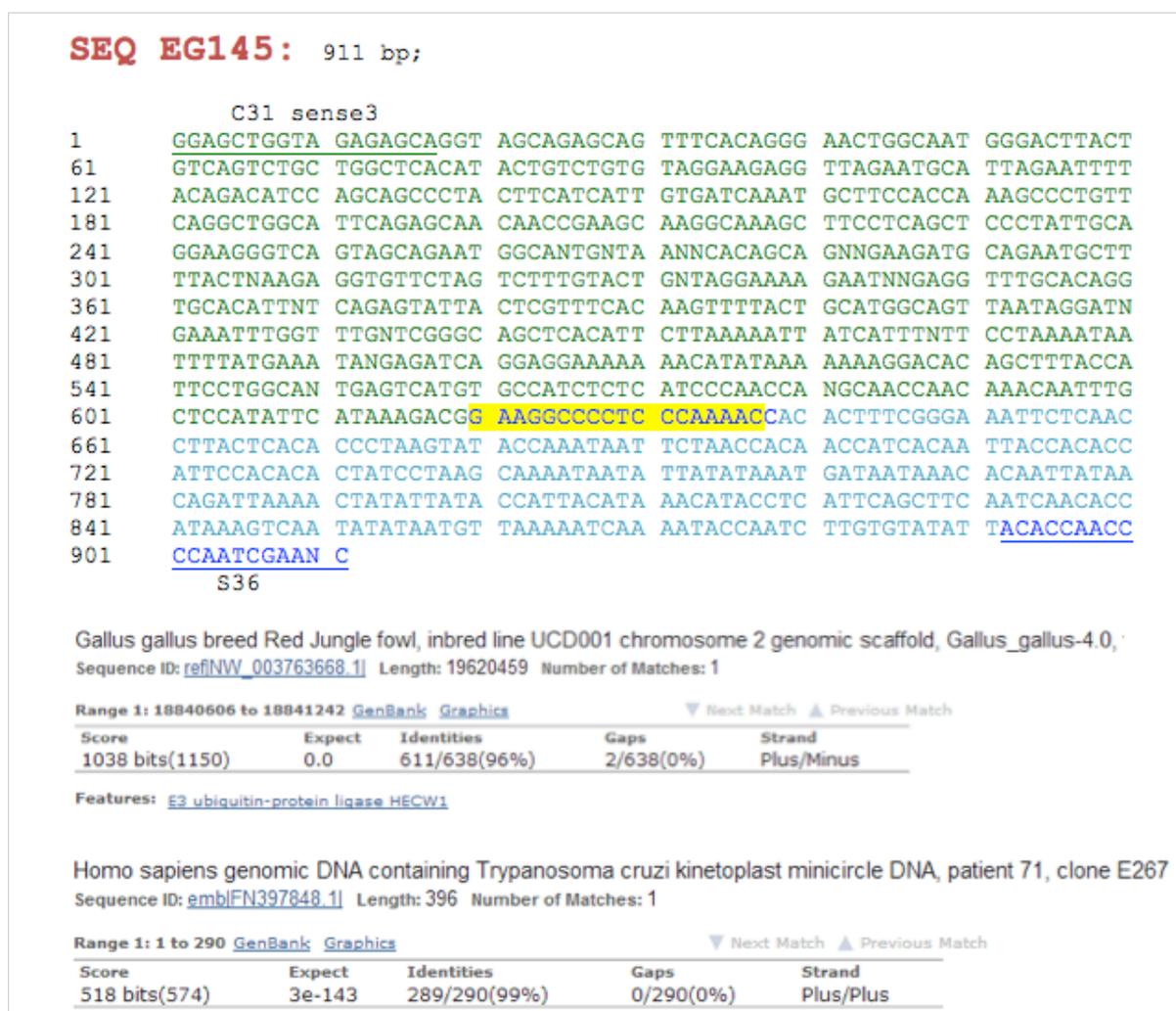


Figura 14. Integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no genoma da galinha. A análise Blastn do clone EG145 mostra integração do kDNA (azul escuro: região conservada; azul claro: região variável) no locus NW_003763668.1 do cromossomo 2 (verde) correspondente a sequência codificadora da proteína E3, ubiquitina ligase HECW1. A sequência rica em CA (cor amarela) mostra microhomologia que intermedia a integração do kDNA. Os primers aparecem sublinhados na sequência.

sequências de kDNA que integram nesses sítios preferenciais.

Em dois clones, foi possível identificar fragmentos de DNA de diferentes cromossomos na mesma sequência quimera. A Figura 15 exhibe o clone EG120, da ave k1-669 (Família 2). Nesta sequência existe um fragmento do cromossomo 12 (NW_003763892.1) e outro do cromossomo 6 (NW_003763812.1) interligados pela

sequência de kDNA. Este mosaicismos pode ser explicado pelo *hitchhiking* do elemento retrotransponível (Simões-Barbosa, 2006) ou pela mobilização do próprio kDNA por recombinação mediada pela microhomologia (Hecht e cols, 2010).

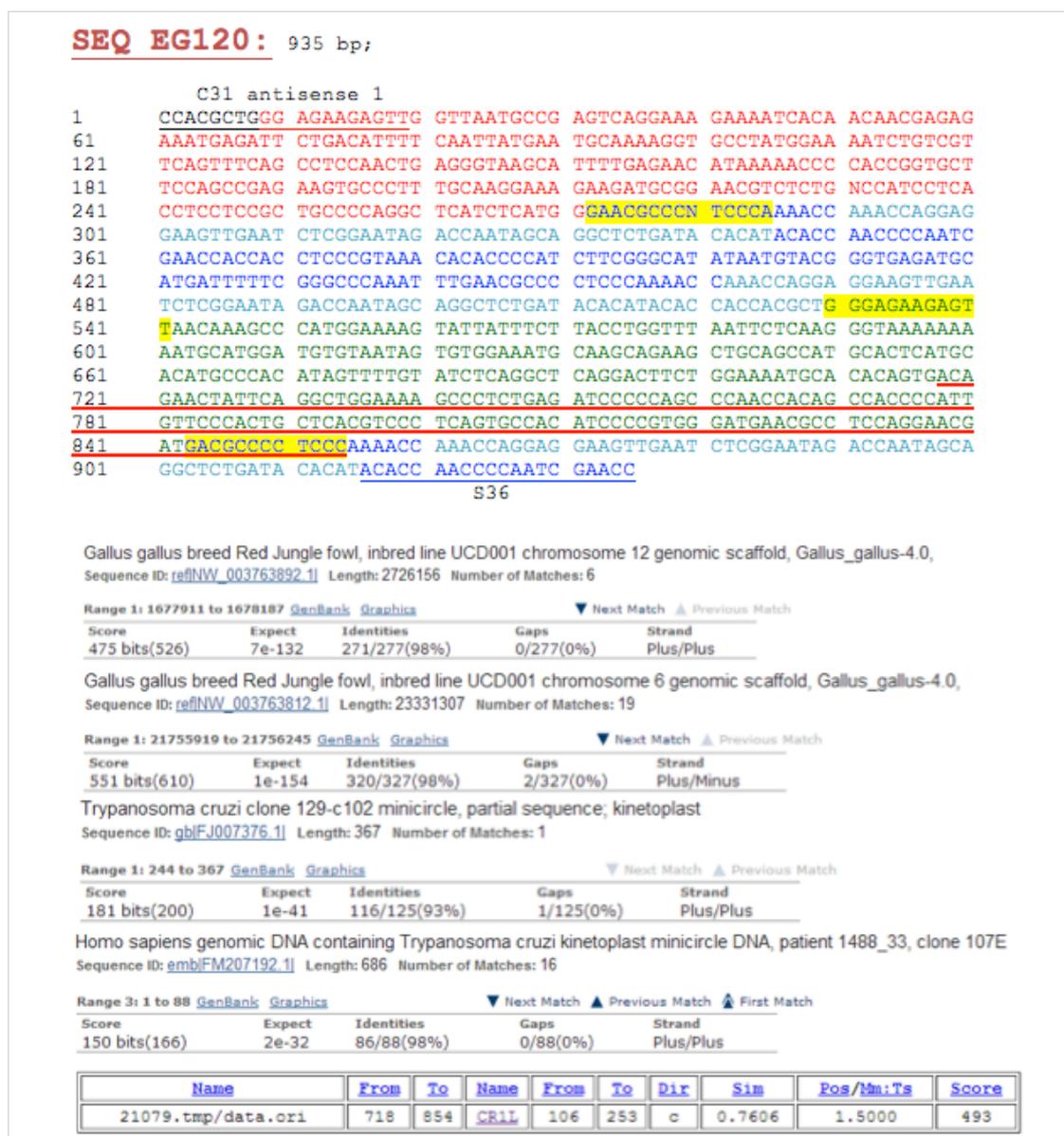


Figura 15. Integração de minicírculo e *hitchhiking* de kDNA de *T. cruzi* no genoma de *Gallus gallus*. A sequência do clone EG120 mostra uma integração de kDNA (azul escuro: região conservada; azul claro: região variável) entre o locus NW_003763892.1 do cromossomo 12 (vermelho) e o locus NW_003763812.1 do cromossomo 6 (verde). Em amarelo tem-se a região de microhomologia, e os *primers* utilizados na reação estão sublinhados. Uma parte da região do genoma da galinha foi reconhecida como um retrotransposon CR1 (sublinhado vermelho). O resultado da análise do BLASTn e do Gini está indicado abaixo da sequência.

Como mostra a Figura 13, algumas integrações de kDNA ocorreram em fragmentos de retroelementos CR1 na sequência de gene. Este achado sugere que a sequência (em verde, Figura 16) intermediária do genoma da galinha pode ser um intron daquele gene, ou, ainda, pode ser um fragmento truncado do retroelemento degenerado (Wicker e cols, 2005). Uma destas integrações está representada na Figura 16.

SEQ EG302: 377 bp;
C31 antisense 3

```

1   TGCTCTCTAC CAGCTCCTTG GGCAGCCCAT TCCTGTGCCT GCTCACTCTT TCAGAGAAAT
61  ATTTCTAAT GCCCAACCTG AACCTCCCCT GACACAAGGC CACGCTCTCT TATCTTCTCC
121 TGCTAGTTAT GCAAGAGAAG AGGCCGACCC CCCCTCCCAA AACCATATG TACGGGTGAG
181 ATGCATGATT TTTTCGGGCC AAATTTGAAC GCCCCTCCCA AAACCATAAT GTACGGGGGA
241 GATGCACACC AACCCCAATC GAATCTCCGG TCTACAGTCC CCATCTCAGC TCTTACTTCA
301 GTTCTGTCTC CGGTCTACAG TCCCCATTTT CGGGCAAATA ATGTACGGGT GAGATGCACA
361 CCAACCCCAA TCGAACC

```

S36
Gallus gallus breed Red Jungle fowl, inbred line UCD001 chromosome 1 genomic scaffold, Gallus_gallus-4.0, Sequence ID: [reflNW_001471534.2](#) Length: 17865413 Number of Matches: 1

Range 1: 12950938 to 12951098 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--------------|-----------|------------|
| 263 bits(142) | 2e-68 | 155/161(96%) | 1/161(0%) | Plus/Minus |

Features: [\[Pyruvate dehydrogenase \[lipoamide\]\] kinase isozyme 3, mi...](#)

Figura 16. Integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* em retrotransposon inserido em gene de *Gallus gallus*. A sequência do clone EG302 representa uma integração do kDNA (azul escuro: região conservada; azul claro: região variável) no locus NW_001471534.2 do cromossomo 1 (verde), que corresponde a região da piruvato dehidrogenase quinase. Esta mesma região foi reconhecida como elemento CR1 (sublinhado vermelho). Em amarelo tem-se a região de microhomologia, e os primers da reação estão sublinhados. O resultado das análises do BLASTn e do Giri estão indicados abaixo da sequência.

2.1) Integrações de kDNA no mesmo locus genético

A análise da transmissão vertical da mutação requer o estudo das sequências integradas num locus repetido em parentais e progênes. As sequências analisadas exibiram diversas mutações no mesmo locus em diferentes aves, com (Figura 17 e 18) ou sem parentesco (Figura 19). Foi interessante observar que, na maioria dos casos, a integração no mesmo sítio do genoma da galinha tinha sequências de kDNA diferentes entre si (Figura 17, 18, 19 e 20).

a) **SEQ EG108:** 687 bp;

67R

```

1    GAACGCCCTT CCCAAAACCA TAATGTACGG GTGAGATGCA TGAATTTTCG GCCATAAATT
61   TGAACGCCCTT TCCAAAACCC AGGAAGAAGT TAAATCTCTG AATAGACCAA TAACAGGCTC
121  TGATACACAT ACACCAAACCC CAATCGAACC AAACCGAATT AAAGAAACAA ACACAAATGA
181  AACCTTCTC GAACAACAAA CCAGTACATT CAAAACAAA AAAAAACCC ACTCAAACAA
241  ACAACAGCAA CAAATCCAAC TCCAAAACCA CAAAAACGAT TAAAAATAAA AATAAAAATA
301  AAAAAAAG AAAGAAAGAA AAAGAAAAG AAAAAAGAAA AGAAGAAGAA AAAGGACTCC
361  GAATGGTGT GGGGTGACCC CAGGCCAAGG GAGATGTGCA GTGCGGCCGC TGCTCCGTGC
421  ACAGCACAGG GTTGGCCGCT GCCGCACCCA GCTTAGCCCT TGCGGCTCCT GTAGCGGGGC
481  TGCTGGCACA CGCCCCGGT CTGTTACTGT AGACGCAGGC CCGTAAATCT CGGCCGAAGC
541  AATATTTCTA TCCCATCATC AGACATGCAA AGGGGAAAG TAATACATTT GATCTCCGC
601  TGCAAAGACG GGAGAGAGAG ATTGTAGGCT CCAGGGCTCT TTTAAACATT TCAGGAATTA
661  ATGGGGGATG GGAAGGGAGG AAGTGAG
    
```

C31 antisense 2

Gallus gallus breed Red Jungle fowl, inbred line UCD001 chromosome 5 genomic scaffold, Gallus_gallus-4.0, Sequence ID: [ref|NW_003763785.1](#) Length: 4132641 Number of Matches: 1

Range 1: 27022674 to 27023227 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--------|--------------|-----------|-----------|
| 957 bits(1060) | 0.0 | 547/555(99%) | 6/555(1%) | Plus/Plus |

Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 1434_85, clone 212E Sequence ID: [emb|FM207251.1](#) Length: 924 Number of Matches: 7

Range 1: 324 to 466 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--------------|-----------|-----------|
| 194 bits(214) | 1e-45 | 131/146(90%) | 8/146(5%) | Plus/Plus |

b) **SEQ EG244:** 671 bp;

67rev

```

1    GAACCCCTT CCCAAAACCA GGAAGAAGTT GAGTCTCTGA ATAGACCAAT AACAGGCTNT
61   GATACACATA CACTCTCCCA AGACTAAACC AGGAGGAAGT TTGATCTCTG AATACACCAA
121  CCCCAATCGA ACCAAACCGA ATTAAGAAA CAAACACAAA TGA AACCCCTT CTCGAACAAC
181  AAACCAGTAC ATTCCAAAAC AAAACAAAAA CCCACTCAA CAAACAACAG CAACAAATCC
241  AACTCCAAA CCACAAAAC GATTAATAAT AAAAAATAAA ATAAAAAAA AAAGAAAGAA
301  AGAAAAAGAA AAAGAAAAG AAAAGGAAGA AGAAAAAGGA CTCCGAATTG GTGTGGGGTG
361  ACCCCAGGCC AAGGGAGATG TGCAGTGCGG CCGCTGCTCC GTGCACAGCA CAGGGTTTGC
421  CGCTGCCGCA CCCAGCTTAG CCCCTGCGGC TCCTGTAGCG GGGCTGCTGG CACACGCCCC
481  CGGTCTGTTA CTGTAGACGC AGGCCGTAA ATCTCGGCCG AAGCAATATT TCTATCCCAT
541  CATCAGACAT GCAAAGGGGG AAAGTAATAC ATTTGATCTT CCGCTGCAA GACGGGAGAG
601  AGAGATTGTA GGCTCCAGG CTCTTTTAAA CATTTCAGGA ATTAATGGGG GATGGGAAGG
661  GAGGAAGTGA G
    
```

C31 antisense2

Gallus gallus breed Red Jungle fowl, inbred line UCD001 chromosome 5 genomic scaffold, Gallus_gallus-4.0 Sequence ID: [ref|NW_003763785.1](#) Length: 4132641 Number of Matches: 1

Range 1: 27022674 to 27023227 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--------|--------------|-----------|-----------|
| 957 bits(1060) | 0.0 | 547/555(99%) | 5/555(0%) | Plus/Plus |

Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 1437_75, clone 39E Sequence ID: [emb|FM207233.1](#) Length: 948 Number of Matches: 11

Range 1: 725 to 862 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--------------|-----------|-----------|
| 205 bits(226) | 6e-49 | 128/138(93%) | 5/138(3%) | Plus/Plus |

Figura 17. Integração de minicirculo de kDNA de *T. cruzi* no mesmo locus do genoma de *Gallus gallus*. a) A sequência do clone EG108 mostra uma integração de kDNA (azul escuro: região conservada; azul claro: região variável) no locus NW_003763785.1 do cromossomo 5 (verde). Esta sequência oriunda do galo k1-8378 (Figura 17a) tem o mesmo fragmento de DNA da progênie k1-686 (Figura 17b). A região de microhomologia aparece em amarelo, e os primers estão sublinhados. Os resultados da análise do BLASTn está indicado abaixo das sequências.

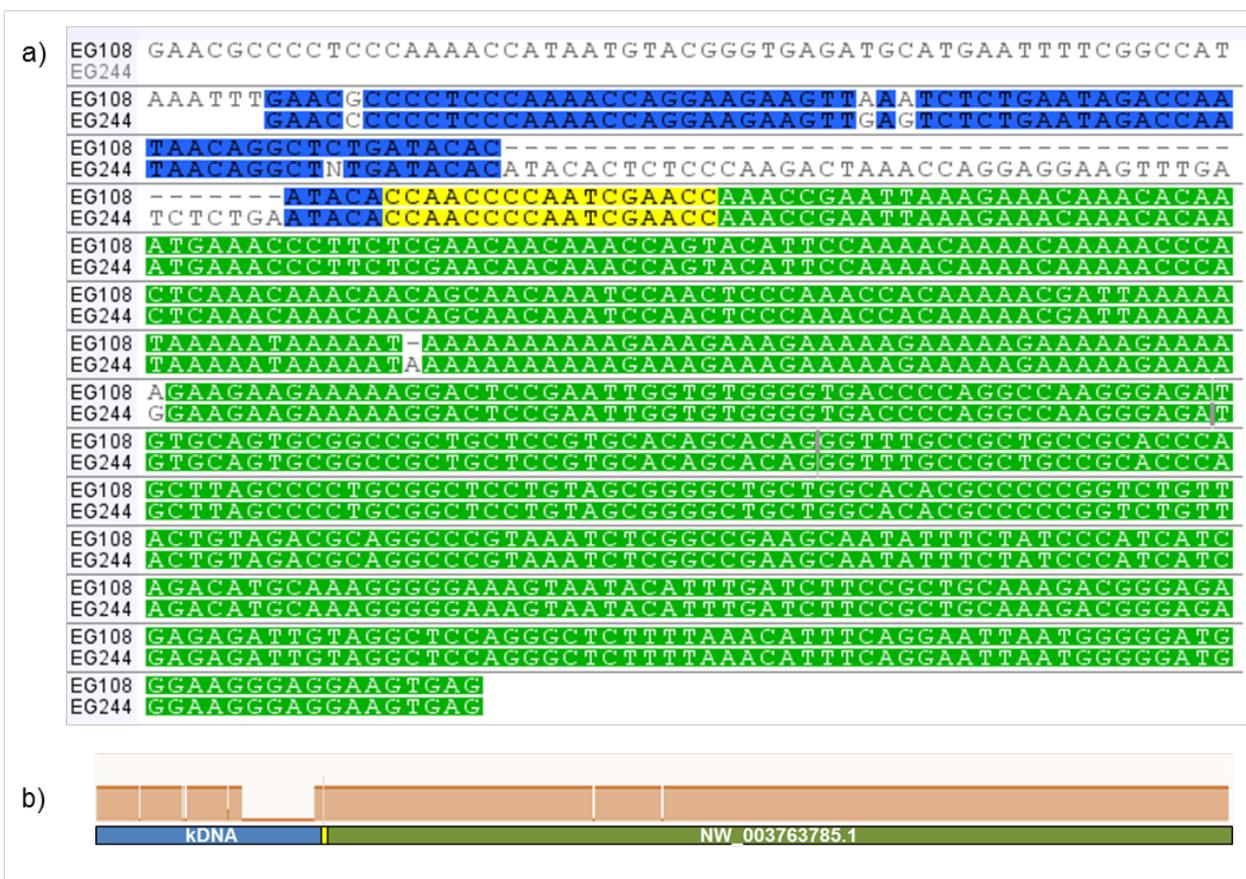


Figura 18. Alinhamento de duas sequências com integração no mesmo *locus*. a) Alinhamento das sequências mostradas na Figura 17. Verde: região do cromossomo da galinha; azul: kDNA, cujas regiões sem complementaridade estão não-coloridas. Em amarelo está a microhomologia intermediando a quimera. Note que múltiplas regiões de microhomologias ricas em CA aparecem no kDNA (azul) e na sequência da galinha (verde). b) Gráfico da similaridade do alinhamento mostrado em (a). Note que a região do *locus* é praticamente igual, mas o kDNA é diferente.

A demonstração de microhomologias nas sequências de kDNA e no DNA hospedeiro da quimera ilustrada na Figura 18 sugere que as microhomologias do genoma hospedeiro são *hotspot* potenciais de integração de DNA exógeno. Tais achados explicam a presença de integrações no mesmo *locus* em aves de famílias diferentes. As diferenças na sequência de kDNA identificadas nas progênes F1, F2 e F3 podem ser explicadas tentativamente por recombinação e remodelamento do kDNA, ou ainda, pela imensa diversidade genética dos minicírculos.

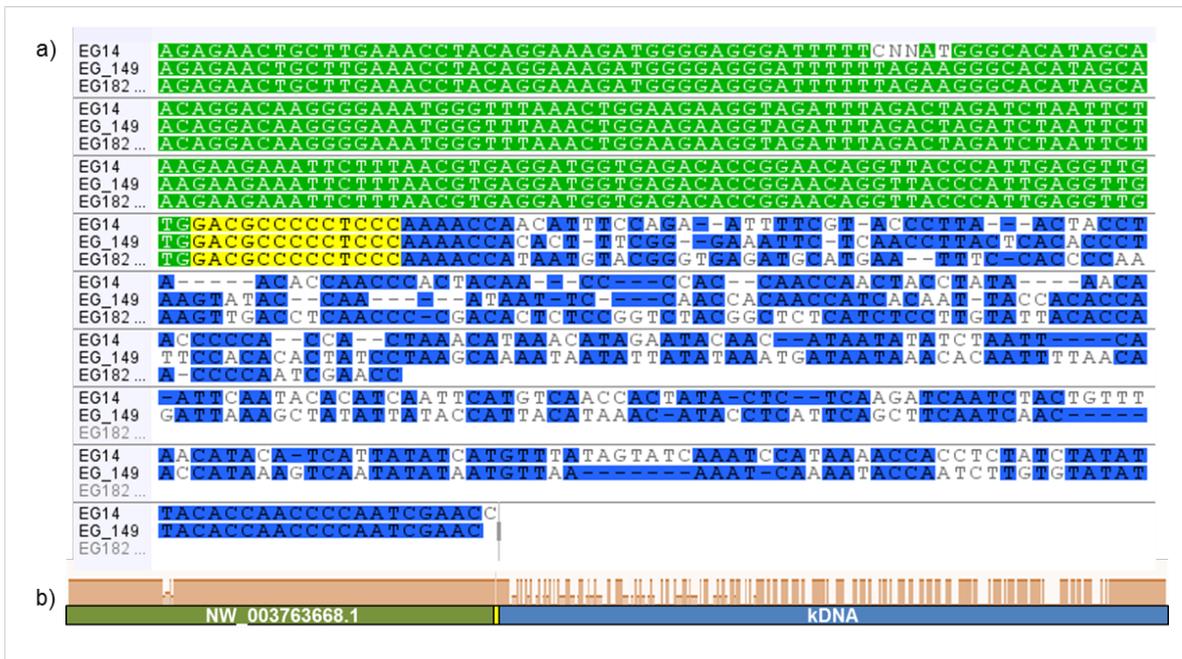


Figura 19. Alinhamento de seqüências de aves diferentes com integração no mesmo *locus*. a) Alinhamento das seqüências com integração de kDNA do *locus* NW_003763668.1 cujos alelos codificam a proteína PTHB1. Os clones EG14 da ave k1- 527 (Família 1), EG149 da ave k1-654 (Família 2), e EG182 da ave k1-759 (Família 2) estão ilustrados: verde, gene; azul, kDNA; amarelo, região de microhomologia. b) Gráfico do alinhamento mostrando similaridade das seqüências dos clone indicados em “a”. Note na quimera que apenas as concordâncias entre as seqüências estão em destaque e que a seqüência do *locus* é praticamente igual, mas o kDNA é diferente.

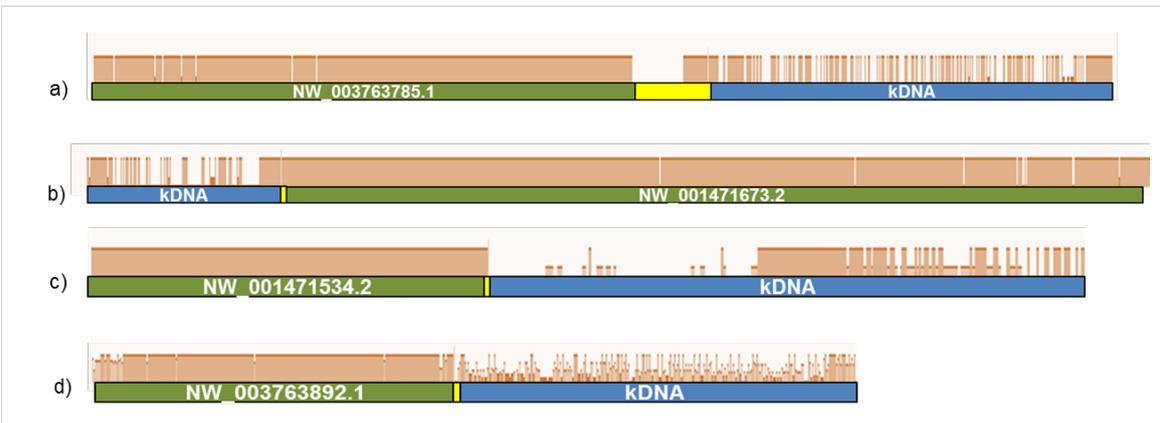


Figura 20. Alinhamento e similaridade de seqüências com integração no mesmo *locus* de aves diferentes. Em verde, genoma de *Gallus gallus*. Em azul, minicírculo de kDNA. Em amarelo, microhomologia. A similaridade está indicada na cor laranja. a) Alinhamento de seqüências com integração de kDNA do *locus* NW_003763785.1 do fator de transcrição SOX-6. As seqüências são oriundas das aves k1- 527 (Família 1) e k1-618 (Família 2). b) Alinhamento de seqüências com kDNA integrado no *locus* NW_001471673.2 das aves k1- 652 (Família 1) e k1-618 (Família 2). c) Alinhamento de seqüências com kDNA integrado no *locus* NW_001471534.2 da piruvato desidrogenase quinase das aves k1-652 (Família 1), k1- 672 (Família 2) e k1-880 (Família 3). d) Alinhamento de seqüências com kDNA integrado no *locus* NW_003763892.1 (indeterminado) das aves k1-616 (Família 1), k1- 844 (Família 2), k1- 661 (Família 2), k1- 633 (Família 2), k1-669 (Família 2) e k1-880 (Família 3). Note que não há homologia nas regiões variáveis da seqüência de kDNA.

O sítio de inserção mais recorrente nas sequências deste trabalho foi o da enzima málica NADP dependente (*locus* NW_003763650.1). O mapeamento das integrações feitas com a técnica *tp*TAIL-PCR resultou em 15 diferentes sequências quimeras naquele *locus* em 10 aves das três famílias. Em todos esses casos, a inserção de kDNA ocorreu no nucleotídeo 90092 do *locus* NW_003763650.1. A maior frequência de integração de minicírculos de kDNA neste *locus* levou a análises aprofundadas deste sítio das quimeras. Essas análises seguem no item 3 desta seção.

2.2) Homologias em sequências de kDNA integradas no genoma

As análises BLASTn das sequências quimeras obtidas pela *tp*TAIL-PCR mostram que muitos eventos de integração ocorreram em um mesmo *locus*. Interessantemente, foi observado que diferentes sequências de minicírculos estavam integradas naqueles *loci*. Este achado teria como explicação a inserção de minicírculos diferentes em um sítio específico do genoma das aves. Assim, procuramos encontrar o fenômeno oposto, ou seja, uma mesma sequência de minicírculo de kDNA em diferentes *loci* do genoma. A busca foi feita mediante alinhamento das regiões variáveis de minicírculos integrados. O alinhamento revelou que sequências de regiões variáveis de minicírculos de kDNA eram iguais entre si, na mesma ave ou em outras aves da mesma família. As Figuras 21 e 22 mostram sequências com cerca de 285 pb, nas quais a região variável é quase idêntica. As homologias dessas sequências no banco de dados tiveram *E-value* de $1e^{-128}$ e identidade de 96%.

Nos alinhamentos das Figuras 21 e 22 verifica-se que, em três das cinco sequências, a integração de kDNA ocorreu numa região de retroelemento não-LTR CR1; e na sequência do gene EG13 foi encontrada um pequeno fragmento de 59 pb próximo de CR1 (Figura 21). Esta configuração talvez seja decorrente de mobilização a partir de um sítio primário de integração.

a) **SEQ EG13**: 756 bp;

C31 sense 1

```

1      AGAGAACTGC TTGAAACCTA CAGGTGTACT TTATCAACCT TTTTTTATAG AAGTTCATA
61     TTAAGGAAAT CTGATTTAAG TGTGAGATGT AAATGAACAT ATAGTGCTAT ACTGCTATGT
121    TGATCTATG GATACTGAGG AATCTGGGGA AGGTATATAG GAAAGGGCAA GTAATATTTT
181    CTCAGTGTAC TCTTCCACTT TCCTATGATC CCATGATAAT GGGCTTCCTG ATTCAGAGGT
241    GGTACATTTG GGTTTAATGG CCATTGATAG AAATATCATC TATAAATACA TCCAATCACT
301    CTTGAACCTT TTAATTGACA GCTGGAAAGT ATATGGGGAT AAGTTCAGCA GTTAGCAATA
361    TTCTGTATAT AACAGTATCT CCTTCTCCTT TATATTTAAA CCTTGTAGGT ATCCCATAGA
421    TCTTGTATTA TAATGTACGG GTGAGATGCA TGAATTTTCC GCCAAAAAGT TGAACGCCCC
481    TCCCGAAACC AACATTTCCA GAATTTTCGT ACCCTTAACT ACCTAACACC AACCCACTAC
541    AACCCACCCA ACCAACTACC TATAACAAC CCCCACCCT AAACATAAAC ATAGAATACA
601    ACATAATATA TCTAATTCAA TTCAATACAC ATCAATTCAT GTCAACCCT ATACTCTCAA
661    GATCAATCTA CTGTTTACA TACATATTA TATCATGTTT ATAGTATCAA ATCCATAAAC
721    CCCCCTATC TATATTACAC CAACCCCAAT CGAACC

```

S 36

b) **SEQ EG14**: 471 bp;

C31 sense1

```

1      AGAGAACTGC TTGAAACCTA CAGGAAAGAT GGGGAGGGAT TTTTCNNATG GGCACATAGC
61     AACAGGACAA GGGGAAATGG GTTTAAACTG GAAGAAGGTA GATTTAGACT AGATCTAATT
121    CTAAGAAGAA ATTCTTTAAC GTGAGGATGG TGAGACACCG GAACAGGTTA CCATTGAGG
181    TTGTGGACGC CCCCTCCCA AACCAACATT TCCAGAATTT TCGTACCCTT AACTACCTAA
241    CACCAACCCA CTACAACCCC ACCAACCAAC TACCTATAAA CAACCCCCAC CACTAACCAT
301    AACATAGAA TACAACATA TATATCTAAT TCAATTCAT ACACATCAAT TCATGTCAAC
361    CACTATACTC TCAAGATCAA TCTACTGTTT AACATACATC ATTATATCAT GTTTATAGTA
421    TCAAATCCAT AAAACCACCT CTATCTATAT TACACCAACC CCAATCGAAC C

```

S 36

c) **SEQ EG16**: 474 bp;

C31 sense 1

```

1      AGAGAACTGC TTGAAACCTA CAGGAAAGAT GGGGAGGGAT TTTTTATAAG GGTATGTAGT
61     GTCAGGACAA GGGGAAATGG TTTTAAATG GATGTAGATT TAGGGTAGAT TTAGACTAGA
121    TATTAGGAAG AAATCTGTGA CTGTGAGGTT GGTGAGACAC TGGGACAGGT TGCCACAGAG
181    GGTGTGTGAC GCCCCCTCCC AAAACCAACA TTTCCAGAA TTTTCGTACC TTAACCTACCT
241    AACACCAACC CACTACAACC CCACCAACCA ACTACCTATA AACACCCCC ACCACTAAC
301    ATAAACATAG AATACAACAT AATATATCTA ATTCAATTCA ATACACATCA ATTCATGTCA
361    ACCACTATAC TCTCAAGATC AATCTACTGT TTAACATACA TCATTATATC ATGTTTATAG
421    TATCAAATCC ATAAAACCAC CTCTATCTAT ATTACACCAA CCCCATCGA AAC

```

S 36

d) **SEQ EG68**: 403 bp;

C31 antisense 3

```

1      TGCTCTCTAC CAGCTCCTTG GCTNNNNNN TGCTTTTGGG AATGCTTTTA TTGAATAATC
61     ACTGTTTCACT TCCTGGAGTC ACAACAATT ACAAAATATG TCCATTCCCC ATTTCTGAA
121    CCCCCCTCCC AAAACCGACA TTCCAGAA TTTTCGTACC TTAACCTACCT AACACCAACC
181    CACTACAACC CCACCAACCA ACTACCTATA AACACCCCC ACCACTAAC ATAAACATAG
241    AATACAACAT AATATATCTA ATTCAATTCA ATACACATCA ATTCATGTCA ACCACTATAC
301    TCTCAAGATC AATCTACTGT TTAACATACA TCATTATATC ATGTTTATAG TATCAAATCC
361    ATAAAACCAC CTCTATCTAT ATTACACCAA CCCCATCGA ACC

```

S36

e) **SEQ EG70**: 436 bp;

C31 antisense 3

```

1      TGNTCTNNTN CCCAGCTTGG GCAACCTGTT CCAGTACCTC ACCNNNNNTN NNGAGAAGAA
61     ATTTTTCCTA ATATCCAACC TGAACCTCCC CTGGCACAACT TTGAGGCCAT TCCCTCTAGT
121    TCTTTTGCTA GCTACACAGG AGAAGAGGCT GACCCCCCTT CCCAAAACCA ACATTTCCAG
181    AATTTTCGTA CCCTTAACTA CCTAACACCA ACCCACTACA ACCCCACCAA CCAACTACCT
241    ATAAACAACC CCCACCACTA AACATAAACA TAGAATACAA CATAATATAT CTAATTCAT
301    TCAATACACA TCAATTCATG TCAACCCTA TACTCTCAAG ATCAATCTAC TGTTTAACAT
361    ACATCATTAC ATCATGTTTA TAGTATCAAA TCCATAAAAC CACCTCTATC TATATTACAC
421    CAACCCCAAT CGAACC

```

S36

Figura 21. Eventos de integração de minicírculo de kDNA com a mesma região variável em diferentes *loci* de *Gallus gallus*. **a)** Integração de kDNA (azul escuro: região conservada; azul claro: região variável) no *locus* NW_003763785.1 do fator de transcrição SOX-6 no cromossomo 5 (verde). **b)** Integração de kDNA no *locus* NW_003763668.1 do gene codificador da proteína PTHB1 no cromossomo 2. **c)** Integração de kDNA no *locus* NW_001471668.2 do gene da palmitoiltransferase no cromossomo 3. **d)** Integração de kDNA no *locus* NW_003763912.1 indeterminado, no cromossomo 13. **e)** Integração de kDNA no *locus* BX640540.3. A região de microhomologia (amarela) e os *primers* utilizados na reação estão sublinhados. As sequências dos retroelementos CR1 estão sublinhadas em vermelho. Sequências **a**, **b** e **c** do F0 k1-527, **d** e **e** da ave F2 k1-638 (ver Figura 10).

locus do genoma de gameta e célula somática da ave, porém com sequências de minicírculos de kDNA diferentes (Figura 23). Também foram registrados 3 casos de integrações em células somáticas e germinativas com a mesma sequência de kDNA, mas em *loci* diferentes (Figura 24). A diversidade do fenômeno foi observada nas três famílias estudadas.



Figura 23. Alinhamento de sequências quimeras de célula germinativa e de célula somática quimeras, exibindo kDNA no mesmo *locus*. a) Alinhamento da sequência derivada de esperma (EG13) e de sangue (MG513) da ave k1-527 (Família 1). As sequências mostram uma integração de kDNA no *locus* NW_003763785.1, correspondente ao fator de transcrição SOX-6. b) Alinhamento da sequência EG16 (esperma) da ave k1-527 (F0) e MG66 (sangue) da ave F1 k1-202. Estas sequências mostram a integração de kDNA no *locus* NW_001471668.2 do gene da palmitoiltranserase ZDHHC14. Em verde, região do cromossomo da galinha; azul: kDNA; amarelo: microhomologia. Apenas as homologias das sequências estão coloridas. Note que a sequência do *locus* é praticamente idêntica, mas o kDNA é diferente.

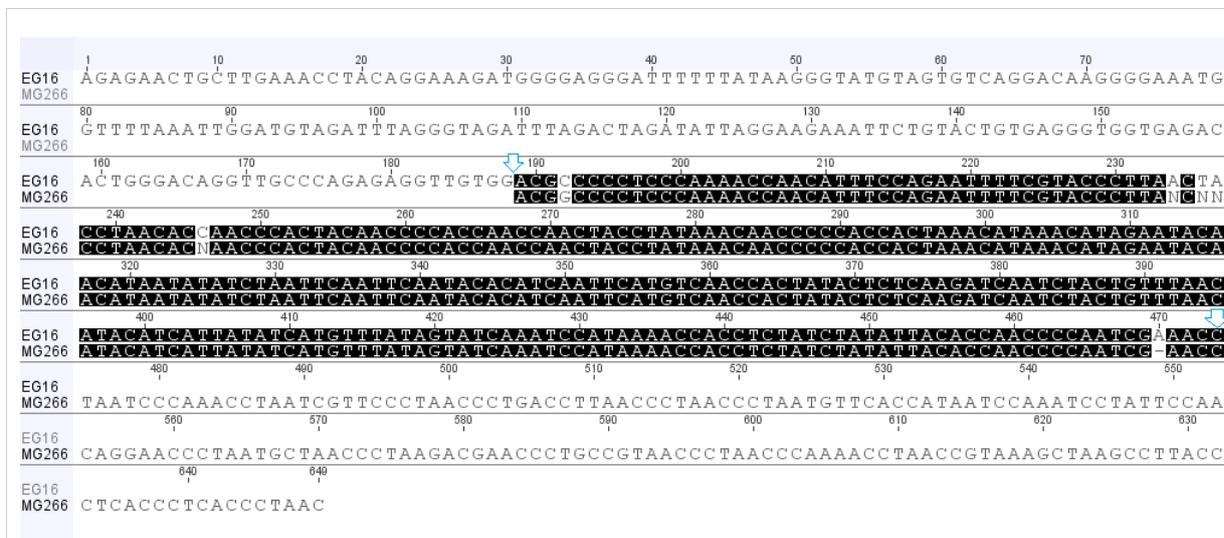


Figura 24. Resultado de alinhamento de seqüências de célula germinativa e somática com integração de minicírculo de kDNA com a mesma seqüência. As seqüências EG16 e MG266 da ave k1-527 mostram integrações em *locus* diferentes e com seqüência de kDNA praticamente igual. A região correspondente ao kDNA começa e termina nos nucleotídeos indicados pelas setas.

De interesse, as seqüências flangeadoras do hospedeiro e do minicírculo de quimera também revelou integração do kDNA no mesmo *locus* (NW_001471668.2) de genoma dipóide de galinha F2 (k1-645) e no DNA do ovócito da F3 (k1-765). Nestes casos, as seqüências de minicírculos também eram diferentes.

3) Análises das integrações no *locus* da enzima málica mitocondrial NADP dependente.

A frequência de eventos de integração no *locus* NW_003763650.1 foi a mais alta do estudo (10,87%). Este *locus* tem os alelos que codificam a enzima málica mitocondrial NADP dependente, que catalisa a descarboxilação oxidativa do malato, gerando piruvato e CO₂, com redução de NADP⁺ para NADPH, na presença de um cátion bivalente (Mg²⁺ ou Mn²⁺). Conforme a especificidade do cofator e localização subcelular, são reconhecidas três isoformas de enzimas málicas: *i*) citosólica NADP⁺ dependente (c-NADP-ME ou ME1); *ii*) mitocondrial NAD(P)⁺ dependente (m-NAD-ME ou ME2); e, *iii*) mitocondrial NADP⁺ dependente (m-NADP-ME ou ME3) (Hsieh e cols, 2009).

A integração de minicírculos de kDNA ocorreu no *locus* NW_003763650.1 da enzima málica NADP-dependente mitocondrial ME3. O gene da ME3 da galinha (Gene ID: 419019, NCBI) é conservado em humanos, chimpanzés, cães, camundongos, e outros. O gene cópia única está localizado no cromossomo 1. As análises do BLASTn indicaram que a integração do kDNA entrou na região de um íntron. A identificação da mutação no *locus* NW_003763650.1 em várias aves foi possível com a técnica *tp*TAIL-PCR, devido a combinação de *primers* de kDNA, com *primers* específicos para sequência do gene ME3 do banco de dados NCBI. As amplificações produziram 15 sequências com minicírculos integrados no gene da enzima málica, em oito aves da Família 1. As sequências estão apresentadas no Anexo II.

A PCR direta conduzida em DNA de ave negativa (sem contato com *T. cruzi*) com os *primers* específicos do gene revelou amplicons de até 1,7 kb. Quando essas sequências obtidas foram alinhadas, verificou-se identidade quase completa com aquela do *locus* NW_003763650.1 (Figura 25) e com as quimeras neste sítio de integração. Entretanto, a análise por PCR feita em amostra de DNA de aves da Família 1 com *primers* S1 e aS1 específicos para NADPME não produziu sequência quimera.

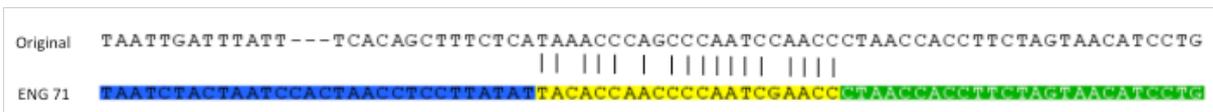


Figura 26. Região de microhomologia antes e depois da integração no *locus* NW_003763650.1. A linha de cima corresponde à sequência do controle negativo da Figura 25. A linha de baixo corresponde à região próxima à microhomologia do clone ENG 71 da ave k1-636. Azul, kDNA; verde, genoma da galinha; amarelo, microhomologia.

A *tp*TAIL-PCR conduzida com *primers* específicos para NADPME mostrou que as integrações ocorreram sempre na mesma posição (base 90092) no mesmo nucleotídeo. A análise *in silico* da estrutura da sequência original revelou que a inserção do kDNA ocorreu numa região de alça do DNA. O gráfico obtido com ajuda do programa Bend-it revela os pontos onde se formam as curvaturas (Figura 27). O alinhamento das sequências confirmou a diversidade dos minicírculos de kDNA integrado, na ave parental e nas progênie (Figura 28).

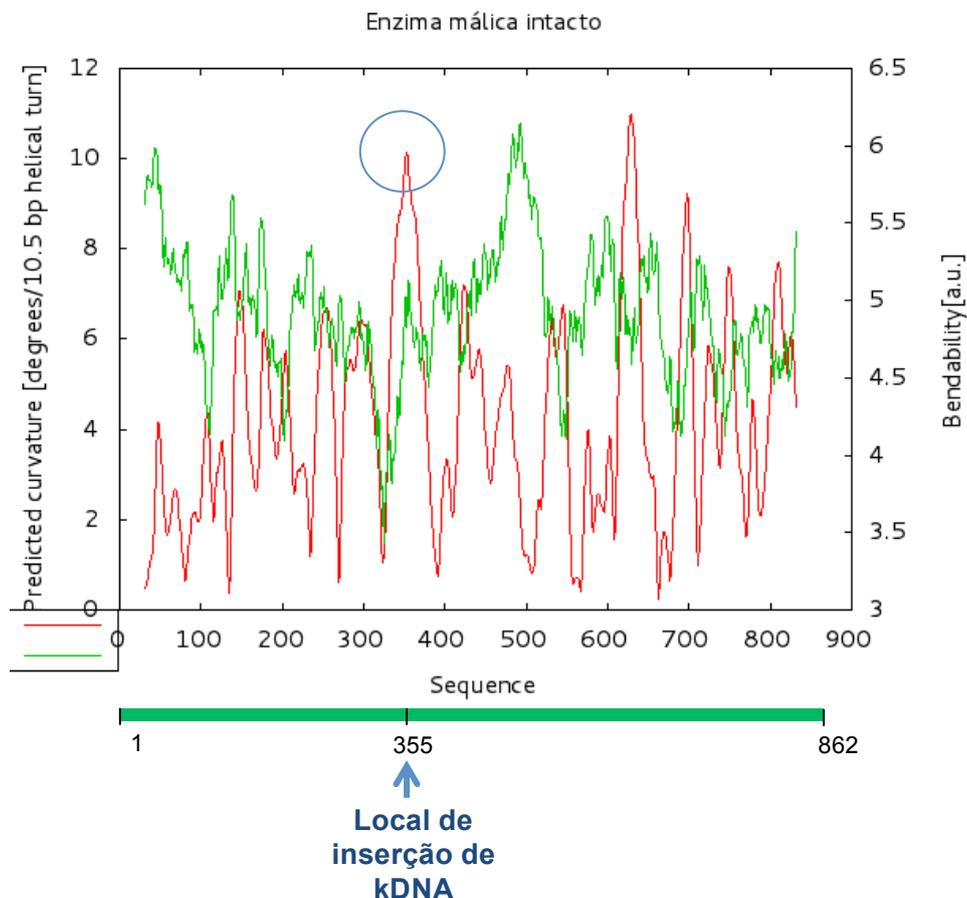


Figura 27. Representação gráfica das tensões que geram curvaturas (linha vermelha) e capacidade de se dobrar (linha verde) na região original do sítio da enzima málica mitocondrial (representada abaixo do gráfico). Note que a inserção do kDNA (correspondente ao nucleotídeo 90092 do banco de Dados) se deu no ponto com uma alta curvatura (destaque em azul).

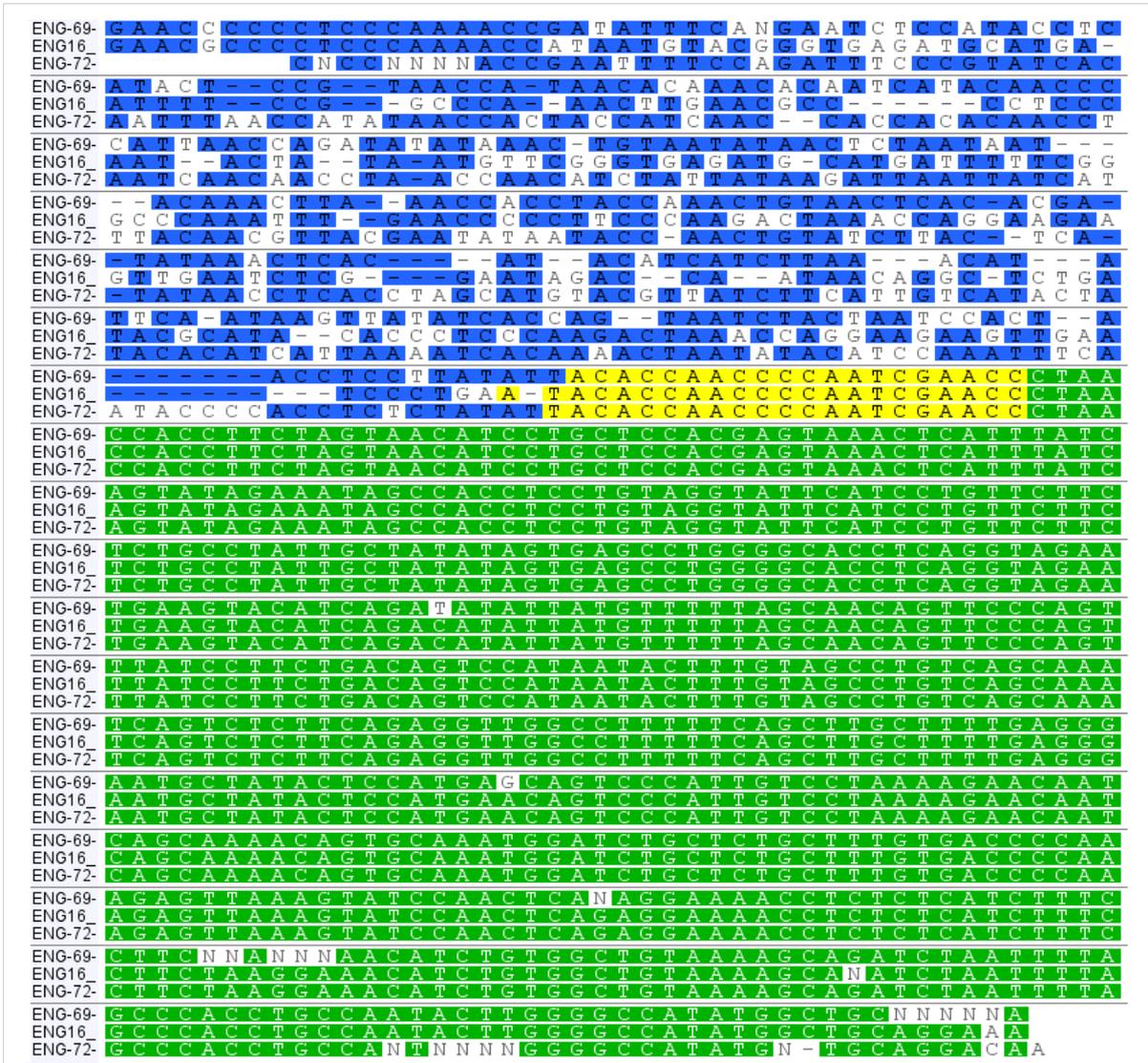


Figura 28. Diferenças entre as sequências de kDNA integradas no gene da enzima málica em aves da mesma família. Alinhamento de três sequências pertencentes ao galo k1-202 (ENG69), à galinha k1-224 (ENG16) e à sua cria k1-616 (ENG72). Note que a integração ocorreu no mesmo local do gene (verde), mas a região do kDNA é diferente nas três aves (azul). Em amarelo tem-se a região de microhomologia. Apenas as concordâncias entre as sequências estão em destaque.

Ainda que houvesse grande diversidade de sequências de minicírculos integradas no genoma de aves, foi possível detectar minicírculos idênticos na F1 k1-207 e na sua progênie k1-603 integrados na mesma base da sequência do gene da enzima málica. Neste caso, a sequência paterna era 110 pb mais longa que a da progênie, mas parte da região variável do parental apresentava homologia de 180 pb com a da progênie (Figura 29). Essas sequências de kDNA foram reconhecidas no banco de dados com *E-value* de $6e^{-73}$, 95% de identidade. Com este achado, foi possível detectar a herança da mutação da ave F1 pela progênie F2.



Figura 29. Herança de kDNA integrado no gene da enzima málica. Alinhamento da sequência da ave k1-207 (ENG11) e de sua descendência (ENG18). Note que a integração ocorreu no mesmo local do gene (verde), e que a região do kDNA é igual entre as aves (azul). Em amarelo, tem-se a região de microhomologia. Na Figura, apenas as concordâncias entre as sequências estão em destaque.

Eventos de recombinação do kDNA foram encontrados nas sequências das aves k1-527 (F0), k1-202 (F1) e k1-636 (F2), conforme ilustrado na Figura 30. Esta figura sugere que a mutação de kDNA na ave k1-202 (F1) teria sido herdada da ave parental F0 k1-527 (aproximadamente 260 pb, incluindo região variável) e que a região variável teria sido parcialmente deletada (Figura 31). Em outro caso, a progênie (F2) k1-636 teria herdado a sequência variável do minicírculo de kDNA de seu progenitor (k1-202), mas na ave da geração F2 a região variável da sequência aparece duplicada. Não é possível afirmar se a duplicação ocorreu nas células do progenitor ou da progênie. A região de kDNA foi reconhecida no banco de dados e possuía *E-value* igual a 0.0 e identidade de 96%.

ENG 66: 963 bp

ORIGIN

67rev

```

1      GNCCCCNNNN CCCAAAACCA ATATTTTCAGG AATCTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAAC CAAATATATA AACTGTAATA TAACTCTAAT
121    TATACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AGTAATCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAAATCGA ACCCCACCTC CCGTAAACAC ACCCCATTTT CGGGCAATAA
301    ATGTACGGGT GAGATGCATG ATTTTTCGAG CCCAAATTG AACCNCNTTC CCAAGACTAA
361    ACCAGGAAGA AGTTGAATCT CGGAATAGAC CAATAACAGG CTCTGATACG CATAACCCCT
421    CCCAAGACTA AACCAGGAAG AAGTTGAATC CCTGAATACA CCAACCCCAA TCGAACCTTA
481    ACCACCTTCT AGTAACATCC TGCTCCACGA GTAAACTCAT TTATCAGTAT AGAAATAGCC
541    ACCTCCTGTA GGTATTTCATC CTGTTCTTCT CTGCCTATTG CTATATAGTG AGCCTGGGGC
601    ACCTCAGGTA GAATGAAGTA CATCAGACAT ATTCTGTTTT TAGCAACAGT TCCCAGTTTA
661    TCCTTCTGAC AGTCCATAAT ACTTTGTAGC CTGTCAGCAA ATCAGTCTCT TCAGAGGTTG
721    GCCTTTTTCA GCTTGTCTTT GAGGGAATGC TATACTCCAT GAACAGTCCC ATTGTCTTAA
781    AAGAACAATC AGCAAAACAG TGCAAATGGA TCTGCTCTGC TTTGTGACCC CAAAGAGTTA
841    AAGTATCCAA CTCAGAGGAA AACCTCTCTC ATCTTCTCTT CTAAGGAAAC ATCTGTGGCT
901    GTAAAAGCAG ATCTAATTTT AGCCCCACCTG CCAATANNNG GGGCCATATG TGTGCAGGAC
961    AAA NADPME as2

```

ENG 69: 747 bp

ORIGIN

67rev

```

1      GAACCCCCCT CCCAAAACCG ATATTTTCAGG AATCTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAAC CAGATATATA AACTGTAATA TAACTCTAAT
121    AATACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AGTAATCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAAATCGA ACCCTAACCA CCTTCTAGTA ACATCCTGCT CCACGAGTAA
301    ACTCATTTAT CAGTATAGAA ATAGCCACCT CCTGTAGGTA TTCATCCTGT TCTTCTCTGC
361    CTATTGCTAT ATAGTGAGCC TGGGGCACCT CAGGTAGAAAT GAAGTACATC AGATATATTA
421    TGTTTTTAGC AACAGTTCCT AGTTTATCCT TCTGACAGTC CATAATACTT TGTAGCCTGT
481    CAGCAATCA GTCTCTTCAG AGGTTGGCCT TTTTCAGCTT GCTTTTGGAG GAATGCATA
541    CTCATGAGC AGTCCCATTG TCCTAAAAGA ACAATCAGCA AAACAGTGCA AATGGATCTG
601    CTCTGCTTTG TGACCCCAA GAGTTAAAGT ATCCAACCTA NAGGAAAACC TCTCTCATCT
661    TTCTTCNNA NNNAACATCT GTGGCTGTAA AAGCAGATCT AATTTTAGCC CACCTGCCAA
721    TACTTGGGGC CATATGGCTG CNNNNNA
NADPME as2

```

ENG 71: 1086 bp

ORIGIN

67rev

```

1      GAACCCCCCT CCCAAAACCA ATATTTTCAGG AATCTCCATA CCTCATACTC CGTAACCATA
61     ACACAAACAC AATCATACAA CCCCATTAAAC CAGATATATA AACTGTAATA TAACTCTAAT
121    TATACAAACT TAAACCACCT ACCAAACTGT AACTCACACG ATATAAACTC ACATACATCA
181    TCTTAAACAT ATTCAATAAG TTATATCACC AGTAATCTAC TAATCCACTA ACCTCCTTAT
241    ATTACACCAA CCCCAAATCGA ACCCCACCTC CCGTAAACACA CCCCATTTTC GGGCATATAA
301    TGACGGGTG AGATGCATGA TTTTTCGGGC CCAAATTTGA ACCCCCTCC CAAAACCAAT
361    ATTTACAGAA TCTCCATACC TCATACTCCG TAACCATAAC ACAAACACAA TCATACAACC
421    CCATTAACCA GATATATAAA CTGTAATATA ACTCTAATTA TACAAACTTA AACCCCTAC
481    CAAACTGTAA CTCACACGAT ATAAACTCAC ATACATCATC TTAACATAT CCAATAAGTT
541    ATATCACCAG TAATCTACTA ATCCACTAAC CTCCTTATAT TACACCAACC CCAATCGAAC
601    CCTAACCAACC TTCTAGTAAC ATCCTGCTCC ACGAGTAAAC TCATTATCA GTATAGAAAT
661    AGCCACCTCC TGTAGGTATT CATCCTGTTT TTCTCTGCCT ATTGCTATAT AGTGAGCCTG
721    GGGCACCTCA GGTAGAATGA AGTACATCAG ACATATTATG TTTTTAGCAA CAGTCCCAG
781    TTTATCCTTC TGACAGTCCA TAATACTTTG TAGCCTGTCA GCAAATCAGT CTCTTCAGAG
841    GTTGGCCTTT TTCAGCTTGC TTTTGGAGGA ATGCTATACT CCATGAACAG TCCCATTGTC
901    CTAAGAAGAC AATCAGCAA ACAGTGCAA TGGGCTGCT CTGCTTTGTG ACCCCAAAGA
961    GTTAAAGTAT CCAACTCAGA GGAAAACCTC TCTCATCTT CTTCTAAGG AAACATCTGT
1021  GGCTGTAAAA GCAGATCTAA TTTTAGCCCA CCTGCCAATA CTTGGGGCCA TATGGCTGCA
1081  GGACAA NADPME as2

```

Figura 30. Recombinação do kDNA integrado entre diferentes gerações. A Figura mostra as sequências das aves k1-527(F0), k1-202 (F1) e k1-636(F2), respectivamente. A integração ocorreu no mesmo ponto do *locus* NW_003763650.1 da enzima málica. Na sequência ENG69 (k1-202), parte da região variável foi herdada da ave k1-527 (ENG66), o restante da sequência de kDNA do parental aparentemente foi deletado na progênie (ver Figura 31) .A sequência ENG71 (k1-636, F2) mostra a mesma região variável da ave F1 k1-202 (ENG69), porém aparece duplicada. Azul escuro: região conservada; azul claro: região variável; gene: verde; amarelo: microhomologia; sublinhado: *primers*.

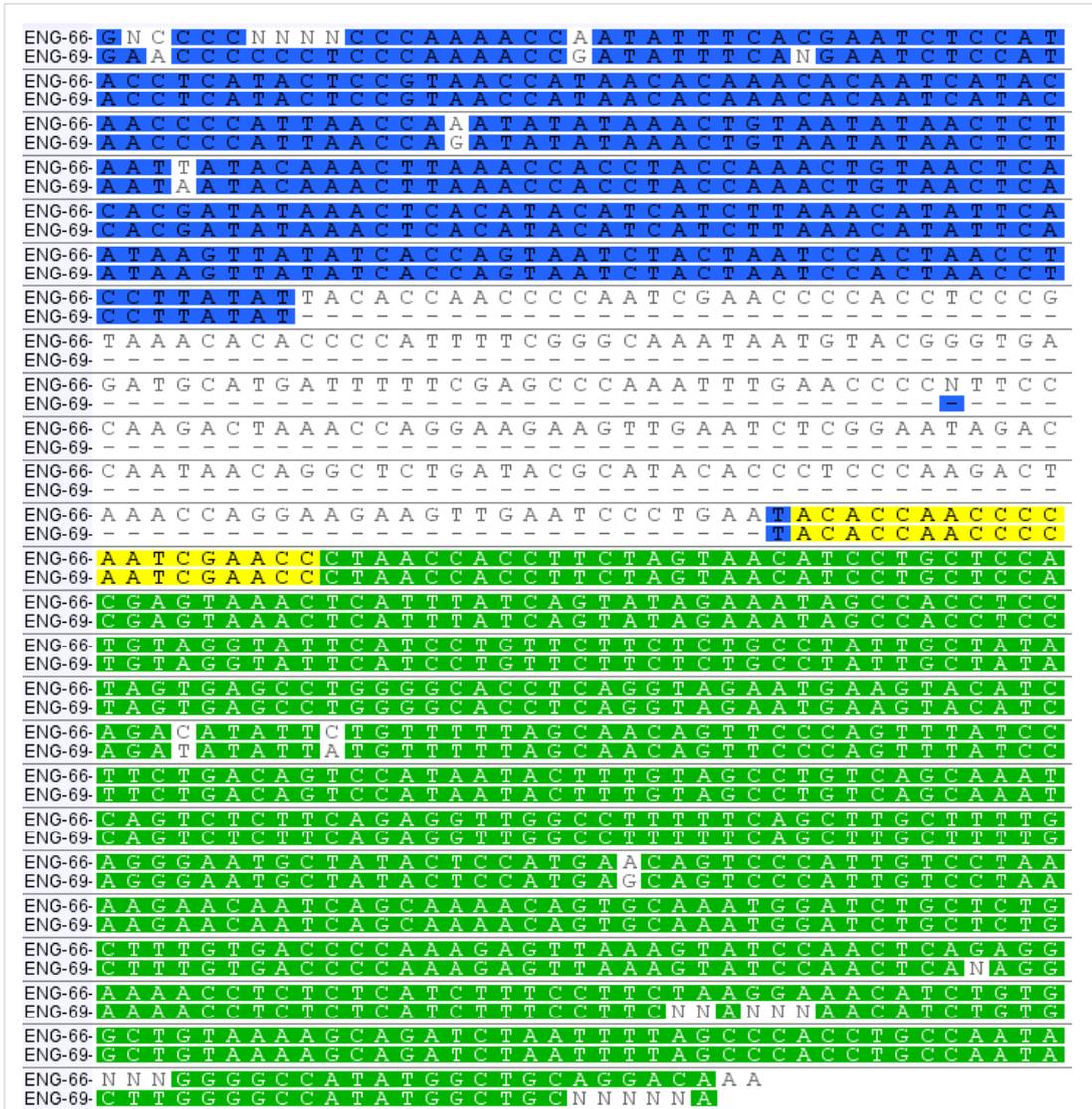


Figura 31. Deleção de parte do kDNA integrado no gene da enzima málica. Alinhamento das sequências ENG 66 (da ave k1-527) e ENG69 (da ave k1-202), indicadas na Figura 30. Note que parte do kDNA integrado em k1-527 foi deletado na ave k1-202. Verde: gene; azul: kDNA; amarelo: região de microhomologia. Apenas as concordâncias entre as sequências estão em destaque.

Esta deleção pode ser explicada pela formação de uma curvatura na estrutura do DNA. Como mostra a figura 32, a maior curvatura no DNA da sequência ENG 66 está na região variável do minicírculo, a qual teria sido deletada na sequência ENG 69. É possível que esta deleção/recombinação tenha acontecido para garantir uma maior estabilidade da molécula.

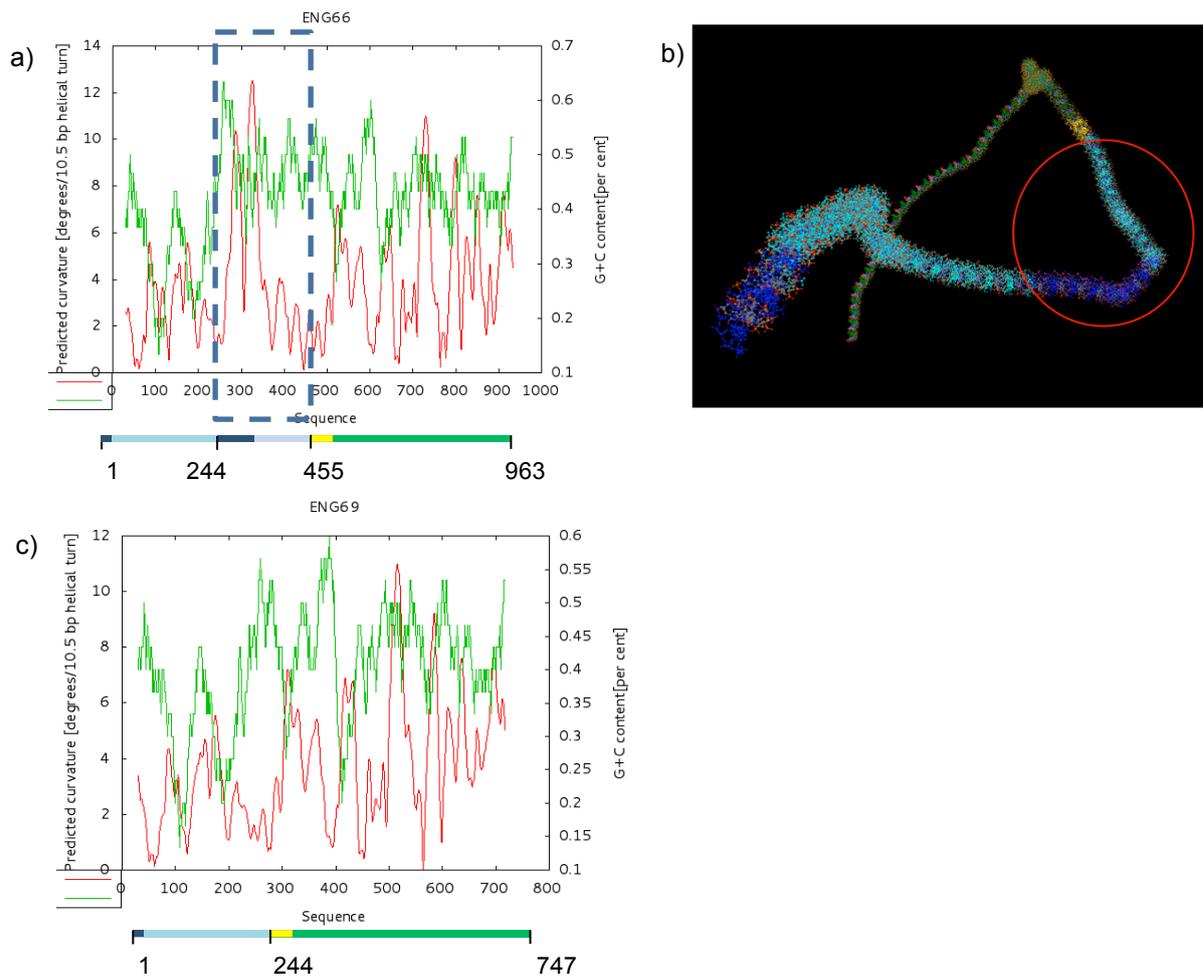


Figura 32. Análise conformacional de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no gene da enzima málica. a) As tensões que geram curvaturas (linha vermelha) e os teores de C/G (linha verde) estão indicadas na seqüência ENG 66 (da ave k1-527). Note que a região deletada (caixa) corresponde a uma alça de curvatura do DNA. b) Imagem representativa da topologia da quimera kDNA- enzima málica. O círculo destaca a curvatura sujeita a deleção. c) A deleção de parte da seqüência do kDNA resultou em perda de curvatura na molécula de DNA. Verde: gene da enzima málica; azul escuro: região conservada de kDNA; azul claro: região variável de kDNA; amarelo: região de microhomologia.

4) Análises das integrações no *locus* da distrofina

Integração de minicírculos de kDNA no *locus* da distrofina foi documentada em células somáticas de diversas aves da Família 1, inclusive nas aves k1-207 e k1-202 do presente estudo (Guimaro, 2012). Ademais, estudo anterior revelou a possível associação deste gene com os múltiplos fatores da patogênese da doença de Chagas, traduzindo em insuficiência cardíaca e fraqueza da musculatura esquelética (Teixeira e cols, 2011a). O gene da distrofina (Gene ID: 396236, NCBI) é cópia única

localizada no cromossomo 1 da galinha. As análises dessas mutações no *locus* NW_001471534.2 do gene da distrofina foram conduzidas mediante abordagem usada para o estudo da enzima málica NADP-dependente.

Para a identificação de sequências quimeras no *locus* da distrofina, foram conduzidas reações de amplificação pela *tpTAIL-PCR*, combinando *primers* de kDNA com os *primers* específicos para a sequência do gene da distrofina, como explicado para o gene da enzima málica. O procedimento gerou 16 sequências quimeras do gene da distrofina de 8 aves da Família 1. As sequências obtidas estão apresentadas no Anexo III. Em vários eventos de integração descritos neste estudo, o minicírculo de kDNA inserido no mesmo ponto do gene da distrofina apresentou região variável diferente.

A Figura 33 mostra dois eventos de integrações no genoma de uma ave, sendo que, em um deles, a sequência de kDNA aparentemente sofreu deleção. Nesse caso, o kDNA foi integrado no mesmo nucleotídeo da sequência da distrofina com 260 pb, mostrando *E-value* $6e^{-126}$ e identidade de 96%.

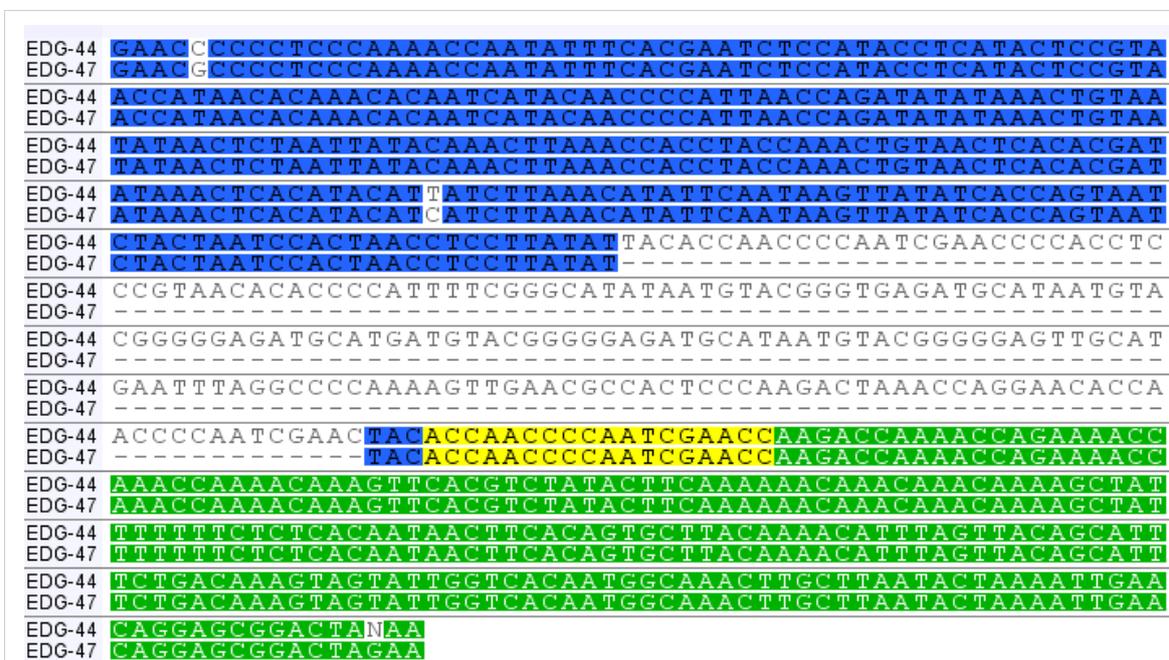


Figura 33. Diversidade de integrações de kDNA no gene da distrofina de uma mesma ave. Alinhamento das sequências EDG-44 e EDG-47, pertencentes à ave k1-224. A sequência de kDNA de EDG-47 parece ter surgido da deleção de parte da sequência de EDG-44. Verde: gene; azul: kDNA; amarelo: região de microhomologia. Na figura, apenas as concordâncias entre as sequências estão em destaque.

A análise *in silico* das sequências representadas na Figura 33 revela que a região variável que teria sido deletada apresentava forte grau de curvatura (Figura 34b e d). A Figura 34c mostra o perfil da sequência posterior à deleção. A análise Bend-it sugere o perfil de curvatura da sequência do gene no sítio de inserção do kDNA (Figura 34a).

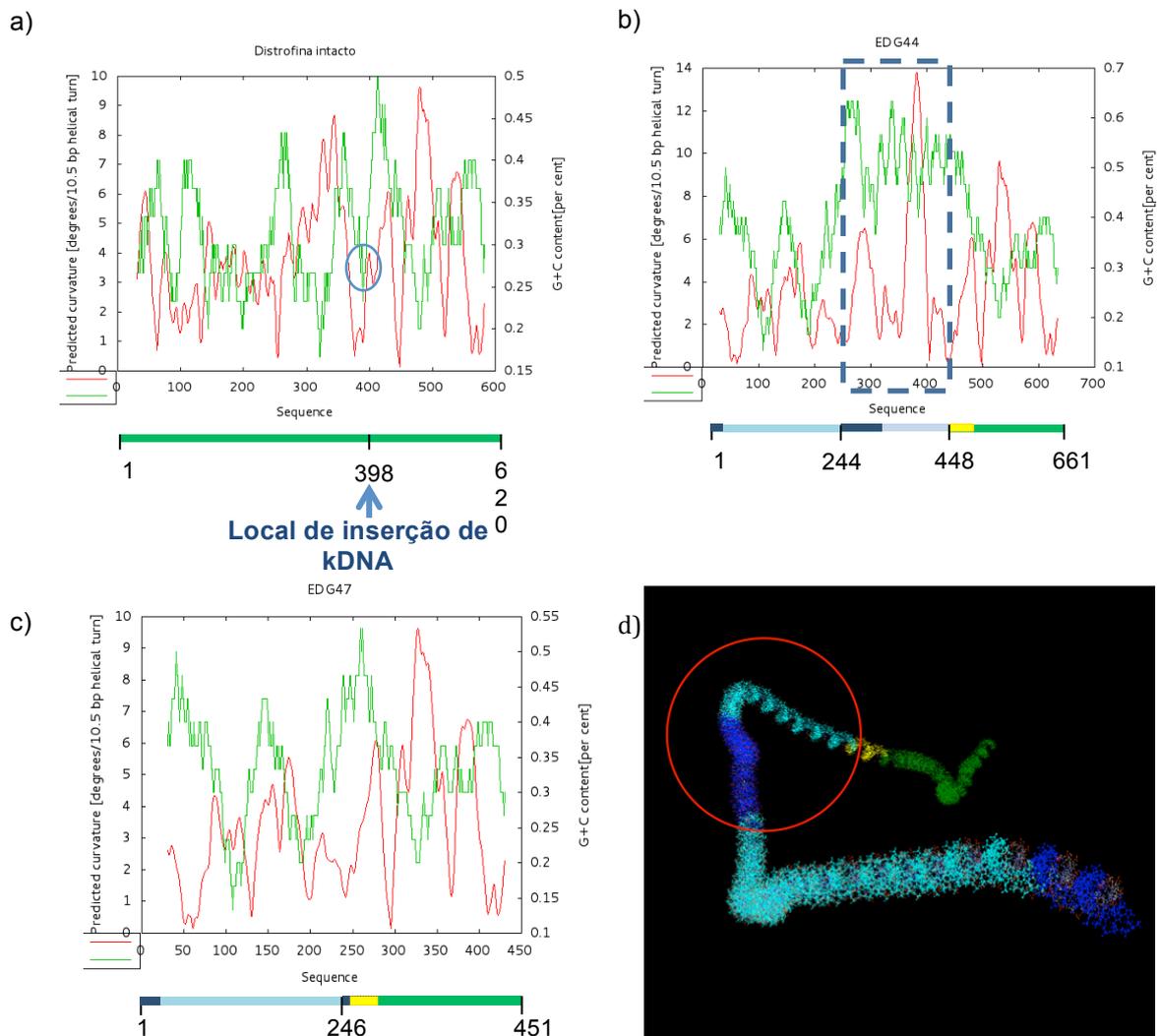


Figura 34. Análise conformacional de sequências quimeras kDNA-distrofina. a) Pontos de tensões que geram curvaturas (linha vermelha) e os teores de C/G (linha verde) na sequência original da distrofina. Note a inserção a região de inserção do kDNA (círculo azul). b) Idem na sequência EDG 44 da ave k1-224, onde a região deletada (caixa) compunha a curvatura do DNA. c) Idem na sequência EDG77 da mesma ave, onde teria ocorrido deleção parcial do segmento do kDNA, resultando no desaparecimento da curvatura em b. d) Imagem gerada a partir das curvaturas de b com o sítio de deleção (círculo). Em verde, gene; azul escuro, região conservada de kDNA; azul claro, região variável de kDNA; amarelo, região de microhomologia. A sequência quimera analisada está representada no esquema abaixo do gráfico.

O alinhamento de sequências do parental e da progênie mostrou homologia de 250 pb da região variável de kDNA (Figura 35). Porém, o kDNA da progênie tinha a sequência mais longa que a encontrada no parental. A análise Blastn revelou homologia do kDNA integrado com *E-value* $2e^{-118}$ e identidade de 98%. Sequências de regiões variáveis idênticas (170 pb) também foram documentadas em aves F2 da Família 1, mostrando que houve a herança vertical (Mendeliana) da mutação (Figura 36). Neste caso, a região variável de kDNA foi identificada no banco de dados com grau de similaridade *E-value* $8e^{-52}$ e identidade 94%.

| | |
|--------|---|
| EDG-24 | |
| EDG-32 | AATCCACTAACCTCCTTATATCACACCAACCCCAATCGAACCCACCTCCCGTAAC |
| EDG-24 | |
| EDG-32 | ACACCCCATTTTTCGGGCATATAAATGTACGGGTGAGATGCATGATTTTTTCGGGCCCA |
| EDG-24 | GAAGCCCCTCCCAAACCAATATTTTCACGAATCTCCATACCTCATACTCC |
| EDG-32 | AATTTGAACCCCCTCCCAAACCAATATTTTCACGAATCTCCATACCTCATACTCC |
| EDG-24 | GTAACCATAAACACAAACACAATCATAACAACCCATTAACCAAATATATAAACTGTA |
| EDG-32 | GTAACCATAACNCAAACACAATCATAACAACCCATTAACCAAATATATAAACTGTA |
| EDG-24 | ATATAACTCTAATTATACAAACTTAAACCACCTACCAAACCTGTAACCTCACACGATA |
| EDG-32 | ATATAACTCTAATTATACAAACTTAAACCACCTACCAAACCTGTAACCTCACACGATA |
| EDG-24 | TAAACTCACATACATCATCTTAAACATATTTCAATAAGTTATACTCACCAGTAATCTA |
| EDG-32 | TAAACTCACATACATCATCTTAAACATATTTCAATAAGTTATACTCACCAGTAATCTA |
| EDG-24 | CTAATCCACTAACCTCCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCAAGACCAAAACC |
| EDG-32 | CTAATCCACTAACCTCCTTATATTACACCAACCCCAATCGAACCAAGACCAAAACC |
| EDG-24 | AGAAAACCAAAACCAAAACAAAGTTCACGTCTATACTTCAAAAAACAACAAACAAA |
| EDG-32 | AGAAAACCAAAACCAAAACAAAGTTCACGTCTATACTTCAAAAAACAACAAACAAA |
| EDG-24 | AGCTATTTTTTTCTCTCACAAATAACTTCACAGTGCTTACAAAACATTTAGTTACAG |
| EDG-32 | AGCTATTTTTTTCTCTCACAAATAACTTCACAGTGCTTACAAAACATTTAGTTACAG |
| EDG-24 | CATTTCTGACAAAGTAGTATTTGGTCACAATGGCAAACCTTGCTTAATACTAAAATTG |
| EDG-32 | CATTTCTGACAAAGTAGTATTTGGTCACAATGGCAAACCTTGCTTAATACTAAAATTG |
| EDG-24 | AACAGAGCGGACTAGAA |
| EDG-32 | AACAGAGCGGANNAGAA |

Figura 35. Herança de kDNA integrado no gene da distrofina. Alinhamento da sequência EDG24 da ave F0 k1-527 e da sequência EDG32 da ave F1 k1-202. Note a integração no mesmo nucleotídeo (transição da microhomologia em amarelo para o gene em verde), e a identidade quase perfeita nas sequências variáveis do kDNA (azul). As homologias estão coloridas.

| | |
|--------|--|
| EDG-76 | GANNNNNNNTCCNAAAACCAAACAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATAGACCAATAACA |
| EDG-77 | GAACCCCCCTCCCAAACCAAACTAGGAAGAAGTTGAATCTCTGAATAGACCAATAAGCA |
| EDG-76 | GGCTCTGATACACATACACCAACCCCAATCGAACCCACCCTCCCATAAACACACCCCA |
| EDG-77 | GGCTCTGATACACATACACCAACCCCAATCGAACCCACCCTCCCATAAACACACCCCA |
| EDG-76 | TTTTTCGGGCATATAAATGTACGGGGGAGATGCACACCAACCCCAATCGAACCAAGACCN |
| EDG-77 | TTTTTGGGCATATAAATGTACGGGGGAGATGCACACCAACCCCAATCGAACCAAGACCN |
| EDG-76 | AACCAGAAACCAAAACCAAAACAAAGTTCACGTCTATACTTCAAAAAACAACAAACAA |
| EDG-77 | AACCAGAAACCAAAACCAAAACAAAGTTCACGTCTATACTTCAAAAAACAACAAACAA |
| EDG-76 | AANCTATTTTTTTCTCTCACAAATAACTTCACAGTGCTTACAAAACATTTAGTTACAGCA |
| EDG-77 | AAGCTATTTTTTTCTCTCACAAATAACTTCACAGTGCTTACAAAACATTTAGTTACAGCA |
| EDG-76 | TTTCTGACAAAGTATATTGGTCACAATGGCAAACCTTGCTTAATACTAAAATTGAACAG |
| EDG-77 | TTTCTGACAAAGTAGTATTGGTCACAATGGCAAACCTTGCTTAATACTAAAATTGAACAG |
| EDG-76 | GAGCGGNCTAGAA |
| EDG-77 | GAGCGGACTAGAA |

Figura 36. Mutações similares no gene da distrofina em aves F2. Alinhamento das sequências EDG76 da ave k1-638 e EDG77 da ave k1-884 descendentes de parental F1 k1-202 e k1-207. Note que a integração ocorreu no mesmo ponto (base 999) do gene da distrofina (verde), e que a sequência variável do kDNA tem similaridade quase total (azul). Em amarelo, microhomologia.

Ao se comparar os dados obtidos aqui com as integrações na distrofina em células somáticas (Guimaro, 2012), viu-se que as sequências da Figura 36 também pareavam com aquela de origem somática do clone DG156 da ave k1-202 (Figura 37). Na sequência na célula somática, há evidência de *hitchhiking* (Guimaro, 2012), onde segmento de DNA de um segundo cromossomo hospedeiro aparece na cor vermelha.

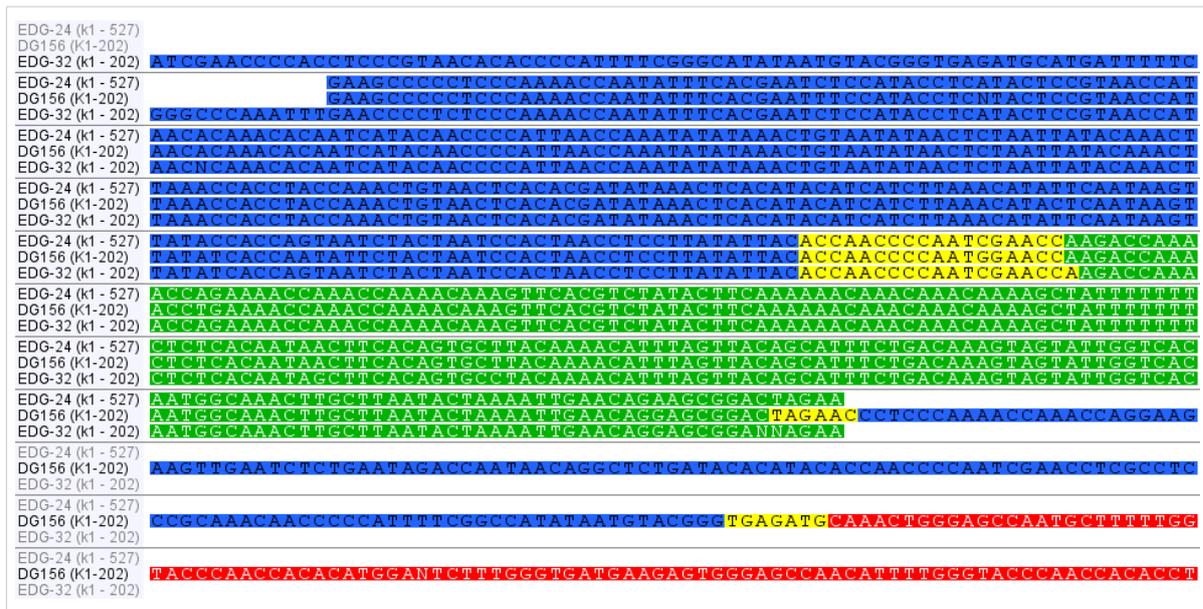


Figura 37. Identificação de mutação similar em células germinativas e somáticas de aves congênicas. Alinhamento das sequências de gametas EDG-24 do parental F0 (galo k1-527) e da progênie F1 EDG-32 (galo k1-202) com a sequência oriunda de célula somática DG-156 do mesmo galo F1 k1-202. As regiões variáveis de kDNA (azul) das três sequências são similares e estão integradas no mesmo ponto (base 999) do gene da distrofina (verde). A sequência DG156 da célula somática mostra segmento de outro cromossomo (vermelho) carregado com fragmento de kDNA mediante *hitchhiking*. Microhomologia em amarelo.

V. Discussão

1. Mapeamento de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas em células germinativas de *Gallus gallus*

A demonstração do fenômeno de transferência lateral de minicírculos de kDNA introduzidos no genoma de *Gallus gallus* mediante inoculação do *T. cruzi* no ovo fértil tem implicações biológicas e médicas, no que concerne a evolução e a doença de Chagas. Certamente, a transferência gênica vertical tem o significado da herança das mutações, que só podem ser transmitidas para a geração seguinte via células da linhagem germinativa (Strachan e cols, 1999). A demonstração clara dos fenômenos TGH, subsequentes ao contato do parental com o *T. cruzi*, e TGV pela herança das mutações foi possível com o emprego do modelo trans-filo, pois a ave torna-se refratária à infecção após a primeira semana de vida do embrião (Nitz e cols 2004; Teixeira e cols 2011a). Neste estudo, a refratariedade das aves originadas de ovos inoculados com *T. cruzi* foi confirmada pela inexistência de nDNA nas aves que retiveram apenas o kDNA do parasito (Figura 11). Na ausência de nDNA não pode haver infecção ativa e o kDNA retido só poderia persistir se integrado ao genoma. Com alta sensibilidade a técnica PCR confirmou a integração do kDNA na ausência da infecção, mesmo porque os exames que utilizaram primers específicos para o DNA nuclear pode detectar até 10 fg de nDNA, ou seja, quantidade 24 vezes menor que o DNA total de um só tripanosoma diplóide (Teixeira e cols 2011a).

O mapeamento do kDNA integrado foi feito mediante emprego da *tpTAIL*-PCR (Figura 14), e os eventos de integração documentados confirmam e ampliam o conhecimento sobre um fenômeno que não pode ser considerado como raro na natureza, visto que TGH e TGV foram documentados inexoravelmente em todas as aves parentais eclodidas de ovos inoculados com *T. cruzi* e nas progênes. Neste estudo, os eventos de integração identificados pela *tpTAIL*-PCR foram sequenciados e as identidades reconhecidas em banco de dados servem de apoio à informação de que os fenômenos TGH e TGV ocorrem, até agora, em todos os casos em que um indivíduo é infectado pelo *T. cruzi*. Eventos de TGH sempre ocorreram na natureza, e os resultados discutidos neste trabalho documentam e expandem ao detalhe a adaptabilidade e a flexibilidade existentes do genoma (Teixeira e cols, 2011b).

A base da discussão dos dados desta dissertação repousa no fato de que sequências de minicírculos de kDNA foram encontradas em aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, cujas sequências retidas no genoma foram transferidas para todas progênes de três famílias estudadas (Figura 11). O kDNA persistente nas gerações F1, F2 e F3 é a herança transmitida do parental para os descendentes. As análises das células da linhagem germinativa (ovócitos e sêmen) que se procederam neste estudo, permitiram a documentação da herança do DNA-exógeno transferido do parental F0 para as progênes F1, F2 e F3.

As integrações de minicírculos de kDNA foram encontradas com frequência nos elementos transponíveis do genoma da ave. Entre esses, foram mais frequentes as integrações nos elementos não-LTR (Tabela 3), principalmente no elemento CR1. 29% das integrações ocorreram em regiões codificadoras do genoma. Interessantemente, em 9% dos casos, as integrações ocorreram em elementos CR1 contidos numa região gênica (Figura 13). A documentação de grande número de eventos de integração de kDNA em elementos retrotransponíveis indica que esta é uma região preferencial de inserção. Esse fato pode estar relacionado às alterações intragenômicas que antecipam possíveis distúrbios de ruptura de tolerância imunológica e autoimunidade (Tighe, 2002; Goodnow, 2007). Ademais, os dados obtidos neste estudo corroboram os dados em humanos que mostram que o elemento retrotransponível LINE-1 é sítio preferido de TGH (Hecht e cols 2010, Teixeira e cols, 2011b). É possível que este conhecimento venha a ser ampliado com a obtenção do sequenciamento total de genomas, visto que a abordagem deste estudo empregou *primers* específicos para retrotransposons na reação de *tpTAIL-PCR*.

A distribuição da frequência dos sítios de integração nos diversos cromossomos das células germinativas da galinha foi semelhante à encontrada para células somáticas (Guimaro, 2012). Entretanto, o número de integrações no cromossomo 1 (Figura 12) foi maior neste estudo (26%) do que nas células somáticas (16%). A frequência elevada de integrações neste cromossomo tem duas possíveis explicações. Primeiro, os macrocromossomos são mais ricos em regiões de elementos transponíveis (Burt, 2005), e isto favoreceria integrações de kDNA nestes cromossomos. Segundo, foram encontradas várias integrações no mesmo *locus* em aves das três famílias. O caso mais interessante é o do gene da enzima málica NADP-dependente mitocondrial, localizado no cromossomo 1. As 15

mutações encontradas neste gene indicam que este é um *hotspot* para a inserção do kDNA. Este achado explica porque houveram tantas integrações no cromossomo 1.

Em adição às integrações frequentes no gene da enzima málica, várias outras aves tiveram um alto índice de integração de kDNA em regiões específicas do genoma (Figuras 19 e 20). Algumas dessas aves não tinham parentesco, e, então, a integração do kDNA naqueles sítios, independentemente da família de sua procedência, significa que se tratava de *hotspot*. Eventos deste tipo foram documentados no *locus* NW_003763668.1 que codifica a proteína PTHB1 (Figura 19), relacionada à ciliogênese (Nachury e cols, 2007), e no *locus* NW_003763785.1 que transcreve o fator SOX-6, relacionado ao desenvolvimento muscular esquelético e cardíaco (Cohen-Barak e cols, 2001). O papel que os eventos de integração nesses sítios de integração poderiam ter na patogênese da doença de Chagas não pode ser subestimado. Por exemplo, o fator de transcrição SOX-6 tem se apresentado como um supressor da transcrição durante a miogênese. O *knockout* deste gene leva a um aumento na expressão de várias proteínas estruturais importantes no desenvolvimento da musculatura cardíaca (miosina-6 e troponina T tipo 2) e esquelética. A perda de Sox6 é relevante em doenças musculares degenerativas e em cardiopatias (An e cols, 2011). Mutações neste gene se associam a miopatias (Hagiwara e cols, 2000). Desta forma, as integrações de kDNA nas sequências do SOX6 podem ser um dos fatores de reversão do estado fisiológico para o fisiopatológico e de promoção de doenças associadas com alterações genéticas.

As análises das sequências quimeras nos sítios das mutações quase sempre tinham região de microhomologia de sequência com complementaridade de kDNA-DNA hospedeiro. A microhomologia rica em CA sempre correspondia aos blocos de motivos repetidos (CSB1, CSB2, ou CSB3) na região conservada do kDNA. Esses sítios de complementaridade do DNA hospedeiro podem ser considerados definidores do sítio de integração do kDNA no genoma. A Figura 26 ilustra microhomologia no genoma hospedeiro semelhante àquelas da região conservada do kDNA, verdadeiro sinal aberto para integração de DNA exógeno. A estrutura e o mecanismo de integração de kDNA exhibe caráter parcialmente semelhante ao de LINE-1 (Figura 7). A Figura 38 mostra um modelo de integração do kDNA, sustentado na integração no gene da enzima málica (Figura 26). O modelo

apresentado pode ser adaptado na expectativa de servir para vários outros eventos, identificados ou ainda não-identificados, de integração de DNA exógeno.

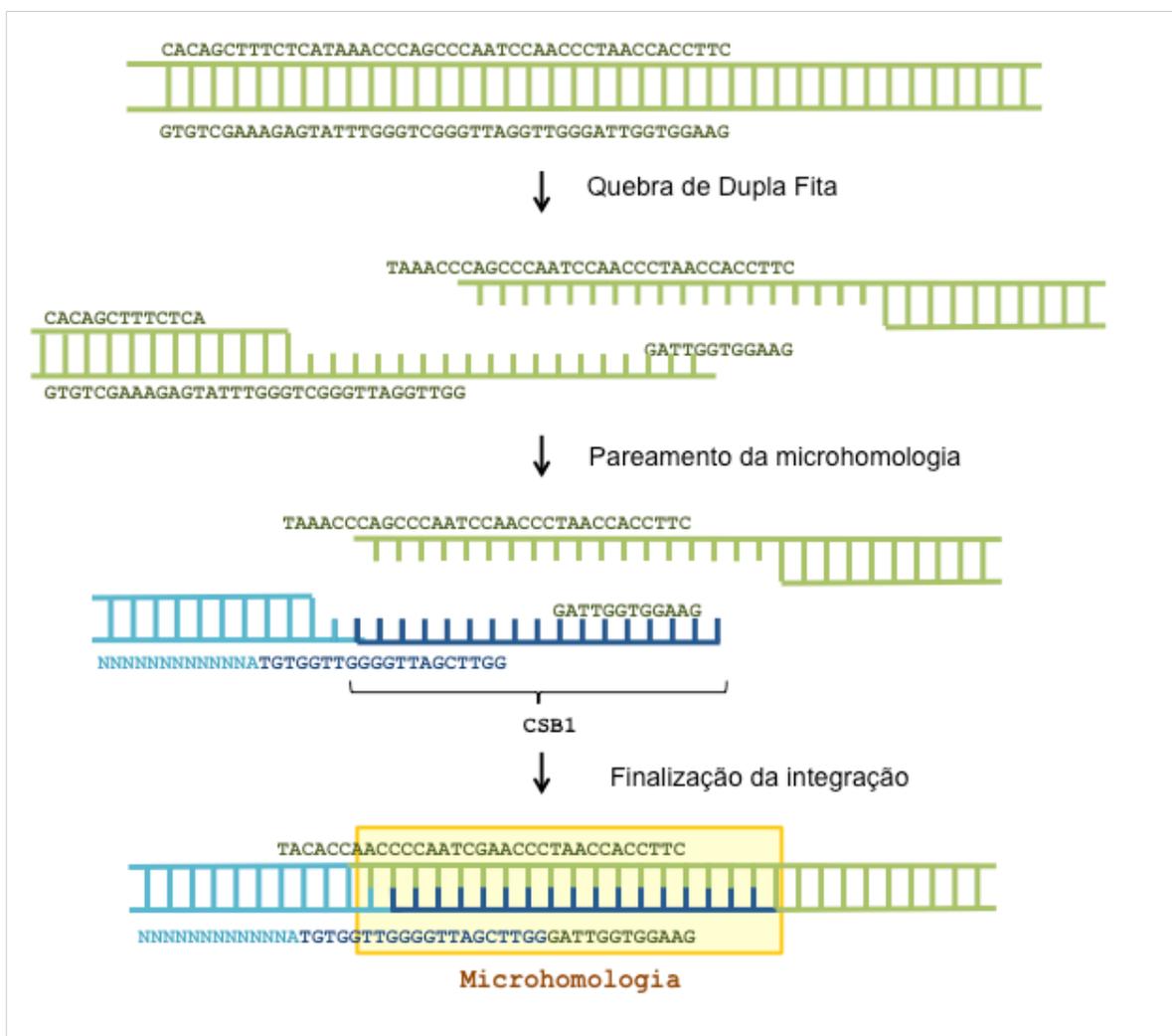


Figura 38. Provável mecanismo de integração do minicírculo de kDNA no genoma do hospedeiro. Modelo construído com base na Figura 26, cujo evento de integração ocorreu no *locus* NW_003763650.1. A quebra de dupla fita possibilita o pareamento da região conservada do minicírculo com microhomologia no genoma hospedeiro. Verde: genoma da galinha; azul claro: região variável do kDNA; azul escuro: região conservada do kDNA; Em amarelo, microhomologia.

O estresse produzido pela infecção seria um fator de quebra (*double strand break* - DSB) da fita dupla do DNA (Hecht e cols, 2010). No genoma humano, foi demonstrado que a ocorrência de DSB não é aleatória, pois seria influenciada pela ambiência no local da quebra. Assim, a presença de estruturas secundárias, do tipo de alças e curvaturas do DNA, também serviria como pontos eletivos de DSB e integração (Kusakabe e cols, 2001; Chen e cols, 2010). Tais aspectos configuracionais criariam sítios eletivos (*hotspot*) de integração de kDNA.

De fato, análises da conformação do DNA do gene da enzima málica mostram que a inserção do kDNA se deu em um ponto com curvatura intrínseca da sequência, como ilustrado na Figura 27. Já existem relatos de que regiões com forte curvatura do DNA são *hotspots* para integrações de retroelementos LINE1 e DNA viral. No entanto, não se sabe ainda o porquê da preferência por estes sítios. Pode ser que o elemento a ser integrado já reconheça os sítios dobrados, ou ainda, que a flexibilidade do sítio alvo aumenta a eficiência da reação ao diminuir a quantidade de energia necessária para gerar a curvatura (Noah e cols, 2006). No caso do gene da distrofina, a inserção se deu aparentemente de forma independente à curvatura do DNA (Figura 34a).

2. A relevância das integrações nos dois sítios estudados: enzima málica NADP-dependente e distrofina

Neste estudo, dois sítios de integração receberam atenção especial. O sítio da enzima málica NADP-dependente, mitocondrial, foi escolhido pela frequência de integrações neste *locus* nas aves das três famílias. O gene da distrofina foi escolhido devido à sua importância na patologia da doença de Chagas, como sugerido em outro estudo com *Gallus gallus* (Teixeira e cols, 2011a).

Análises do banco de dados NCBI mostrou que o kDNA se inseriu, em ambos os casos, na região do íntron daqueles genes. Ainda assim, as integrações podem interferir na função gênica, visto que inserções de elementos de DNA exógeno em íntron pode levar à quebra do gene, podendo gerar proteínas truncadas nas extremidades, levando as alterações funcionais (Belancio e cols, 2009).

2.1) Integração na enzima málica NADP dependente.

Certos produtos de *tpTAIL*-PCR que foram obtidos revelaram que a enzima málica é um *hotspot* de integração do kDNA, pois a mesma mutação foi encontrada em diversas aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* e nas progênies (Figuras 28 a 32). A condução da PCR com *primers* específicos em ave controle mostrou que a sequência do gene na quimera é homóloga à sequência depositada no banco de dados do NCBI, e as poucas diferenças pontuais foram explicadas pelas diferenças raciais (Figura 25). A mutação no gene de qualquer dessas

enzimas tem o potencial de comprometer o funcionamento de vias metabólicas ou anabólicas, com repercussão na função do órgão.

A enzima málica mitocondrial NADP-dependente, também chamada de ME3, está envolvida no metabolismo do carbono e do piruvato (ciclo de Krebs). Estudos mostram que sua expressão é maior no coração, músculo esquelético, cólon, rim, cérebro, e também tem uma expressão significativa em ovários e testículos (Loeber e cols, 1994). A principal função do ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs) no coração é oxidar grupos acetila para gerar equivalentes redutores (NADH e FADH₂), que são usados para síntese de ATP. A depleção deste ciclo resulta num rápido declínio da função cardíaca, com hipertrofia do miocárdio e susceptibilidade a lesões (Gibala e cols, 2000).

Diversos estudos apontam a importância da mitocôndria na função da célula cardíaca. Esta organela é, no coração, a principal fonte de energia na forma de ATP, e também é a principal fonte de estresse oxidativo (Nickel e cols, 2013). O desenvolvimento e a progressão de doenças cardíacas têm sido comumente associados a alterações energéticas do miocárdio, relacionadas com uma desregulação do funcionamento da mitocôndria (Huss e Kelly, 2005).

A enzima málica está intimamente envolvida neste processo, pois, é uma das enzimas envolvidas na produção de NADH e NADPH. Estas moléculas são importantes na produção de ATP e também na eliminação de espécies reativas de oxigênio (Nickel e cols, 2013). Uma mutação que inviabilize o funcionamento desta enzima málica levaria a um estresse oxidativo no miocárdio, e também a uma diminuição na produção do ATP. Isto resultaria numa hipertrofia das fibras cardíacas e sintomas característicos de insuficiência cardíaca. A desregulação bioenergética do miocárdio e o desequilíbrio de agentes oxidantes e anti-oxidantes pode ser um dos agentes da patofisiologia da insuficiência cardíaca, que se instala no curso da cardiomiopatia chagásica crônica (Báez e cols, 2011).

O coração sadio possui diversos mecanismos de obtenção de energia, o que lhe garante uma flexibilidade metabólica. Esta flexibilidade é prejudicada quando há patologias do coração (Taegtmeyer e cols, 2004). Mecanismos que reponham os intermediários do ciclo do ácido cítrico tem um papel importante no coração hipertrofiado. Anaplerose é o nome que se dá a uma via que reabastece um ciclo metabólico. Uma das principais enzimas envolvidas na anaplerose cardíaca é a

enzima (ME1) málica NADP dependente citosólica (Gibala e cols, 2000; Des Rosiers e cols, 2011).

A enzima málica citosólica NADP-dependente é mais amplamente estudada que sua variante mitocondrial (ME3), mas ambas apresentam similaridades estruturais e provavelmente funcionais (Loeber e cols, 1994). Como esta enzima apresenta uma função muito importante na anaplerose do coração, uma mutação que inviabilize sua função pode resultar em insuficiência cardíaca. Estudos mostram que a desregulação da anaplerose pode ser um fator crítico no metabolismo de doenças cardíacas em humanos. Diversas doenças genéticas que apresentam cardiomiopatia aguda e crônica com disfunção contrátil estão relacionadas a um desequilíbrio entre a anaplerose e o efluxo de intermediários do ciclo do ácido cítrico (Des Rosiers e cols, 2011).

Alterações no funcionamento mitocondrial também foram descritas no coração distrófico. Estas alterações precedem a cardiomiopatia típica em indivíduos com mutação no gene da distrofina (Burelle e cols, 2010). Em adição à mutação na enzima málica, foram encontradas integrações em outros genes importantes do metabolismo, como a piruvato desidrogenase quinase (NW_001471534.2), indicadas nas Figuras 16 e 20. A alteração metabólica cardíaca, mediada pela integração do kDNA em várias enzimas, pode ter um papel na patologia da doença, mas esses fatores ainda são pouco estudados.

2.2) Integração no gene da distrofina

A distrofina é uma proteína intracelular, em forma de haste, com quatro domínios funcionais. Ela está localizada na superfície interna do sarcolema, e interage com os filamentos de actina em sua extremidade N terminal, e liga o citoesqueleto na membrana celular. O domínio C-terminal está ligado a múltiplas proteínas, formando o Complexo Proteico Associado a Distrofina (DAPC). A integridade deste complexo proteico é crucial para que a miofibrila resista ao estresse mecânico gerado pelos sarcômeros (Rahimov e Kunkel, 2013).

Sabe-se que mutações no gene da distrofina resultam em danos na membrana e necrose associados com a inflamação crônica e degeneração muscular. A mutação no gene da distrofina pode contribuir para a patogênese de cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. O silenciamento da distrofina já foi observada em diferentes formas de cardiomiopatias adquiridas (Prado e cols, 2012).

Como mostram os dados do presente trabalho, integrações de kDNA no gene da distrofina foram encontradas em oito aves da Família 1. Estudos com camundongos infectados com *T. cruzi* mostram que os níveis de distrofina diminuem no coração, e isto leva depois ao desenvolvimento de cardiomiopatia (Prado e cols, 2012). É possível que a inserção de kDNA seja o fator da redução dos níveis da distrofina que se tem observado no coração em modelos animais da doença de Chagas. Esta mutação estaria associada à patologia inflamatória típica da doença, fraqueza muscular, cardiomegalia e falência cardíaca (Teixeira e cols, 2011a). A mutação no gene da distrofina se acompanha de reação inflamatória persistente que acelera a progressão da doença. Esses componentes da patologia também estão presente nas distrofias musculares de Duchenne e Becker, cuja causa genética é a mutação no gene da distrofina. (Prado e cols, 2012).

Não obstante o encontro de mutações de kDNA em genes que transcrevem proteínas com importantes funções no crescimento e diferenciação celulares, e, também, na fisiologia das células musculares, particularmente nas células do coração, muitas aves com essas mutações não apresentavam repercussão clínicas. Aves que apresentaram cardiomegalia possuíam mutações múltiplas detectadas pela *tpTAIL*-PCR principalmente nos genes da enzima málica, distrofina, fator de transcrição SOX6, proteína PTHB1, teneurina, tirosina fosfatase mu, proteína tipo retinoblastoma 1, piruvato desidrogenase quinase, em retrotransposons CR1, Gypsy e Hitchcock e em transposons de DNA. Não foi detectada nenhuma ave com todas estas mutações, mas em todas as aves com aumento do peso do coração pelo menos duas destas mutações estavam presentes. Essa relação sugere que a patogenia é desencadeada pela integração de kDNA em múltiplos *loci* do genoma, e não apenas em um *locus* específico.

3. A herança do kDNA: estudo em famílias

Como as gerações F1, F2 e F3 das aves não tiveram em contato com o *Trypanosoma cruzi*, as sequências de minicírculos de kDNA retidas nestas aves devem ter sido transmitidas verticalmente pelos parentais que as adquiriram intraovo. Desta forma, seria esperado encontrar as mesmas mutações nas aves da

mesma família de acordo com a herança Mendeliana. Entretanto, os produtos de *tp*TAIL-PCR com *primers* específicos de elemento CR1 ou com *primers* em genes específicos revelaram integrações de kDNA no mesmo *locus* de aves da mesma família, mas, na maioria dos casos, a região variável do minicírculo do kDNA integrado era diferente. Quando diferentes regiões variáveis eram documentadas em parental e nas progênes da mesma família, tal diferença era considerada como herança não-Mendeliana. A explicação para a herança não-mendeliana (sequência variável de minicírculo integrado no parental diferente daquela na progênie) pode ser devido à transposição e recombinação do DNA exógeno na progênie, ou o kDNA integrado e mobilizado durante a transposição do elemento ativo determinou recombinação e remodelamento na estrutura do minicírculo ou parte da quimera. A diferença ainda pode ter ocorrido pela integração de minicírculos diferentes de kDNA. Os próximos itens discutem essas possibilidades em casos específicos.

3.1. A sequência de minicírculo integrada no parental pode não ser a mesma encontrada na progênie.

É sabido que no cinetoplasto do *T. cruzi* existe uma heterogeneidade de cópias de minicírculos (Myler, 1993). Assim, durante a infecção, é possível que uma grande variedade de minicírculos de kDNA seja inserida nas células embrionárias até o oitavo dia, quando o parasito é eliminado do organismo. A formação das gônadas já é visível desde o dia 3,5 do estágio embrionário (Smith e Sinclair, 2004), mas a diferenciação de ovócitos e espermatogônias só ocorre no 8º e 13º dia, respectivamente (Nakamura e cols, 2013). Desta forma, é possível que cada gameta numa mesma ave apresente integrações de diferentes minicírculos de kDNA em suas células germinativas primordiais. Este aspecto de mosaico genético é sugerido nas Figuras 17 a 20.

Nos *hotspots* de integração podem ocorrer integrações de minicírculos com diversidade de sequências em células primordiais diferentes que darão origem à espermatogônia e à ovogônia. Sendo assim, os gametas terão pouca chance de apresentar os mesmos minicírculos integrados no genoma. À medida que as integrações encontradas no parental e na progênie têm origem em células germinativas com imensa diversidade de regiões variáveis nos minicírculos

integrados, a diversidade genética procede sem limite conhecido. Em outras palavras, cada gameta já tem seu padrão diferenciado de sequência de minicírculo antes da fecundação, e a grande quantidade de diferentes padrões de mutações de kDNA caracteriza a possibilidade de diversidade genética quase infinita. Essa interpretação dos resultados tem base na apreciação da presença de regiões variáveis de kDNA constantemente diferentes nas mutações detectadas pela *tp*TAIL-PCR. Essa é uma explicação possível para a observação de diferenças entre as sequências variáveis de kDNA nas aves da mesma família. A Figura 39 esquematiza esta hipótese. Adicionalmente, a imensa diversidade de sequências variáveis de kDNA observada nas mutações também pode ser potenciada pela integração de diferentes minicírculos em fitas opostas de dois pares de cromossomos.

No exemplo esquematizado na Figura 23a, mutações no mesmo *locus* de células somáticas e germinativas tinham as sequências de kDNA diferentes. As sequências do esquema foram oriundas da ave k1-527 nascida de ovo inoculado com *T. cruzi* no estágio de epiblasto, antes da incubação. Como é esperado que esta ave seja um mosaico genético, é perfeitamente possível que estas sequências representem dois eventos de integração em alelos diferentes do mesmo *locus* no par daquele cromossomo. A Figura 23b ilustra o mesmo fenômeno, mas a sequência de minicírculo de kDNA integrada originada do esperma da ave F0 e da célula somática da ave F1 pode ter seguido o padrão sugerido na Figura 39. Por fim, o cenário apreciado no mapeamento do genoma das aves mutadas pode ser apenas uma parcela do total das mutações no mosaico genético produzido pela diversidade de minicírculos de kDNA do *T. cruzi*. O reconhecimento total do mosaico requer o sequenciamento completo do genoma de cada parental e progênie.

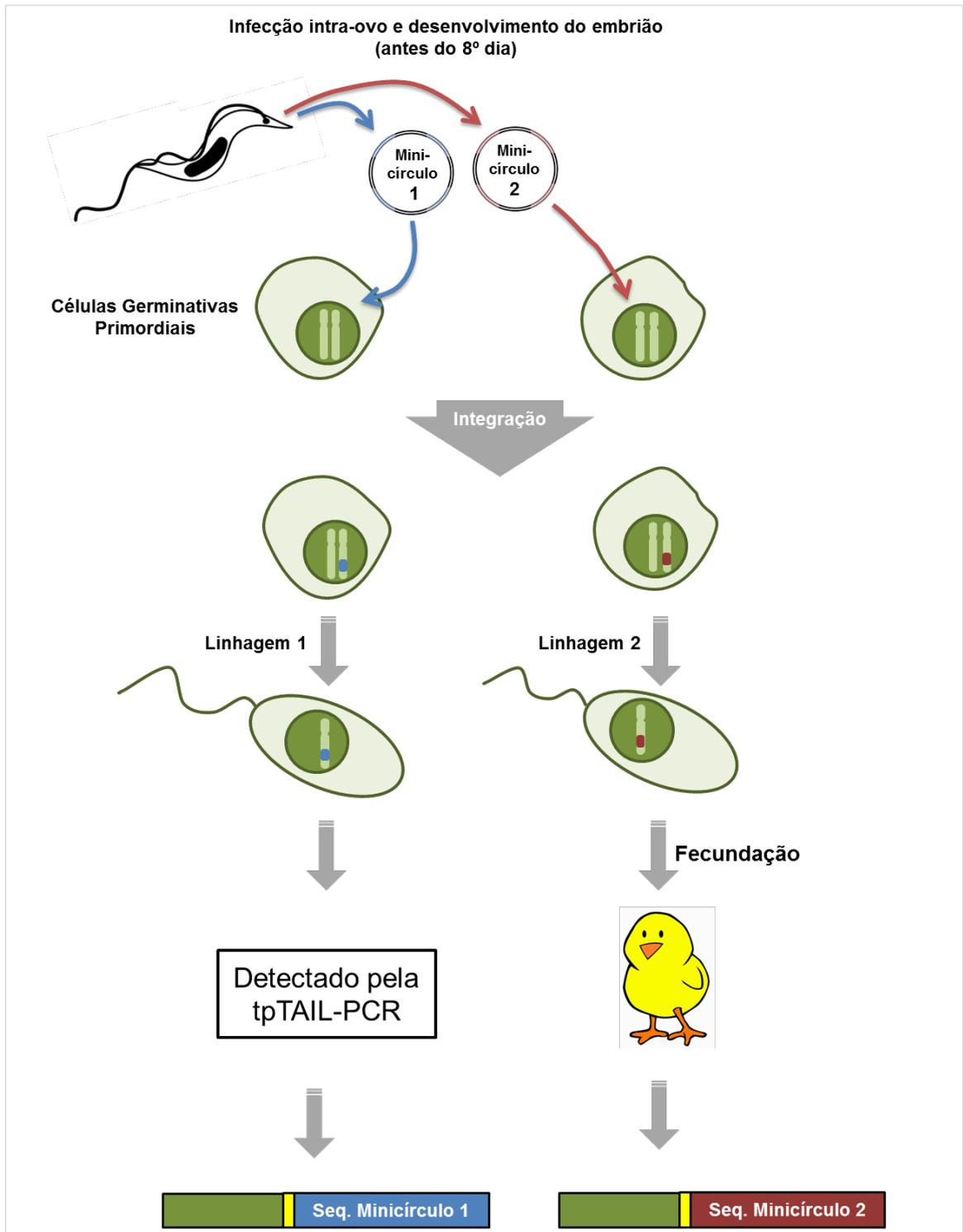


Figura 39. Diversidade de minicírculos integrados no mesmo *locus* genético. Durante a infecção intra-ovo, sequências de minicírculos diferentes integram em células germinativas primordiais do embrião, produzindo linhagens diferentes de gametas. Na fecundação, dois gametas (ovócito e espermatozóide) de linhagens desconhecidas contribuem com minicírculos diferentes que se integram em alelos *hotspots* em alelos de cada cromossomo, do mesmo par. Então, a integração detectada na progênie pela técnica da *tpTAIL-PCR* pode gerar duas integrações diferentes no mesmo *locus* do par de cromossomo.

3.2) Mobilização do kDNA integrado

O mesmo minicírculo identificado pela sua região variável foi encontrado integrado em *loci* diferentes da mesma ave, em células germinativas (Figuras 21 e 22) ou em células somáticas e germinativas de parental e progênie (Figura 24). É possível que essas quimeras kDNA-DNA hospedeiro com a mesma sequência de minicírculo sugira a eletividade de famílias de minicírculos para eventos de integração.

Mas a translocação do kDNA de um *locus* para o secundário já foi documentada (Simões-Barbosa e cols 2006). Esta atividade dependente de transcriptase reversa endógena em CR1, o que deveria ser rara devido a presença de apenas poucas cópias desse elemento ativo no genoma de aves (ICGSC, 2004). Entretanto a mobilização do minicírculo para o segundo *locus* pode ser identificada pela presença de microhomologias (principalmente aquelas ricas em CA) nos blocos CSB1, CSB2, e CSB3 nas regiões conservadas do kDNA e no genoma da ave (Teixeira e cols, 2012).

A atividade mobilizadora dos elementos retrotransponíveis está associada a origem de mutações produzidas endogenamente, como aquelas que aparecem em algumas doenças genéticas. Nesses casos se tem sugerido que a patologia resulta de rupturas de ORFs e perda da função ou regulação do gene. Tem sido observado que esta atividade mutagênica é mais frequente em células germinativas que em células somáticas (Belancio e cols, 2009). No nosso estudo a média de mutações em células germinativas ($4,3 \pm 2,1$ por ave) foi similar àquela (5 ± 3 por ave) obtida em células somáticas (Guimaro, 2012).

É possível que o kDNA integrado tenha atividade similar àquela de elemento transponível não autônomo, locomovendo-se de uma região para outra do genoma. A documentação de *hitchhikings* mostra a mobilização do kDNA contínuo com fragmento truncado de LINE-1 (Simões-Barbosa e cols 2006; Hecht e cols 2010), de maneira similar a SINEs.

Em camundongos, foi demonstrado que eventos de retrotransposição são comuns durante a embriogênese (Kano e cols, 2009). Também, a presença de transcritos de CR1 foi documentada em embriões e ovário de galinha (Shapira e cols, 1991). Como a infecção com o *T.cruzi* e, conseqüentemente, a integração do kDNA ocorreria durante a embriogênese, a atividade de transposição dos elementos

transponíveis também pode significar fator de disseminação do kDNA por todo o genoma (Figuras 21, 22 e 24). Este fator também contribuiria para a presença da mesma sequência de kDNA em genes diferentes na mesma ave F0, e também nas progênes F1, F2, F3. Como mostra a Figura 21, em muitos dos casos encontrou-se integração da mesma sequência variável de minicírculos em retrotransposon CR1. Talvez este retrotransposon tenha carregado aquela sequência para integrações *de novo* no embrião. A atividade de retrotransposons foi observada em gansos e outras aves aquáticas (John e Quinn, 2008). Sobre a possibilidade de ativação de CR1 antes inativo mediante integração do kDNA, não há como descartá-la.

As nossas observações e as citações acima descrevem mosaicismos mais frequentes em células tronco primordiais durante a embriogênese. A presença de mosaicismo significa herança não-Mendeliana porque sua estrutura nas progênes foi modificada pela atividade de retrotransposição, recombinação e remodelamento do genoma no *locus* mutado (Kano e cols 2009). Com essa explicação, é possível compreender a presença de quimeras diferentes nos progenitores e na prole.

3.3) Recombinações nas quimeras

Neste estudo, foram encontradas mutações similares em aves da mesma família e também numa mesma ave, porém, com indício de algum tipo de recombinação (Figuras 30, 31, 33). Talvez, a explicação para a recombinação esteja na estrutura da região variável do kDNA rica em motivos de nucleotídeos repetidos. Nota-se alto teor de C+G nas regiões deletadas (linha verde das Figuras 32 e 34). Sabe-se que motivos de DNAs repetitivos servem como substratos para rearranjos, deleções, inversões e translocações (George e Alani, 2012). Os elementos repetitivos tendem a formar estrutura tridimensional no DNA, tais como grampos, triplexes e tetraplexes (Wells e cols, 2005). Tais estruturas promovem quebra de dupla fita de DNA (DSB) em sítios eletivos de integração, recombinação e rearranjos que antecedem remodelamento do locus genômicos (Bacolla e cols, 2006). Estes rearranjos, incluem os eventos de expansão, deleção, replicação e reparo de sequências do DNA recombinado. A instabilidade da sequência replicada, decorrente de motivos repetidos, geralmente é considerada o maior fator influenciador das recombinações genéticas.

Adicionalmente, o deslizamento de fitas de DNA repetitivo complementar leva a formação de alças (*loops*) em forma de grampo (*hairpins*) que atrasam a atividade da DNA polimerase, facilitando o aparecimento das mutações (Wells e cols, 2005). Particularmente, nas células germinativas, a taxa de mitose e meiose é alta, e isto possibilita as recombinações. Estudos em linhagens germinativas mostraram que sequências repetitivas tem propensão à instabilidade, condição essa que propicia remodelamentos (Bacon e cols, 2001). Isto pode explicar o rearranjo do kDNA em células germinativas de um mesmo indivíduo, no parental ou na progênie.

A análise *in silico* das sequências das Figuras 31 e 33 mostrou que a região deletada de kDNA correspondia a uma curvatura na dupla fita do DNA (Figuras 32 e 34). Na sequência, os motivos estruturais repetidos em fase com a hélice do DNA formam moléculas de DNA intrinsecamente curvadas. A curvatura é gerada pelas pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos repetitivos (Crothers e cols, 1990). A conformação do DNA é importante para o funcionamento de diversos processos biológicos e os sítios com curvaturas (*bends*) estão relacionados com regiões onde o DNA e proteínas interagem (Gimenes e cols, 2008). Tais *bends* foram identificados como sítios preferenciais de ligação de proteínas que clivam o DNA, inclusive a topoisomerase II (Milot e cols, 1992). Interessantemente, esta enzima também é a responsável pela decatenação da rede de minicírculos no cinetoplasto (Liu e cols, 2005; Shapiro e Englund, 1995) e seu papel no mecanismo de integração do kDNA no genoma do hospedeiro fica assegurado.

As Figuras 32 e 34, entretanto, mostram que a região de curvatura dupla fita do minicírculo ou do DNA hospedeiro pode ser deletada. Já existem relatos que correlacionam as curvaturas intrínsecas com eventos de recombinação de DNA, além de facilitar eventos de replicação, transcrição (Man-Li e cols, 2002) e compactação do nucleossomo (Kiyama e Tifonov, 2002). As curvaturas são sítios de instabilidade (sítios frágeis) onde ocorrem quebra, deleção e recombinação (Palin e cols, 1998; Barbosa e cols, 2008). A organização espacial de um gene no núcleo pode definir *hotspots* de eventos que antecipam o remodelamento final. Neste sentido, sabe-se que o gene da distrofina tem um *hotspot* para deleção num *loop* de DNA na matriz nuclear (Iarovaia e cols, 2006).

O evento de duplicação de uma região variável inteira de kDNA foi documentado na Figura 30. Não se pode afirmar se a duplicação ocorreu na geração F2, como mostra a sequência ENG71, ou se ocorreu nas gerações anteriores, e

apenas não foi detectada por meio da *tpTAIL* PCR. A esse respeito, o evento mostra que o kDNA integrado no genoma passa por uma série de eventos que inclui translocação, deleção, recombinação e remodelamento nas sequências quimeras no sítio da mutação. O produto final exhibe o que resultou da integração da sequência original do DNA exógeno, constantemente sujeito a outros eventos engenheirados na última ambiência do *hotspot* atual. Em resumo, a discussão acrescenta informação sobre a diversidade genética sem limite sobre o tipo de herança não-Mendeliana nas aves das famílias analisadas.

3.4) Herança e fixação do kDNA

As Figuras 29 e 35 mostram dois casos onde foi possível verificar a mesma mutação de kDNA no gene parental e na progênie: uma no gene da enzima málica, e outra no gene da distrofina. Ao que tudo indica, tais sequências encontradas nas aves F1 ou F2 foram herdadas integralmente de seu ancestral, comprovando a transmissão vertical do kDNA. Também foi encontrada duas integrações com a mesma sequência de kDNA no gene da distrofina entre aves irmãs (Figura 36). Estas aves devem ter herdado estas mutações de um mesmo ancestral comum.

Estes resultados mostram que existe a fixação da mutação do kDNA no genoma hospedeiro. Mostra também que a mutação é transmitida via células germinativas para a progênie, onde podem ser localizadas nas células das linhagens germinativa e somática na progênie (Figura 37). Não obstante a raridade de mutações iguais nos parentais e na progênie, nas famílias do estudo, foi possível revelar tais mutações quando a *tpTAIL*-PCR foi conduzida com aneladores específicos para sequências de genes, direcionando a cópia para aquela região previamente mutada. Neste estudo, o achado da mesma mutação no parental e na progênie comprova que, ocasionalmente, o padrão de herança Mendeliana do DNA exógeno pode ser encontrado.

VI. Conclusões

1. A análise do DNA de células germinativas de aves congênicas de três famílias mostrou que sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integram em vários *loci* e que as mutações fixadas no genoma podem ser herdadas pelas progênes. Entretanto, foi observado que frequentemente as mutações num mesmo *locus* de integração eram estruturalmente diferentes. O fato documentado sugeriu a herança não-mendeliana do kDNA. Porém, ocasionalmente, raros eventos de integrações em genes específicos mostram padrão Mendeliano de herança.

2. Algumas mutações analisadas foram mobilizadas para um segundo local do genoma, pela transposição do minicírculo integrado para o mesmo ou para outro cromossomo.

3. As características estruturais do kDNA integrado em regiões de microhomologias no genoma hospedeiro explicam a mobilização, recombinação, deleção, truncamento e remodelamento das sequências integradas. No conjunto, essas modificações são importantes para aumentar a diversidade genética.

4. A análise da integração do kDNA no *locus* da enzima málica NADP-dependente mitocondrial revelou este *hotspot* eletivo de inserção. Diversas implicações clínicas e fenotípicas podem surgir a partir desta integração. Estudo clínico e bioquímico-molecular genético pode revelar o real significado fisiopatológico desta mutação.

5. A combinação de multiplas integrações em diferentes *loci* foi observada em muitas aves, podendo orquestrar efeito fisiopatológico que não ocorreria em ave com uma ou duas mutações.

VII. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004.

AN C. I.; DONG, Y.; HAGIWARA, N. **Genome-wide mapping of Sox6 binding sites in skeletal muscle reveals both direct and indirect regulation of muscle terminal differentiation by Sox6**. *BMC Developmental Biology*. 11:59, 2011.

ANDERSSON, J. O. **Gene Transfer and Diversification of Microbial Eukaryotes**. *Annual Reviews in Microbiology*. 63: 177-193, 2009

BACOLLA, A.; WOJCIECHOWSKA, M.; KOSMIDER, B.; LARSON, J.E.; WELLS, R.D. **The involvement of non-B DNA structures in gross chromosomal rearrangements**. *DNA Repair (Amst)*. 5(9-10):1161-1170, 2006.

BACON, A.L.; DUNLOP, M.G.; FARRINGTON, S.M. **Hypermutable at a poly(A/T) tract in the human germline**. *Nucleic Acids Res*. 29(21): 4405-13, 2001.

BÁEZ, A.; LO PRESTI, M.S.; RIVAROLA, H.W.; MENTESANA, G.G.; PONS, P.; FRETES, R.; PAGLINI-OLIVA, P. **Mitochondrial involvement in chronic chagasic cardiomyopathy**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. 105(5):239-246, 2011.

BARBOSA, J.F.; BRAVO, J.P.; TAKEDA, K.I.; ZANATTA, D.B.; SILVA, J.L.; BALANI, V.A.; FIORINI, A.; FERNANDEZ, M.A. **Intrinsic bent DNA colocalizes with the sequence involved in the Nd-sD mutation in the Bombyx mori fibroin light chain gene**. *BMB Research*. 41(5):394-399, 2008.

BARRETT, MP; BURCHMORE, RJ; STICH, A; LAZZARI, JO; FRASCH, AC; CAZZULO, JJ; KRISHNA, S. **The trypanosomiases**. *Lancet*. 362(9394): 1469-1480, 2003.

BELANCIO, V. P.; DEININGER, P.L.; ROY-ENGEL, A.M. **LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease.** *Genome Medicine.* 1(10):97, 2009.

BERN, C. **Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease.** *The New England Journal of Medicine.* 364:2527-34, 2011.

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

BISIO, M.; SEIDENSTEIN, M. E.; BURGOS, J.M.; BALLERING, G.; RISSO, M.; PONTORIERO, R.; MOREAU, M.; ALTCHER, J.; LEGUIZAMÓN, M. S.; FREILIJ, H.; MARCEILLAC, M.; SCHIJMAN, A. G. **Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 105(10): 545-549, 2011.

BONNEY, KM; ENGMAN, DM. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?** *Current Molecular Medicine.* 8(6): 510-518, 2008.

BRENER, Z. **Biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Annual Reviews in Microbiology.* 27:347-382, 1973.

BRENER, Z. **Immunity to *Trypanosoma cruzi*.** *Advances in Parasitology.* 18:247-19, 1980.

BROUCQSAULT, N.; MORERE, J.; GAILLARD, M.C.; DUMONCEAUX, J.; TORRENTS, J.; SALORT-CAMPANA, E.; MAUES DE PAULA, A.; BARTOLI, M.; FERNANDEZ, C.; CHESNAIS, A.L.; FERREBOEUF, M.; SARDA, L.; DUFOUR, H.; DESNUELLE, C.; ATTARIAN, S.; LEVY, N.; NGUYEN, K.; MAGDINIER, F.; ROCHE, S. **Dysregulation of 4q35- and muscle-specific genes in fetuses with a short D4Z4 array linked to facio-scapulo-humeral dystrophy.** *Human Molecular Genetics.* 2013

BROWN, W. R.; HUBBARD, S. J.; TICKLE, C.; WILSON, S. A. **The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function.** *Nature Reviews - Genetics*. 4(2):87-98, 2003.

BURELLE, Y.; KHAIRALLAH, M.; ASCAH, A.; ALLEN, B.G.; DESCHEPPER, C.F.; PETROF, B.J.; DES ROSIERS, C. **Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 48(2):310-321, 2010.

BURT, D. W. **Chicken genome: Current status and future opportunities.** *Genome Research*. 15(12):1692-1698.

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.

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.

CHUE, J.; SMITH, C. A. **Sex determination and sexual differentiation in the avian model.** *The FEBS Journal*. 278(7):1027-1034, 2011.

CLINTON, M. **Sex determination and gonadal development: a bird's eye view.** *Journal of Experiment Zoology*. 281(5): 457-465, 1998

COHEN-BARAK, O.; HAGIWARA, N.; ARLT, M.F.; HORTON, J.P.; BRILLIANT, M.H. **Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene.** *Gene*. 265(1-2): 157-164, 2001.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review.** *Acta Tropica*. 115: 5-13, 2010.

COURA, JR; VIÑAS, PA. **Chagas disease: a new worldwide challenge.** *Nature*. 465 (7301): S6-7, 2010.

CROTHERS, D.M.; HARAN, T.E.; NADEAU, J.G. **Intrinsically bent DNA.** *The Journal of Biological Chemistry*. 265(13):7093-7096, 1990.

CUERVO, P.; DOMONT, G.B.; DE JESUS, J.B. **Proteomics of trypanosomatids of human medical importance.** *Journal of Proteomics*. 73(5): 845-867, 2010.

DARWIN, C. **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.** Londres: John Murray, 1859.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J.C. **Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida).** *The International Journal Biochemistry & Cell Biology*. 41(10):2069-80, 2009.

DES ROSIERS, C.; LABARTHE, F.; LLOYD, S.G.; CHATHAM, J.C. **Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought.** *Cardiovascular Research*. 90(2):210-219, 2011.

DIAS, E. **Non-receptivity of the domestic pigeon to the *Schizotrypanum* infection.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 40(2): 191-193, 1944.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S.N. **Acidocalcisomes — conserved from bacteria to man.** *Nature Reviews Microbiology*. 3(3):251-261, 2005.

DRINCOVICH, M.F; CASATI, P.; ANDREO, C. S. **NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways.** *FEBS Letters*. 490(1-2):1-6, 2001.

FASENKO, G. M. **Egg Storage and the Embryo.** *Poultry Science*. 86(5):1020-1024.

FERRAZ, A. S.; FIGUEIREDO, J. F. **Transmission of Chagas' disease through transplanted kidney: occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 35(5):461-3, 1993.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. **Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs.** *Pharmaceutical Research.* 28(11):2758-70, 2011.

FINNEGAN, D. J. **Retrotransposons.** *Current Biology.* 22(11):R432-R437, 2012.

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

GIBALA, M.J.; YOUNG, M.E.; TAEGTMEYER, H. **Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle.** *Acta Physiology Scandinavian.* 168(4):657-665, 2000.

GILBERT, C.; SCHAACK, S.; PACE 2ND, J.K.; BRINDLEY, P.J.; FESCHOTTE, C. **A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla.** *Nature.* 464(7293): 1347-1350, 2010a.

GILBERT, C.; SCHAACK, S.; FESCHOTTE, C. **Quand les éléments génétiques mobiles bondissent entre espèces animales.** *Med Sci (Paris).* 26(12):1025-1027, 2010b.

GIMENES, F.; TAKEDA, K.I.; FIORINI, A.; GOUVEIA, F.S.; FERNANDEZ, M.A. **Intrinsically bent DNA in replication origins and gene promoters.** *Genetic Molecular Research.* 7(2):549-558, 2008.

GOGARTEN, J. P.; DOOLITTLE, W. F.; LAWRENCE, J, G. **Prokaryotic evolution in light of gene transfer.** *Molecular Biology and Evolution.* 19(12):2226-2238, 2002.

GOODIER, J.L.; KAZAZIAN, H. H. JR. **Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites.** *Cell.* 135(1):23-25, 2008.

GOODNOW, C.C. **Multistep pathogenesis of autoimmune disease.** *Cell.* 130(1):25-35, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Heritability of variation.** Nova Iorque: W. H. Freeman, 2000. An Introduction to Genetic Analysis. 7a ed. p. 270.

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

GUTIERREZ, F.R.; GUEDES, P.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite immunology.* 31(11):673-85, 2009.

HAGIWARA, N.; KLEWER, S.E.; SAMSON, R.A.; ERICKSON, D.T.; LYON, M.F.; BRILLIANT, M.H. **Sox6 is a candidate gene for p100H myopathy, heart block, and sudden neonatal death.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(8):4180-4185, 2000.

HAN, J. Y. **Germ cells and transgenesis in chickens.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 32(2):61-80, 2009.

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.

HERWALDT, B. L. **Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures.** *Clinical Microbiology Reviews.* 14(4):659-88, 2001.

HEYNINGEN, V.; YEYATI, P.L. **Mechanims of non-Mendelian inheritance in genetic disease.** *Human Molecular Genetics*. 13(2):R225-R233, 2004.

HSIEH, J. Y.; CHEN, S.H.; HUNG. H.C. **Functional Roles of the Tetramer Organizaton of Malic Enzyme.** *The Journal of Biological Chemistry*. 284(27):18096-105, 2009.

HUSS, J.M.; KELLY, D.P. **Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance.** *The Journal of Clinical Investigation*. 115(3):547-555, 2005.

IAROVAIA OV, BOROUNOVA V, VASSETZKY YS, RAZIN SV. **An unusual extended DNA loop attachment region is located in the human dystrophin gene.** *Journal of Cellular Physiology*. 209(2): 515-521, 2006.

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (ICGSC). **Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution.** *Nature*. 432(7018): 695-716, 2004.

JALKANEN, S.; JALKANEN, M.; GRANFORS, K.; TOIVANEN, P. **Defect in the generation of light-chain diversity in bursectomized chickens.** *Nature*. 311(5981):69-71, 1984.

JOHN, J.; QUINN, T. W. **Recent CR1 non-LTR retrotransposon activity in coscoroba reveals an insertion site preference.** *BMC Genomics*. 9: 567, 2008.

JUNQUEIRA, A.C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi population.** *Trends in Parasitology*. 21(6):270-2, 2005.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D.C.; MELO, M.B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M.M.; GAZZINELLI, R.T. **The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease.** *Expert Reviews in molecular medicine*. 12:e29, 2010.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A. L.; GÖBEL, T. W. F. Avian Innate Immune Responses. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. London: Elsevier, 2008. p. 138-142.

KAISER, P. **Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review**. *Avian Pathology*. 39(5): 309-324, 2010.

KAJIKAWA, M.; YAMAGUCHI, K.; OKADA, N. **A new mechanism to ensure integration during LINE retrotransposition: A suggestion from analyses of the 5' extra nucleotides**. *Gene*. 505(2):345-351, 2012.

KANO, H.; GODOY, I.; COURTNEY, C.; VETTER, M. R.; GERTON, G. L.; OSTERTAG, E.M.; KAZAZIAN H, H, JR. **L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism**. *Genes & Development*. 23(11): 1303-1312, 2009.

KATZ, L. A. **Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:1893-1900, 2002.

KEELING, P. J.; PALMER, J.D. **Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution**. *Nature Reviews - Genetics*. 9(8): 605-618, 2008.

KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZKO, D. B. **Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection**. *Immunology*. 30(1):1-6, 1976.

KIYAMA, R.; TRIFONOV, E.N. **What positions nucleosomes? A model**. *FEBS Letters*. 523(1-3): 7-11, 2002.

KUN, H.; MOORE, A.; MASCOLA, L. STEURER, F.; LAWRENCE, G. KUBAK, B.; RADHAKRISHNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; KUEHNERT, M.; CHAGAS DISEASE IN TRANSPLANT RECIPIENTS INVESTIGATION TEAM. **Transmission of Trypanosoma cruzi by Heart Transplantation**. *Clinical Infectious Diseases*. 48(11): 1534-1540, 2009.

KUSAKABE, T.; SUGIMOTO, Y.; MAEDA, T.; NAKAJIMA, Y.; MIYANO, M.; NISHIKAWA, J.; TONE, S.; KAWAGUCHI, Y.; KOGA, K.; OHYAMA, T. **Linearization and integration of DNA into cells preferentially occurs at intrinsically curved regions from human LINE-1 repetitive element.** *Gene*. 274(1-2):271-281, 2001.

LEON, J.S.; ENGMAN, D.M. **Autoimmunity in Chagas heart disease.** *International Journal of Parasitology*. 31 (5-6):555-561, 2001.

LESCURE, F.X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. **Chagas disease: changes in knowledge and management.** *Lancet Infectious Diseases*. 10(8):556-570, 2010.

LI, X.M.; ONISHI, Y.; KUWABARA, K.; RHO, J.Y.; WADA-KIYAMA, Y.; SAKUMA, Y.; KIYAMA, R. **Ligand-dependent transcriptional enhancement by DNA curvature between two half motifs of the estrogen response element in the human estrogen receptor alpha gene.** *Gene*. 294(1-2):279-290, 2002.

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

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.

LOEBER, G.; MAURER-FOGY, I.; SCHWENDENWEIN, R. **Purification, cDNA cloning and heterologous expression of the human mitochondrial NADP(+)-dependent malic enzyme.** *Biochemistry Journal*. 304: 687-692, 1994.

LUNDQVIST, M. L.; MIDDLETON, D. L.; RADFORD, C.; WARR, G. W.; MAGOR, K. E. **Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck.** *Developmental & Comparative Immunology*. 30 (1-2): 93-100, 2006.

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

MANSIKKA, A.; SANDBERG, M.; LASSILA, O.; TOIVANEN, P. **Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America.* 87(23): 9416-9420, 1990.

MILOT, E.; BELMAAZA, A.; WALLENBURG, J.C.; GUSEW, N.; BRADLEY, W.E.; CHARTRAND, P. **Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements.** *EMBO J.* 11(13):5063-5070, 1992.

MOSSEY, P. A. **The heritability of malocclusion: Part 1--Genetics, principles and terminology.** *British Journal of Orthodontics.* 26(2): 103-113, 1999.

MYLER, P. J. **Molecular variation in trypanosomes.** *Acta Tropica.* 53(3-4):205-225, 1993.

NACHURY, M. V.; LOKTEV, A. V.; ZHANG, Q.; WESTLAKE, C. J.; PERÄNEN, J.; MERDES, A.; SLUSARSKI, D.C.; SCHELLER, R.H.; BAZAN, J. F.; SHEFFIELD, V. C.; JACKSON, P.K. **A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis.** *Cell.* 129(6):1201-13, 2007.

NAKAMURA, Y.; KAGAMI, H.; TAGAMI, T. **Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells.** *Development, Growth and Differentiation.* 55(1): 20-40, 2013.

NICKEL, A.; LÖFFLER, J.; MAACK, C. **Myocardial energetics in heart failure.** *Basic Research in Cardiology.* 108(4): 358, 2013.

NITZ, N; GOMES, C; ROSA, AC; D'SOUZA-AULT, MR; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, RJ; TEIXEIRA, ARL. **Hereditary integration of kDNA minicircles sequences from Trypanosoma cruzi into avian genome: Insight into Human Chagas Disease.** *Cell.* 118(2): 175-186, 2004.

NOAH, J.W.; PARK, S.; WHITT, J.T.; PERUTKA, J.; FREY, W.; LAMBOWITZ, A.M. **Atomic force microscopy reveals DNA bending during group II intron ribonucleoprotein particle integration into double-stranded DNA.** *Biochemistry.* 45(41):12424-12435, 2006.

PALIN AH, CRITCHER R, FITZGERALD DJ, ANDERSON JN, FARR CJ. **Direct cloning and analysis of DNA sequences from a region of the Chinese hamster genome associated with aphidicolin-sensitive fragility.** *Journal of Cellular Science.* 111 (12):1623-1634, 1998.

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

PRADO, CM; CELES, MR; MALVESTIO, LM; CAMPOS, EC; SILVA, JS; JELICKS, LA; TANOWITZ, HB; ROSSI, MA. **Early dystrophin disruption in the pathogenesis of experimental chronic Chagas cardiomyopathy.** *Microbes Infect.* 14(1): 59-68, 2012.

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

QURESHI, M.A. **Avian macrophage and immune response: an overview.** *Poultry Science.* 82(5):691-698, 2003

RAHIMOV, F.; KUNKEL, L.M. **The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy.** *Journal of Cell Biology.* 201(4):499-510, 2013.

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

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).** *Infectious Disease Clinics of North America.* 26:275-291, 2012.

ROGERS, SL; VIERTLBOECK, BC; GÖBEL, TW; KAUFMAN, J. **Avian NK activities, cells and receptors.** *Seminars in Immunology.* 20(6): 353-360, 2008.

SALAMANCA-DEJOUR, D.; BLANCHET, D.; AZNAR, C.; LA RUCHE, G.; JEANNEL, D.; GASTELLU-ETCHEGORRY, M. **La maladie de Chagas (ou trypanosome américaine) en France.** *Médecine et maladies infectieuses.* 42(8):344-8, 2012.

SANTOS-BUCH, C.A.; TEIXEIRA, A.R.L. **The immunology of Experimental Chagas Disease III. Rejection of Allogeneic Heart Cells in Vitro.** *Journal of Experimental Medicine.* 140 (1): 38-53, 1974.

SCHMUNIS, G.A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 102 Suppl 1: 75-85

SHAPIRA, E.; YARUS, S.; FAINSOD, A. **Genomic organization and expression during embryogenesis of the chicken CR1 repeat.** *Genomics.* 10(4):931-939, 1991.

SHANMUGASUNDARAM, R.; SELVARAJ, R. K. **Regulatory T Cell Properties of Chicken CD4+CD25+ Cells.** *Journal of Immunology.* 186(4):1997-2002, 2011.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. **The structure and replication of kinetoplast DNA.** *Annual Reviews in Microbiology.* 49:117-43, 1995.

SHARMA, J. M. **Overview of the avian immune system.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 30(1): 13-17, 1991.

SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA,AM;
JARAMILLO; CURA, C; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.;
DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R.H.; VELAZQUEZ, E.;
TELLEZ, T.; SANCHEZ LEON, Z.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; MONJE RUMI, M.;
LEVI, J.E.; RAMIREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE,
G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A.M., GONZALEZ, C.I.; ACOSTA VIANA, K.;
YACHELINI, P., TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA CHAVEZ, O.;
AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA E. S.;
DASILVA, A; BRITTO, C.; LUQUETTI, A; LADZINS, J. **International Study to
Evaluate PCR Methods for Detection of Trypanosoma cruzi DNA in Blood
Samples from Chagas Disease Patients.** *PLoS Negl Trop Dis.* 5(1):e931, 2011.

SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A.M.; NITZ, N.; ARGAÑARAZ, E.R.; TEIXEIRA,
A.R. **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.* 1: 249-252, 1994.

SIMÕES-BARBOSA, A; ARGARNARAZ, ER; BARROS, AM; ROSA, AC; ALVES,
NP; LOUVANDINI, P; D'SOUZA-AULT, MR; NITZ, N; STURM, NR; NASCIMENTO,
RJ; TEIXEIRA, AR. **Hitchhiking Trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene
expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem. Inst. Oswaldo
Cruz.* 101(8): 833-43, 2006.

SMITH, C. A.; SINCLAIR, A. H. **Sex determination: insights from the chicken.**
Bioessays. 26(2):120-132, 2004.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genes in pedigrees.** New York: Wiley-Liss,1999.
Human Molecular Genetics, 2a ed. p. 61-82.

TAEGMTMEYER, H.; GOLFMAN, L.; SHARMA, S.; RAZEGHI, P.; VAN ARSDALL, M.
**Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and
diseased heart.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1015:202-213, 2004.

TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P. **Chagas Disease has now gone global.** *PloS Neglected Tropical Diseases*. 5(4): e1136, 2011.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. **Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence?** *Parasitology Today*. 15(3): 94-99, 1999.

TEIXEIRA, A. R.; LACAVALA, Z.; SANTANA, J. M.; 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, ARL; ARGANÁRAZ, ER; FREITAS, JR; LAÇAVA, ZGM; SANTANA, JM; LUNA, H. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mutation Research*. 305: 197-209, 1994.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. **Chagas Disease.** *Postgraduate Medical Journal*. 82(974): 788-798, 2006

TEIXEIRA, A.R., NITZ, N., BERNAL, F.M., HECHT, M.M. **Parasite induced genetically driven autoimmune Chagas heart disease in the chicken model.** *J Vis Exp*. (65):3716, 2012.

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 Neglected Tropical Diseases*. 5(3): e1000, 2011a.

TEIXEIRA, A.R.L.; HECHT, M.M.; GUIMARO, M.C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity.** *Clinical Microbiology Reviews*. 24(3):592-630, 2011b.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P.H.; SOUZA, W. **Atlas didático Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.** Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011. 1 ed.

THALER, D. S. **The cytoplasmic structure hypothesis for ribosome assembly, vertical inheritance, and phylogeny.** *Bioessays*. 31(7):774-783, 2009.

THOMAS, J.; SCHAACK, S.; PRITHAM, E. J. **Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals.** *Genome Biology and Evolution*. 2: 656-664, 2010.

THOMAS, M. C.; MACIAS, F.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M. C. **The biology and evolution of transposable elements in parasites.** *Trends in Parasitology*. 26(7):350-362, 2010.

TIGHE P.J.; STEVENS, S.E.; DEMPSEY, S.; LE DEIST, F.; RIEUX-LAUCAT, F.; EDGAR, J.D. **Inactivation of the Fas gene by Alu insertion: retrotransposition in an intron causing splicing variation and autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Genes Immunology*. 3Suppl1:S66-70, 2002.

TORRES, C. M. **Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas.** *Soc. Argent. Patol. Reg. Norte Quinta Reun.* 2:902, 1930.

VAINIO, O.; IMHOF, B. A. **The immunology and developmental biology of the chicken.** *Immunology Today*. 16(8):365-370, 1995.

VLAHOVICEK, K.; KAJAN, L.; PONGOR, S. **DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS.** *Nucleic Acids Res.* 31(13):3686-7, 2003.

WALLAU, G. L.; ORTIZ, M. F.; LORETO, E. L. **Horizontal Transposon Transfer in Eukarya: Detection, Bias, and Perspectives.** *Genome Biology and Evolution*. 4(8): 689-699, 2012.

WENDEL, S. **Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control?** *Acta Tropica*. 115(1-2): 28-34, 2010.

WICKER T.; ROBERTSON, J. S.; SCHULZE, S. R.; FELTUS, F. A.; MAGRINI, V.; MORRISON, J. A.; MARDIS, E. R.; WILSON R. K.; PETERSON, D. G.; PATERSON, A. H.; IVARIE, R. **The repetitive landscape of the chicken genome.** *Genome Research*. 15(1): 126-136, 2005.

WELLS, R.D.; DERE, R.; HEBERT, M.L.; NAPIERALA, M.; SON, L.S. **Advances incmechanisms of genetic instability related to hereditary neurological disease.** *Nucleic Acids Res*. 33(12): 3785-98, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** *WHO, Geneva, Switzerland*, 2010.

YOSHIDA, N. **Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity.** *Parasitology International*. 57(2): 105-109, 2008.

VIII. ANEXO I

Tabela A1. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi*.

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromos- somo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|----------------|-------|----------|--------------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------|---|----------------|------------|
| 1 | K1-527(F0) | EG13 | 415-742 | 1-449 | TATAATGTACGGGTGAGATGC | 3e-20 | 5 | NW_003763785.1 (Fator de transcrição SOX-6) | 0.0 | 98% |
| | | EG14 | 185-470 | 1-197 | GACGCCCCCTCCC | 2e-140 | 2 | NW_003763668.1 (Proteína PTHB1) | 2e-84 | 95% |
| | | EG15 | 189-468 | 1-197 | CCCCCTCCC | 9e-09 | 2 | NW_003763668.1 (Proteína PTHB1) | 2e-77 | 92% |
| | | EG16 | 173-459 | 1-185 | GACGCCCCCTCCC | 3e-139 | 3 | NW_001471668.2 (Provavel palmitoiltranserase ZDHHC14 isoforma 1 ou 2) | 2e-84 | 98% |
| | | EG18 | 76-130 | 1-104 | ACCAATTTACATCACAACCCAAAC CCAT | 7e-19 | 4 | NW_003763735.1 (Indeterminado) | 3e-31 | 91% |
| | | EG21 | 53-346 | 1-63 | AAGACCGCCCC | 3e-137 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 9e-24 | 98% |
| 1 | K1-583(F1) | EG22 | 1-62 | 53-323 | CAATCGAACC | 5e-20 | 1 | NW_003763650.1 (Teneurina-4) | 2e-125 | 98% |
| | | EG25 | 1-73 | 53-153 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 2e-20 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 2e-33 | 96% |
| 1 | K1-207(F1) | EG211 | 1-250 | 233-393 | ACCAACCCCAATCGAACC | 3e-67 | 3 | NW_001471673.2 (Indeterminado) | 6e-71 | 98% |
| | | EG214 | 1-192 | 178-260 | GTACGGGTGAGATGC | 9e-79 | 1 | NW_003763482.1 (Indeterminado) - 684pb próx a protease serina 6 transmembrana 6 | 5e-25 | 92% |
| 1 | K1-224(F1) | EG33 | 117-185 | 1-127 | TACACCAACCC | 7e-16 | Ind | NW_003771790.1 (Indeterminado) | 2e-41 | 91% |
| | | EG35 | 1-245 | 222-514 | GTCGAACGCCCTCCCAAAACCAA | 4e-144 | 15 | NW_003763985.1 (Indeterminado) | 3e-121 | 99% |
| 1 | K1-202 (F1) | EG11 | 898-1241 | 1-914 | GAACCCCCCTCCCAAAA | 3e-75 | Ind | NW_003780056.1 (Indeterminado) | 0.0 | 97% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|----------------|-------|---------|--------------------------|---|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| 1 | K1-202 (F1) | EG12 | 108-810 | 1-121 | CCCTTCCCAAACC | 1e-86 | 14 | NW_001471454.1 Gga_WGA202_2 (Similar à proteína KIAA1691) | 3e-40 | 98% |
| | | EG45 | 1-79 | 58-167 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 7e-14 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 4e-37 | 92% |
| | | EG48 | 1-83 | 63-583 | ACCAACCCCAATCGAACCCCA | 1e-23 | 3 | NW_001471673.2 (Indeterminado) | 0.0 | 99% |
| | | EG51 | 1-83 | 55-125 | ACCATAACACCAACCCCAATCGAA CCCCA | 3e-24 | 28 | NW_003764302.1 (Indeterminado) | 3e-06 | 92% |
| | | EG53 | 1-141 | 107-293 | AATATAACTCTAATTACACCAACCC CAATCGAACC | 2e-42 | 2 | AB556723.1 (Sequência repetitiva do centrômero) | 4e-90 | 97% |
| 1 | K1-603 (F2) | EG38 | 263-556 | 1-286 | CTGAACCCCCCTCCCAAACCGCA | 5e-143 | 2 | NW_003763673.1 (Indeterminado) | 3e-120 | 94% |
| | | EG40 | 153-444 | 1-162 | GAACGCCCT | 1e-143 | 6 | NW_003763812.1 (Similar a atractina 1, isoforma 2) | 9e-76 | 99% |
| | | EG42 | 58-350 | 1-73 | TGAAAGCCCCCTCCCAA | 5e-147 | 1 | NW_003763464.1 (Indeterminado) | 5e-21 | 90% |
| | | EG43 | 1-39 | 39-330 | G | 7e-145 | 4 | NW_003763735.1 (Indeterminado) | 2e-12 | 94% |
| | | EG44 | 299-600 | 1-321 | CAGGAACGATGAAGCCCCCTCCC | 8e-147 | 6 | NW_003763812.1 (Indeterminado) | 3e-152 | 98% |
| 1 | K1-884 (F2) | EG62 | 1-284 | 272-684 | CCCAATCGAACC | 2e-04 | 17 | NW_003764074.1 (Adenilato quinase 8) | 0.0 | 98% |
| | | EG65 | 1-169 | 153-348 | CCAACCCCAATCGAACC | 6e-57 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 1e-91 | 98% |
| | | EG66 | 1-276 | 267-391 | CAATCGAACC | 2e-70 | 5 | NW_003763785.1 (Tetraspanina 18) | 9e-56 | 99% |
| 1 | K1-638 (F2) | EG68 | 115-400 | 1-124 | GAACCCCCCT | 2e-140 | 13 | NW_003763912.1 (Indeterminado) | 1e-40 | 91% |
| | | EG70 | 132-417 | 1-140 | GACCCCCC | 2e-140 | Ind | BX640540.3 (Indeterminado) | 6e-39 | 86% |
| | | EG71 | 399-688 | 1-420 | GAACGCCCTCCCAAACCAAA | 6e-137 | 25 | NW_003764242.1 (Indeterminado) | 0.0 | 97% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|-----------------|-------|---------|--------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| 1 | K1-636(F2) | EG73 | 78-177 | 1-95 | GAAGGCCCTCCAAAAC | 5e-29 | 14 | NW_003763931.1 (xilosiltransferase 1) | 1e-31 | 93% |
| | | EG74 | 204-284 | 1-210 | CATAATG | 4e-27 | 2 | NW_003763661.1 (Indeterminado) | 1e-103 | 100% |
| 1 | K1-616 (F2) | EG76 | 1-201 | 91-300 | TACACCAACCCCAATCGAACC | | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 3e-35 | 91% |
| | | EG77 | 1-258 | 238-337 | TACACCAACCCCAATCGAACC | Reg variavel | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 1e-35 | 94% |
| | | EG78 | 1-278 | 267-433 | CCCAATCGAACC | 9e-126 | 2 | NW_003763680.1 (Similar a proteína tirosina fosfatase mu semelhante a receptores) | 1e-74 | 98% |
| | | EG82 | 39-326 | 1-49 | GACGGCCCTC | 1e-140 | 4 | NW_003763735.1 (Indeterminado) | 2e-12 | 94% |
| | | EG83 | 264-551 | 1-277 | GAACGCCCTCCCA | 2e-141 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 2e-135 | 99% |
| | | EG84 | 30-317 | 1-37 | GAAGGCC | 1e-141 | 5 | NW_003763748.1 (Indeterminado) | 2e-07 | 97% |
| 1 | K1- 652 (F2) | EG87 | 1-607 | 588-637 | ACACCAACCCCAACGAACC | 0.0 | 1 | NW_003763496.1 (Indeterminado) | 5e-05 | 86% |
| | | EG92 | 1-150 | 146-798 | ATGCA | 8e-54 | 3 | NW_001471673.2 (Peptodil-prolil cis-trans isomerase FKBP1B) | 0.0 | 98% |
| | | EG93 | 1-265 | 237-666 | GATACACATACACCAACCCCAATC GAACC | 7e-104 | 17 | NW_003764074.1 (Adenilato quinase 8) | 0.0 | 96% |
| | | EG94 | 1-433 | 417-624 | CCAACCCCAATCGAACC | 3e-171 | 5 | NW_003763785.1 (Inositol-trifosfatase 3-quinase A) | 4e-94 | 97% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | Locus | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|---------------|-------|---------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG97 | 141-405 | 1-159 | GACCCCCCTCCCAAACC | 1e-105 | 1 | NW_001471534.2 (Piruvato dehidrogenase (lipoamido) quinase, isoenzima 3, mitocondrial) | 1e-67 | 96% |
| 2 | K1- 581 (F0) | EG98 | 151-757 | 1-169 | GACGCCCCCTCCCAAACC | 0.0 | Ind | NW_003776158.1 (Indeterminado) | 1e-51 | 88% |
| | | EG100 | 1-98 | 79-272 | CAACCCCAATCGAACCCACC | 1e-33 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 1e-89 | 98% |
| | | EG102 | 1-39 | 16-105 | AACCATAATGTACGGGTGAGATGC | 9e-10 | 1 | NW_003763482.1 (Indeterminado) - 684pb próx a protease serina 6 transmembrana | 2e-25 | 92% |
| | | EG103 | 1-241 | 224-419 | CCAACCCCAATCGAACCC | 6e-71 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 2e-90 | 98% |
| 2 | K1- 8378 (F1) | EG104 | 1-130 | 120-219 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 6e-53 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 2e-36 | 92% |
| | | EG105 | 1-201 | 195-296 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-71 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 2e-36 | 94% |
| | | EG107 | 1-130 | 120-295 | CCATCGAACC | 3e-53 | 2 | NW_003763680.1 (Similar a proteína tirosina fosfatase mu semelhante a receptores) | 3e-73 | 97% |
| | | EG108 | 1-150 | 134-683 | CCAACCCCAATCGAACC | 9e-46 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 0.0 | 99% |
| | | EG112 | 1-264 | 242-437 | CCAACCCCAATCGAACCCACCAT | 4e-79 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 2e-91 | 98% |
| | | EG114 | 1-216 | 200-395 | CCAACCCCAATCGAACC | 1e-72 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 1e-91 | 98% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|-----------------|-------|---------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG115 | 1-283 | 269-351 | GTACGGGTGAGATGC | 5e-109 | 1 | NW_003763482.1 (Indeterminado) - 684pb próx a protease serina 6 transmembrana 6 | 7e-25 | 92% |
| 2 | K1- 454 (F1) | EG125 | 1-158 | 141-250 | TACACCAACCCCAATCGA | | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 1e-33 | 90% |
| | | EG127 | 1-265 | 249-244 | CCAACCCCAATCGAACC | 1e-41 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 2e-90 | 98% |
| 2 | K1- 669 (F1) | EG116 | 31-308 | 1-38 | CCCCTCCC | 2e-133 | 4 | NW_003763740.1 (Indeterminado) | 8e-05 | 89% |
| | | EG117 | 303-585 | 1-315 | GACGCCCTCCC | 1e-138 | 1 | NW_003763493.1 (Indeterminado) | 2e-143 | 96% |
| | | EG118 | 36-318 | 1-43 | GACGGCCC | 2e-05 | 27 | NW_003764296.1 (Canal de cátion 1, sensível a amilorida, neuronal) | 2e-11 | 98% |
| | | EG119 | 74-346 | 1-82 | GAACGCCCTCCCAAACC | 3e-137 | 21 | NW_003764143.1 (Citidina desaminase) | 1e-27 | 96% |
| | | EG120 | 278-533 | 1-277 | GAACGCCCTCCCA | 3e-97 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 7e-132 | 98% |
| | | | 835-927 | 522-846 | GGGAGAAGAGTT GACGCCCTCCC | 1e-32 | 6 | NW_003763812.1 (Indeterminado) | 1e-154 | 98% |
| | | EG121 | 43-318 | 1-45 | TCC | 7e-62 | 5 | NW_003763748.1 (Indeterminado) | 0.012 | 83% |
| 2 | K1-618 | EG215 | 1-179 | 173-431 | GAGATGC | 9e-50 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 9e-50 | 100% |
| | | EG217 | 1-102 | 99-755 | ATGC | 1e-25 | 3 | NW_001471673.2 (Peptodil-prolil cis- trans isomerase FKBP1B) | 0.0 | 98% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromos- somo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|--------|-------|---------|------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|--|----------------|------------|
| | | EG218 | 1-265 | 246-297 | ACCAACCCCAATCGAACCC | 5e-127 | Z | NW_001488830.2 (Succinil-CoA: 3- cetoácido- coenzima A transferase 1, mitocondrial) | 1e-08 | 87% |
| | | EG222 | 1-442 | 422-786 | TATAATGTACGGGGGAGATGC | 2e-98 | 5 | NW_003763785.1 (Fator de transcrição SOX-6) | 0.0 | 97% |
| 2 | K1-844 | EG177 | 264-554 | 1-277 | GAACCCCTCCCA | 2e-117 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 3e-134 | 99% |
| | | EG179 | 383-494 | 1-104 | TATAATGTACGGGTGAGATGCA | 7e-39 | 3 | NW_001471673.2 | 0.0 | 98% |
| | | EG180 | 1-76 | 58-172 | GCAGATAATGTACGGGTGA | 3e-45 | 11 | NW_003763881.1 (Preproteína colagenase tipo IV 72kDa) | 1e-23 | 92% |
| 2 | K1-853 | EG229 | 1-296 | 279-475 | CCAACCCCAATCGAACCC | 7e-134 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 7e-90 | 98% |
| | | EG233 | 1-84 | 85-273 | TCC | 4e-24 | 12 | NW_003763903.1 (Proteína não caracterizada LOC416093) | 1e-12 | 72% |
| | | | 271-347 | | | 3e-26 | | | | |
| 2 | K1-661 | EG130 | 101-392 | 1-112 | GAAGCCCCTCC | 8e-145 | 1 | NW_003763482.1 (Indeterminado) | 1e-47 | 98% |
| | | EG132 | 98-387 | 1-104 | GACCGCC | 1e-141 | 5 | NW_001471710.2 (RAC-alfa proteína serina/treonina quinase) | 2e-44 | 99% |
| | | EG133 | 264-555 | 1-277 | GAACGCCCTCCCA | 1e-143 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 3e-134 | 99% |
| | | EG134 | 265-556 | 1-286 | GAAGCCCCTCCAAAACCACA | 1e-144 | 2 | NW_003763673.1 (Indeterminado) | 8e-128 | 96% |
| | | EG135 | 62-353 | 1-74 | GAAGCCCCTCCC | 9e-144 | 9 | NW_001471743.2 (Proteína não caracterizada LOC769332) | 2e-25 | 96% |
| | | EG136 | 362-653 | 1-369 | GAAGCCCC | 4e-145 | 4 | NW_003763739.1 (Indeterminado) | 0.0 | 99% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | Locus | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|--------|-------|---------|--------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG193 | 52-343 | 1-59 | GAAGGCC | 2e-138 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 3e-17 | 93% |
| | | EG194 | 175-463 | 1-180 | GAACCC | 9e-139 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 4e-87 | 100% |
| 2 | k1-633 | EG139 | 68-417 | 1-91 | CACATAATGTACGGGGGAGATGCA | 5e-09 | 15 | NW_001471461.2 (Indeterminado) | 2e-33 | 97% |
| | | EG140 | 235-526 | 1-253 | GAACGCCCTCCCAAACC | 1e-144 | 15 | NW_003763985.1 (Indeterminado) | 1e-119 | 98% |
| | | EG141 | 382-673 | 1-397 | GAAGGCCCTCCCAA | 1e-144 | Z | NW_003764323.1 (Indeterminado) | 0.0 | 97% |
| | | EG142 | 394-690 | 1-414 | TTTGCGAAGGCCCTCCCAA | 2e-143 | 11 | NW_003763865.1 (Indeterminado) | 0.0 | 98% |
| | | EG143 | 268-559 | 1-285 | GACCCCCCTCCAAAAC | 1e-143 | 2 | NW_003763664.1 (Indeterminado) | 6e-136 | 98% |
| | | EG144 | 382-673 | 1-397 | GAAGGCCCTCCCAA | 3e-140 | Z | NW_003764324.1 (Indeterminado) | 0.0 | 96% |
| | | EG145 | 620-911 | 1-638 | GAAGGCCCTCCAAAAC | 3e-143 | 2 | NW_003763668.1 (E3 ubiquitina proteína ligase HECW1) | 0.0 | 96% |
| | | EG148 | 404-695 | 1-421 | GAACGCCCTCCAAAAC | 2e-143 | 1 | NW_003763449.1 (Indeterminado) | 0.0 | 95% |
| | | EG195 | 156-447 | 1-164 | GACGGCCCC | 9e-145 | 1 | NW_003763484.1 (Indeterminado) | 4e-74 | 98% |
| | | EG196 | 264-555 | 1-277 | GAAGGCCCTCCCA | 3e-139 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 2e-135 | 99% |
| 2 | K1-647 | EG164 | 1-149 | 129-238 | TACACCAACCCAATCGAACC | | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 2e-35 | 91% |
| | | EG166 | 1-130 | 110-219 | TACACCAACCCAATCGAACC | 2e-54 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 2e-36 | 92% |
| | | EG168 | 1-100 | 85-704 | GTACGGGGGAGATGCA | 5e-30 | 12 | NW_003763903.1 (forkhead box protein P1) | 0.0 | 98% |
| | | EG173 | 68-250 | 1-93 | CACATAATGTACGGGTGAGATGCA TG | 2e-80 | 15 | NW_001471461.2 (Indeterminado) | 1e-33 | 96% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|--------|-------|---------|--------------------------|---|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG175 | 256-465 | 1-289 | TAGCACAATCCGACCCCCCTCCC AAAAC | 4e-80 | 2 | NW_003763664.1 (Indeterminado) | 9e-133 | 98% |
| | | EG176 | 1-100 | 93-344 | GAGATGCT | 1e-34 | 20 | NW_003764128.1 (Indeterminado) | 3e-119 | 98% |
| 2 | k1-654 | EG149 | 185-476 | 1-197 | GACGCCCCCTCCC | 5e-142 | 2 | NW_003763668.1 (Proteína PTHB1) | 2e-89 | 97% |
| | | EG152 | 49-385 | 1-97 | GAACCTCCCCTGGCACAACCTTCAA CCATCACCTCTCCTTCTGTTGCTG | 2e-122 | Z | NW_003764322.1 (Indeterminado) | 2e-32 | 93% |
| | | EG153 | 185-474 | 1-197 | GACGCCCCCTCCC | 1e-142 | 2 | NW_003763668.1 (Proteína PTHB1) | 1e-86 | 96% |
| 2 | k1-672 | EG156 | 1-109 | 76-281 | CACCAACCCCAATCGAACCGTTTT CTCCCCTAAA | 7e-30 | Ind | NW_003779328.1 (Indeterminado) | 2e-93 | 97% |
| | | EG157 | 1-111 | 99-515 | CCCCAATCGAACC | 2e-21 | 17 | NW_003764074.1 (Adenilato quinase 8) | 0.0 | 97% |
| | | EG158 | 1-197 | 194-599 | ACCA | 5e-49 | 17 | NW_003764074.1 (Adenilato quinase 8) | 0.0 | 98% |
| | | EG160 | 629-827 | 1-641 | GAAGCCCCCTCCC | 4e-77 | 13 | NW_003763913.1 (Carreador de soluto família 25 membro 48) | 0.0 | 97% |
| | | EG161 | 427-675 | 1-533 | ATAATG | 3e-39 | 9 | NW_001471743.2 (Indeterminado) | 0.0 | 99% |
| | | EG163 | 160-308 | 1-163 | CATA | 2e-38 | 1 | NW_001471534.2 (Piruvato dehidrogenase (lipoamido) | 8e-68 | 96% |
| | | EG199 | 1-42 | 33-276 | GAGATGCATA | 3e-09 | 2 | quinase, isoenzima 3, mitocondrial) | | |
| | | EG238 | 1-276 | 255-365 | CTACACCAACCCCAATCGAACC | 5e-46 | 1 | NW_003763661.1 (Indeterminado) | 1e-116 | 98% |
| 2 | K1-686 | EG238 | 1-276 | 255-365 | CTACACCAACCCCAATCGAACC | 5e-46 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 3e-36 | 92% |
| | | EG244 | 1-133 | 117-667 | CCAACCCCAATCGAACC | 5e-49 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 0.0 | 99% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromos- somo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|---------|-------|---------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------|---|----------------|------------|
| 2 | k1- 630 | EG204 | 1-200 | 183-274 | ACCAACCCCAATCGAACC | | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 3e-34 | 96% |
| | | EG253 | 1-132 | 112-307 | CCAACCCCAATCGAACCACC | 3e-35 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 1e-90 | 98% |
| | | EG254 | 1-150 | 139-673 | GGGTGAGATGCA | 4e-60 | 2 | NW_003763693.1 (Proteína tirosina fosfatase tipo IVA 3 isoforma 1) | 2e-114 | 99% |
| 2 | K1-759 | EG182 | 185-314 | 1-197 | GACGCCCCCTCCC | 1e-51 | 2 | NW_003763668.1 (Proteína PTHB1) | 2e-89 | 97% |
| | | EG184 | 318-448 | 1-329 | GAAGGCCCCCTC | 5e-53 | 20 | NW_003764126.1 (Proteína tipo retinoblastoma 1) | 1e-156 | 98% |
| | | EG186 | 121-425 | 1-123 | AAC | 4e-67 | Z | NW_003764319.1 (Indeterminado) | 3e-06 | 71% |
| 2 | K1-760 | EG187 | 1-339 | 318-416 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 2e-97 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 1e-34 | 94% |
| | | EG189 | 1-285 | 265-374 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 5e-141 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 3e-36 | 92% |
| 3 | k1-308 | EG257 | 1-187 | 180-224 | TGAGATGC | 6e-74 | 1 | NW_003763650.1 (Indeterminado) | 8e-09 | 91% |
| | | EG260 | 1-279 | 262-480 | CCAACCCCAATCGAACCA | 2e-108 | 2 | NW_003763686.1 (Indeterminado) | 7e-90 | 93% |
| | | EG263 | 1-543 | 525-728 | CACCAACCCCAATCGAACC | 2e-75 | Ind | NW_003779328.1 (Indeterminado) | 1e-83 | 94% |
| 3 | K1-667 | EG265 | 1-304 | 275-387 | TACACCAACCCCAATCGAACCTA ACCACC | 1e-117 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 2e-32 | 89% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|--------|-------|---------|--------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG266 | 1-167 | 146-258 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-44 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP- dependente, mitocondrial) | 6e-37 | 92% |
| | | EG269 | 1-716 | 697-832 | ATAATGTACGGGGGAGATGC | 0.0 | 1 | NW_003763650.1 (Fator de crescimento D derivado de plaqueta) | 4e-52 | 96% |
| 3 | k1-690 | EG276 | 1-280 | 272-386 | TGAGATGCA | 9e-77 | 1 | NW_003763584.1 (Indeterminado) | 2e-44 | 97% |
| | | EG277 | 1-333 | 325-431 | TGAGATGCA | 3e-76 | 1 | NW_003763584.1 (Indeterminado) | 1e-45 | 98% |
| | | EG278 | 1-217 | 220-744 | | 4e-70 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 0.0 | 98% |
| | | EG279 | 1-588 | 573-655 | GTACGGGTGAGATGC | 6e-124 | 1 | NW_003763482.1 (Indeterminado) - 684pb próx a protease serina 6 transmembrana 6 | 2e-23 | 90% |
| | | EG283 | 156-522 | 1-162 | GAAGGCC | 3e-83 | 1 | NW_003763484.1 (Indeterminado) | 3e-20 | 92% |
| 3 | K1-765 | EG285 | 1-150 | 142-248 | TGAGATGC | 8e-54 | 1 | NW_003763584.1 (Indeterminado) | 4e-45 | 98% |
| | | EG286 | 1-90 | 72-627 | CCAACCCCAATCGAACCAA | 2e-29 | 5 | NW_003763785.1 (Indeterminado) | 0.0 | 93% |
| | | EG289 | 98-152 | 1-106 | TGCATCTCA | 2e-15 | 1 | NW_003763584.1 (Indeterminado) | 4e-42 | 95% |
| | | EG291 | 1-105 | 88-283 | CCAACCCCAATCGAACCC | 1e-39 | 9 | NW_003763840.1 (Indeterminado) | 1e-91 | 98% |
| | | EG292 | 1-219 | 202-436 | ACTCACTTCTCACTTCCTCCCTTCC C | 2e-78 | 12 | NW_003763903.1 (Proteína não caracterizada LOC416093) | 1e-12 | 70% |
| | | | 437-550 | 537-593 | TCTCACTTNCTCCC | 2e-10 | 15 | NW_001471461.2 (citospina-A) | 6e-09 | 93% |

| Familia | Ave | Clone | kDNA | <i>Gallus Gallus</i> DNA | Micro-homologia | KDNA <i>E-value</i> | Cromosomo | <i>Locus</i> | <i>E-value</i> | Identidade |
|---------|---------|-------|---------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-----------|---|----------------|------------|
| | | EG294 | 1-80 | 81-170 | CCCTCCC | 8e-27 | Z | NW_003764324.1 (Indeterminado) | 0.26 | 70% |
| | | | 164-379 | 380-501 | CCCTCCC | 1e-80 | Z | NW_003764324.1 (Indeterminado) | 1e-05 | 71% |
| | | | 495-564 | | | | | | | |
| 3 | K1- 880 | EG295 | 1-285 | 263-340 | CCTACACCAACCCCAATCGAACC | 3e-137 | 20 | NW_003764128.1 (Indeterminado) | 7e-25 | 94% |
| | | EG298 | 1-150 | 135-212 | CAACCCCAATCGAACC | 5e-43 | 20 | NW_003764128.1 (Indeterminado) | 5e-24 | 92% |
| | | EG299 | 304-610 | 1-317 | GAACGCCCTCCCA | 4e-06 | 20 | NW_003764127.1 (Indeterminado) | 5e-157 | 99% |
| | | EG300 | 252-381 | 1-265 | GAAGCCCCCTCCCA | 6e-47 | 12 | NW_003763892.1 (Indeterminado) | 2e-127 | 98% |
| | | EG301 | 1-290 | 285-456 | ATAATG | 3e-46 | 1 | NW_003763650.1 (Indeterminado) | 5e-142 | 99% |
| | | EG302 | 1-160 | 142-373 | GACCCCCCTCCCAAACC | 9e-26 | 1 | NW_001471534.2 (Piruvato dehidrogenase (lipoamido) quinase, isoenzima 3, mitocondrial) | 1e-67 | 96% |
| | | EG304 | 142-320 | 1-152 | GACGCCCTC | 7e-44 | 1 | NW_001471534.2 (Piruvato dehidrogenase (lipoamido) quinase, isoenzima 3, mitocondrial) | 9e-49 | 87% |

IX. ANEXO II

Tabela A2. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no locus NADPME

| Familia | Ave | Clone | kDNA | Gallus Gallus DNA | Micro-homologia | KDNA E-value | Cromosomo | Locus | E-value | Identidade |
|---------|------------|--------|-------|-------------------|------------------------|--------------|-----------|--|---------|------------|
| 1 | K1-527(F0) | ENG 65 | 1-720 | 699-1275 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 0.0 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 66 | 1-477 | 456-963 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 2e-35 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 67 | 1-309 | 292-793 | ACCAACCCCAATCGAACC | 1e-128 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 97% |
| 1 | K1-207(F1) | ENG 11 | 1-328 | 292-794 | ACCAACCCCAATCGAACC | 7e-131 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 12 | 1-265 | 244-749 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 4e-102 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 97% |
| 1 | K1-224(F1) | ENG 15 | 1-250 | 229-735 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-102 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 16 | 1-247 | 239-744 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 7e-93 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| 1 | K1-202(F1) | ENG 69 | 1-263 | 244-747 | ACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-120 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 97% |
| 1 | K1-603(F2) | ENG 17 | 1-231 | 269-716 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-102 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 18 | 1-200 | 183-685 | ACCAACCCCAATCGAACC | 1e-102 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| | | ENG 19 | 1-154 | 134-639 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-102 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitocondrial) | 0.0 | 98% |
| 1 | K1-884(F2) | ENG 22 | 1-226 | 205-709 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 2e-100 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, | 0.0 | 97% |

| | | | | | | | | | | |
|---|------------|--------|-------|----------|------------------------|--------|---|---|-----|-----|
| | | ENG 23 | 1-104 | 94-600 | ATACACCAACCCCAATCGAACC | 9e-27 | 1 | mitochondrial) NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitochondrial) | 0.0 | 98% |
| 1 | K1-636(F2) | ENG 71 | 1-601 | 582-1086 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 0.0 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitochondrial) | 0.0 | 98% |
| 1 | K1-616(F2) | ENG 72 | 1-288 | 268-772 | TACACCAACCCCAATCGAACC | 1e-134 | 1 | NW_003763650.1 (Enzima málica NADP-dependente, mitochondrial) | 0.0 | 97% |

X. ANEXO III

Tabela A3. Sequências de DNA de *Gallus gallus* com integração de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* no locus Distrofina

| Familia | Ave | Clone | kDNA | Gallus Gallus DNA | Micro-homologia | KDNA E-value | Cromosomo | Locus | E-value | Identidade |
|---------|-------------|--------|-------|-------------------|---|--------------|-----------|-----------------------------|---------|------------|
| 1 | K1-527(F0) | EDG 21 | 1-99 | 76-291 | ACCAACCCCAATCGAACC | 4e-31 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 6e-101 | 98% |
| | | EDG 24 | 1-263 | 246-461 | ACCAACCCCAATCGAACC | 9e-11 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 3e-100 | 98% |
| 1 | K1-224(F1) | EDG 43 | 1-94 | 77-292 | ACCAACCCCAATCGAACC | 4e-34 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 2e-99 | 98% |
| | | EDG 44 | 1-466 | 249-664 | ACCAACCCCAATCGAACC | 4e-146 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 1e-100 | 98% |
| | | EDG 45 | 1-170 | 133-368 | ACCAACCCCAATCGAACTACACCAA CCCAATCGAACC | 5e-27 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 6e-102 | 99% |
| | | EDG 47 | 1-264 | 246-461 | ACCAACCCCAATCGAACC | 1e-125 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 8e-102 | 99% |
| 1 | K1-202 (F1) | EDG 32 | 1-773 | 755-970 | ACCAACCCCAATCGAACC | 0.0 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 1e-96 | 97% |
| 1 | K1-603 (F2) | EDG 68 | 1-93 | 76-291 | ACCAACCCCAATCGAACC | 5e-32 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 1e-96 | 99% |
| 1 | K1-884 (F2) | EDG 77 | 1-167 | 150-365 | ACCAACCCCAATCGAACC | 4e-47 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 3e-100 | 98% |
| | | EDG 78 | 1-75 | 51-274 | GGAGATGCACAACCCCAATCGAACC | 2e-19 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 4e-102 | 99% |
| 1 | K1-638 (F2) | EDG 74 | 1-151 | 134-349 | ACCAACCCCAATCGAACC | 8e-50 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 1e-98 | 97% |
| | | EDG 75 | 1-265 | 248-463 | ACCAACCCCAATCGAACC | 1e-99 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 3e-100 | 98% |
| | | EDG 76 | 1-169 | 152-367 | ACCAACCCCAATCGAACC | 1e-48 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 5e-97 | 97% |
| 1 | K1-636(F2) | EDG 9 | 1-486 | 467-683 | ACACCAACCCCAATCGAACC | 2e-27 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 6e-99 | 98% |
| | | EDG 11 | 1-317 | 300-515 | ACCAACCCCAATCGAACC | 7e-57 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 5e-99 | 98% |
| 1 | K1-652 (F2) | EDG 4 | 1-209 | 192-406 | ACCAACCCCAATCGAACC | 7e-49 | 1 | NW_001471534.2 (Distrofina) | 4e-99 | 98% |