



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



**Lesões Típicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma
Alterado por Integração de Sequências de Minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi***

Clever Gomes Cardoso

Brasília-DF, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Clever Gomes Cardoso

**Lesões Típicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma
Alterado por Integração de Sequências de Minicírculos de
kDNA de *Trypanosoma cruzi***

**Trabalho apresentado como
requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor em Patologia
Molecular da Universidade de
Brasília.**

Orientador: Prof. Antônio R.L. Teixeira

Brasília-DF, 2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Antônio R. L. Teixeira, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FINATEC.

ÍNDICE

CAPA	i
CONTRACAPA	ii
APOIO FINANCEIRO	iii
ÍNDICE	iv
RESUMO	viii
SUMMARY	x

I. INTRODUÇÃO

I.1. Origem da vida na Terra	01
I.1.1. Origem da vida: montagem molecular	01
I.1.2. Mundo das macromoléculas	04
I.1.3. O mundo das bactérias	05
I.1.4. Procariotos e Eucariotos	06
I.1.5. Teoria endossimbiótica	07
I.1.6. Multicelularidade	08
I.1.7. Origem das espécies	08
I.2. Evolução Gênica	10
I.2.1. Evolução dos organismos e evolução gênica	10
I.2.2. Agentes modeladores do genoma: recombinações legítima e ilegítima	10
I.2.3. Agentes modeladores do genoma: a recombinação sítio específica	11
I.2.4. Agentes modeladores do genoma: elementos transponíveis	11
I.2.5. Características e conseqüências evolucionárias dos DNA transposons	14
I.2.6. Características e conseqüências evolucionárias dos retrotransposons	15
I.2.7. Retrotransposons autônomos LTR	15
I.2.8. Retrotransposons autônomos não-LTR (LINEs)	16
I.2.9. Retrotransposons não-LTR não autônomos (SINEs)	18
I.2.10. Inserções de retroelementos no genoma humano e suas conseqüências	19
I.2.11. Elementos transponíveis em aves	21
I.2.12. Transferência horizontal de DNA	23

I.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas.....	25
I.3.1. Infecções humanas por parasitos.....	25
I.3.2. Origem dos Tripanosomatídeos.....	25
I.3.3. Aspectos biológicos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
I.3.4. Biologia molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
I.3.4.1. Cinetoplasto.....	27
I.3.4.2. Editoração do RNA.....	29
I.3.5. Epidemiologia.....	29
I.3.6. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	30
I.3.7. Patologia da Doença de Chagas.....	31
I.3.8. Patogênese da Doença de Chagas.....	31
I.3.9. Transferência gênica horizontal do <i>T. cruzi</i> para a célula hospedeira.....	33
I.3.10. Interação entre moléculas, células e organismo: um concerto na evolução dos seres vivos.....	34
I.3.11. O uso das galinhas como modelo experimental.....	35
I.3.12. Nota.....	36
II. OBJETIVOS.....	37
III. MATERIAIS E MÉTODOS	
III.1. Modelo animal.....	38
III.2. Parasita.....	38
III.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
III.3. Inoculação do <i>Trypanosoma cruzi</i> em ovos férteis de galinhas.....	38
III.4. Grupos experimentais.....	39
III.5 Exame eletrocardiográficos.....	39
III.6. Obtenção de tecido das aves.....	40
III.7. Extração de DNA.....	40
III.7.1. Extração do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
III.7.2. Extração do kDNA.....	41
III.7.3. Extração do DNA do tecido das aves adultas.....	41

III.8. Análise do DNA.....	42
III.8.1. Extração do DNA plasmidial	42
III.8.2. Quantificação, digestão enzimática e eletroforese de DNA genômico.....	43
III.8.3. Southern Blot genômico	44
III.8.4. Southern Blot dos produtos de PCR.....	44
III.8.5. Transferência de colônia de bactérias transformantes para membrana de nylon.....	44
III.9. Sondas radiomarcadas e hibridizações	45
III.9.1. Marcação de seqüências de DNA.....	45
III.9.2. Hibridização.....	46
III.10. Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação de seqüências de kDNA e DNA de <i>T. cruzi</i>	46
III.11. Clonagem.....	48
III.11.1. Clonagem em vetores plasmidiais e transformação em células competentes..	48
III.11.2. Preparação das células competentes.....	49
III.11.3. Transformação	49
III.12. Amplificação das regiões flanqueadoras ao kDNA integrado no genoma de aves..	49
III.13. Seqüenciamento dos clones e análise em banco de dados.....	53
III.14. Patologia.....	54

IV. RESULTADOS

IV.1. Análise da integração de minicírculos de kDNA e nDNA no genoma de embriões de galinhas.....	55
IV.2. Persistência das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma de galinhas.....	58
IV.3. Cruzamento das aves nascidas de ovos inoculados com <i>T. cruzi</i> e positivas para kDNA.....	61
IV.4. Análise da configuração do kDNA integrado nas progênies.....	65
IV.5. Obtenção das seqüências flanqueadoras ao kDNA integrado no genoma de aves....	67
IV.6. Aparecimento de alteração clínica nas aves com kDNA do <i>T. cruzi</i> inserido em seu genoma.....	73
IV.7. Patologia das aves com kDNA integrado em seu genoma	77

V. DISCUSSÃO

V.1. A refratariedade das aves às infecções por <i>Trypanosoma cruzi</i>	88
V.2. Aves como modelo de doenças humanas.....	89
V.3. Transferência horizontal de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> para o genoma de galinhas.....	90
V.4. Transferência vertical de minicírculo de kDNA para a progênie	93
V.5. Análise da integração do kDNA no genoma de galinhas.....	94
V.6. Atividade de elementos retrotransponíveis CR-1 de galinha.....	95
V.7. Patologia das aves com kDNA.....	95
V.8. Patogênese e auto-imunidade.....	96
V.9. Deriva genética.....	98
V.10. Modelo de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o genoma de galinhas.....	98
V.11. Parasita é vetor de doença genética.....	98
V.12. Perspectivas.....	99
VI. BIBLIOGRAFIA.....	100

RESUMO

Acredita-se que a origem e evolução dos seres vivos foram antecedidas por uma complexa rede de interações entre moléculas, microrganismos e células em metazoários. Nesse processo, inúmeros eventos de rearranjo e transferência gênica teriam concorrido para o aumento da complexidade do genoma dos seres hoje existentes. O acúmulo de moléculas de DNA no núcleo das células eucariontes aumentou progressivamente a complexidade da herança genética, configurando um ponto chave na evolução dos organismos. Neste contexto, as evidências trazidas pela pesquisa relatada aqui mostram que os genomas continuam a receber um fluxo de DNA mediante a transferência gênica horizontal (TGH), seguida da herança das novas moléculas pela progênie. Acumulam-se as evidências mostrando que vários genes nos organismos eucariontes são oriundos de procariontes.

Até recentemente a TGH era considerada evento raro que teria acontecido apenas em épocas remotas, visto que só era conhecida pela presença de ortólogos em genomas de procariontes e eucariontes. Entretanto, a pesquisa desenvolvida no nosso laboratório mostra que TGH é um evento esperado toda vez que o *T. cruzi* infecta uma célula eucarionte. O nosso modelo sugere que a barreira refletia apenas a dificuldade de flagrar tal evento entre seres vivos filogeneticamente distantes. Portanto, a noção que TGH seja um processo já extinto ou, na melhor hipótese, de muito baixa frequência, não foi confirmada. A evidência em favor desta conclusão se encontra nos nossos achados prévios de TGH em coelhos, humanos e aves, onde a transferência de DNA de eucarionte para eucarionte foi documentada.

O trabalho apresentado aqui documenta a integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de aves (TGH) e a sua transmissão vertical (TGV) para a progênie. As galinhas são susceptíveis ao *T. cruzi* somente nos primeiros dias de desenvolvimento embrionário. Após o oitavo dia de incubação a infecção intra-ovo é eliminada pela imunidade inata do embrião. Verificamos que no período crucial da infecção e do desenvolvimento do embrião ocorre a infecção da célula tronco pelo *T. cruzi* – ambos em acelerado processo de multiplicação – quando, então, ocorre a TGH. A demonstração de TGH (seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi*) para o genoma da galinha refratária à infecção representa, portanto, um modelo biológico limpo para o estudo da integração de kDNA que gera alterações genotípicas e patologia semelhante àquela da doença de Chagas humana.

Indo além, foi documentada TGV pelo cruzamento de aves kDNA-positivas, permitindo a produção de progênie também kDNA-positivas, nas gerações F1, F2 e F3. A comprovação da TGV foi feita pela documentação da integração do kDNA no genoma de espermatozóides e de óvulos das aves

kDNA-positivas. As aves kDNA-positivas (F0, F1, F2 e F3) desenvolveram sinais típicos da doença de Chagas: lesões nos músculos estriados cardíaco e esquelético, músculos lisos e gânglios parassimpáticos foram documentadas. Nas galinhas com kDNA integrado em seu genoma (portanto, sem a infecção) observou-se unidades mínimas de rejeição, caracterizadas por infiltrados mononucleares e lise da célula alvo. A confluência de unidades mínimas de rejeição reproduz a miocardite difusa típica da doença letal em hospedeiros mamíferos.

Os achados deste estudo sugerem que a alteração genômica causada pela inserção de kDNA possa desencadear reação auto-imune no organismo hospedeiro. De fato, as lesões severas da doença de Chagas em aves com kDNA do parasito em seus genomas são sugestivas de que o *T. cruzi* é vetor de doença genética. A continuação do estudo que mostra integração de DNA do *T. cruzi* no hospedeiro, livre do parasito e alterações patológicas oriundas dessa mutação, pode contribuir para a elucidação dos mecanismos patogênicos que associam auto-imunidade com as lesões típicas da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, kDNA, transferência gênica horizontal (TGH), transferência gênica vertical (TGV), retrotransposon CR-1, evolução do genoma, auto-imunidade, patologia, doença de Chagas.

SUMMARY

It has been said that origin and evolution of live organisms were anticipated by network interactions among molecules, microorganisms and cells into complex metazoa. It appears, in this process took place countless events of horizontal transfer of DNA (HGT) amongst species far distant in the phylogenetic tree, thus promoting increasing complexity of the existing organism genomes. The accumulation of DNA molecules in the eukaryote cell nucleus led to sustainable genetic inheritance, thus portraying a main pathway for the evolution of species. Within this framework, the research reported herein is consistent with the idea that genomes from eukaryotes can receive continuous flow of DNA by HGT. Furthermore, it has also been shown that HGT molecules can be inherited vertically (VGT) by the progeny. These observations are in keeping with previous evidence showing prokaryote orthologues that would have been inherited by eukaryotes.

Although until recently HGT had been considered a rare event that took place in early epochs, as suggested by the evidence recently found in the vertebrate's genome sequencing databank, the research carried out in our Laboratory shows that HGT is indeed a mostly expected event, which could be consistently demonstrated *in vitro* and *in vivo*. This demonstration does not confirm a previous concept describing HGT as a rare event, which would occur at a rather low frequency. The data reported here shows that HGT can be detected in each host cell undergoing *T. cruzi* infections and, therefore HGT was shown in a high ratio of chicks born from *T. cruzi*-infected eggs. In conjunction, our previous studies have shown a gamut of HGT in different *in vitro* and *in vivo* models depicting DNA transfer from eukaryote to eukaryote.

The work presented here shows sequences of kDNA minicircles from *T. cruzi* integrated (HGT) within the chicken genome. Furthermore, crossings of kDNA-positive birds resulted in the transfer of the kDNA integrations (VGT) to progeny. The chickens are refractory to the *T. cruzi* infections, although the infections could get established in early stages of the embryos; after ten days of incubation the *T. cruzi* infection could be eliminated by the embryo innate immune response. We verified that in the crucial early period of the infection and embryo development the chick stem cells can be *T. cruzi*-infected. Thereafter host cell and parasite undergoing accelerated multiplication created the grounds for HGT. The demonstration of HGT of sequences of minicircles of kDNA to the chicken genome represents a clean biological system, since birds are refractory to *T. cruzi*. Accordingly, the chicken model allowed the study of the kDNA-integration that generate genotype alterations and pathology similar to those described in human Chagas disease.

Besides, we have demonstrated VGT by the crossings of kDNA-positive birds, which yielded kDNA-integrated progeny. The kDNA-positive F1, F2 e F3 birds were obtained and proved to carry VGT through the kDNA integrations in male and female gametes. The kDNA-integrated birds (F0, F1, F2 e F3) developed clinical signals typical of Chagas disease: destructive lesions were documented in the striated skeletal and heart muscles, in the smooth muscles and in the parasympathetic ganglia. In the kDNA-integrated but parasite-free birds there were minimal rejection units characterized by the immune system mononuclear cell infiltrates and lyses of the host's self target cells. The confluence of a gamut of minimal rejection units did reproduce a typical diffuse myocarditis hallmark of Chagas disease affecting mammal hosts.

These results show that genomic alterations stemming from kDNA insertion-mutation can provoke auto-immune rejection of host tissues. In fact, the documentation of severe Chagas lesions in kDNA-integrated birds is consistent with our hypothesis that the *T. cruzi* is vector of a genetic disease. Further studies are required to unravel the practical consequences resulting from the *T. cruzi* kDNA integration in the parasite-free host organism. Such demonstrate could ultimately show much such kDNA integrations contribute to the development of pathological lesions typical of Chagas disease. Moreover, these studies could elucidate the molecular mechanisms of pathogenesis calling forth auto-immunity in Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, kDNA, horizontal gene transfer (HGT); vertical gene transfer (VGT); CR-1 retrotransposons, genome evolution;, auto-immunity, pathology; Chagas disease

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1. Origem da vida na Terra

Os astrônomos acreditam que o universo começou com o *Big Bang*, uma grande explosão ocorrida 10 a 20 bilhões de anos atrás. A explosão foi acompanhada por uma grande onda de calor, seguida pela formação de poeira com partículas fundamentais de matéria. Deste modo, o espaço foi, por toda parte, preenchido por partículas subatômicas: prótons, nêutrons e elétrons. (DAVIS, 2000).

A formação da Terra, com base nos modelos astrofísicos da evolução dos planetas e técnicas de geocronologia do urânio, data em aproximadamente 4,6 bilhões de anos (HOLLIDAY, 2001). Todo este período compreende dois Eons: Precambriano (4,6 a 0,5 bilhões de anos) e Fanerozóico (550 milhões de anos até o presente). Duas Eras compõem o período Precambriano: Archean (4,6 a 2,5 bilhões de anos) e o Proterozóico (2,5 bilhões de anos até o final do Eon Precambriano). No entanto, a história mais recente da Terra está situada no Eon Fanerozóico, o qual abrange 3 Eras: Paleozóica, Mesozóica e Cenozóica (KUTSCHERA & NIKLAS, 2004) O esquema geral da escala geológica do tempo associada com a evolução físico-química e biológica da Terra está ilustrado na Figura I.1.

I.1.1. Origem da vida: montagem molecular.

Estudos químicos, geológicos e paleontológicos têm estabelecido que a primeira forma de vida na Terra emergiu aproximadamente 3,8 bilhões de anos (Eon precambriano – Fig I.1). Vários indícios sugerem que a vida deve ter se formado como resultado de alguma estratégia de montagem molecular (DAVIS, 2000). Nesse contexto, a teoria da Evolução Química é admitida como a responsável pela origem da vida. Ela afirma que o surgimento dos seres vivos decorreu de vários estágios de reações químicas, culminando no desenvolvimento de estruturas moleculares complexas.

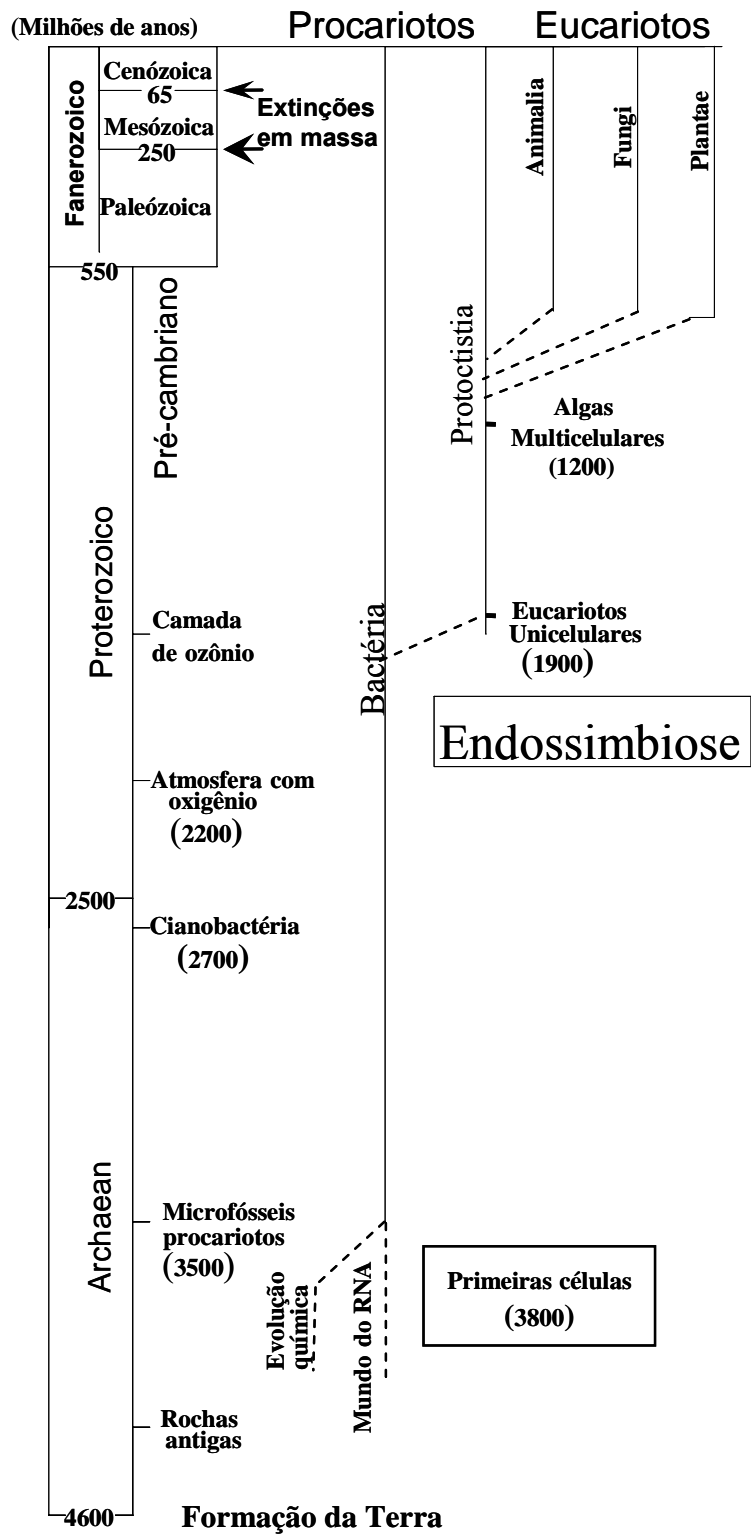


FIGURA I.1. Escala cronoestratográfica da origem da Terra. Datas prováveis dos principais eventos na história do surgimento da Vida no planeta (adaptado de KUTSCHERA & NIKLAS, 2004).

A vida na Terra teria sido iniciada pela evolução química onde simples moléculas reagiram para formar polímeros orgânicos mais complexos; a organização desses polímeros permitiu a formação de entidades replicativas (ácidos nucleicos) e uma subsequente evolução biológica até a formação dos organismos complexos atuais. Nos parágrafos seguintes são apresentadas evidências que sugerem a teoria da evolução química.

Em 1929, o russo Alexander Oparin (1894 a 1980) teorizou a evolução dos compostos químicos. Segundo ele, uma atmosfera rica em hidrogênio e com gases como metano e amônia aliado a uma fonte de energia solar seria o meio propício para a formação de moléculas primordiais e compostos orgânicos simples, como os aminoácidos, as bases dos ácidos nucleicos (bases nitrogenadas) e os açúcares. Ainda em 1929, o inglês J.B.S Haldane postulou que a vida deveria ter surgido em um ambiente livre de oxigênio, pois este elemento reativo poderia destruir os compostos orgânicos. Com base nestas teorias, uma variedade de compostos orgânicos foi sintetizada em laboratório como consequência de experimentos que simulavam o meio primitivo da Terra.

O processo laboratorial de formação das moléculas orgânicas foi inicialmente demonstrado por Stanley L. Miller, em 1953, que simulou a atmosfera planetária primitiva (Hidrogênio, vapor d'água, amônia e metano) sobre a superfície de água esterilizada em tubos de ensaio submetidos ao vácuo e bombardeamento com descargas elétricas de alta tensão. Este experimento resultou na obtenção de aminoácidos (alanina e glicina) e outros compostos intermediários (MILER, 1953). Em 1959 Sidney Fox e cols criaram microesferas proteinóides a partir de aminoácidos isentos de água (FOX e cols, 1959). Leslie Orgel obteve moléculas semelhantes ao DNA usando compostos simples de carbono e sais de chumbo. Em 1963 foi possível realizar a síntese química do ATP, molécula universalmente usada para estocar energia nas células (PONNAMPERUMA e cols, 1963).

Esta fase de reações prebióticas provavelmente perdurou ao longo de centenas de milhares de anos. Neste período, os oceanos da Terra primitiva se transformaram em uma verdadeira sopa orgânica e, nesse meio ambiente, os componentes orgânicos após inúmeras reações, teriam se condensado para formar os polipeptídeos e os ácidos nucleicos. Contudo, diante da complexidade da natureza ainda em tempos primitivos, os experimentos em laboratórios dão apenas uma noção de poucas, entre tantas outras possibilidades, de rotas tomadas pelas moléculas nos primórdios da origem da vida.

I.1.2 Mundo das macromoléculas

A compartimentalização celular é considerada necessidade fundamental para o estabelecimento da vida. Tal compartimentalização sugere que as reações de origem da vida aconteceram num semi-permeável. Qualquer tipo de atividade celular, como a produção de proteínas e ácidos nucleicos só seria possível se as células fossem envolvidas por membranas, pois, a evolução de um sistema celular aberto não alcançaria o equilíbrio (CHAISSON, 2001). Lipídeos (glicerol ligado a ácidos graxos e outros grupos como fosfatos), que têm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, são os compostos que deram origem a compartimentalização celular. Devido a essa função, alguns autores sugerem que os lipídeos possam ter precedido as proteínas e os ácidos nucleicos (TREVORS, 2003).

De fato, mundo dos lipídeos, antecedendo o surgimento da vida na Terra é uma hipótese aceitável. Assim, moléculas lipídicas foram responsáveis pela formação da membrana celular e deram origem aos meios interno e externo que são indispensáveis para as reações bioquímicas de uma célula.

O RNA, outra macromolécula de fundamental importância na formação dos seres vivos, é tido como o primeiro polímero da informação celular. A hipótese de que a vida originou-se via um sistema baseado em genomas de RNA é denominado mundo do RNA. Essa hipótese sustenta-se nas diversas características desse ácido nucleico, como a capacidade de dirigir sozinho sua replicação e a produção de proteínas, de se comportar como mensageira que carrega a informação genética para a máquina de tradução, de catalisar reações no ribossomo e participar no processamento do “splicing” e editoração do RNA precursor.

Além disso, sabe-se que o RNA possui uma enorme versatilidade estrutural. Apesar de conter apenas 4 subunidades químicas (adenina, timina, citosina e uracila), o RNA se dobra em uma variedade de estruturas terciárias complexas, análoga à estrutura das proteínas e catalisa uma ampla faixa de reações químicas (JOYCE, 2002).

Indícios experimentais também reafirmam a hipótese de que o RNA é a molécula iniciadora da vida. No final dos anos 60, o físico Manfred Eigen demonstrou, “*in vitro*”, que moléculas de RNA se autoreplicavam em velocidade mais rápida que as estruturas originais. Na década de 80, Thomas Cech e Sidney Altman descreveram como alguns tipos de RNA são capazes de autoprocessar-se. Isto é, o RNA pode agir como as proteínas

cortando-se e rearranjando-se, comportamento típico das estruturas protéicas. Tais moléculas de RNA são denominadas ribozimas (CECH, 1986). A auto-replicação denota certo grau de independência do RNA e a sua importância na origem da vida.

I.1.3 O Mundo das bactérias

As bactérias foram as primeiras formas de vida detectadas na Terra. Estudos têm confirmado a presença de fósseis bacterianos em rochas sedimentares de 3,5 a 4 bilhões de ano. As evidências sugerem que estes microrganismos não produziam nem utilizavam oxigênio para o seu metabolismo sendo desta forma seres anaeróbios. Tais organismos tinham a capacidade de sobreviver em ambientes extremamente inóspitos como no sal (halófitas) e em elevadas temperaturas (termófilas). Seus ancestrais são denominados Archeobactérias e podem ser encontrados ainda hoje. A capacidade biológica destas bactérias é compatível com as condições ambientais da Terra primitiva.

As condições inóspitas do meio ambiente selecionaram as bactérias mais adaptadas aperfeiçoando assim, suas vias metabólicas. Comparado com plantas, animais e fungos, o repertório metabólico das bactérias é vasto. Acredita-se que esta característica seja oriunda de sua incrível capacidade de troca de material genético entre si. Desta forma, estes organismos além de compartilharem fragmentos de ácidos nucléicos, possibilitando a sobrevivência de quaisquer formas bacterianas, fundiram-se umas com as outras diante das exigências ambientais, favorecendo o processo evolutivo dos seres vivos com o surgimento de indivíduos com estruturas mais complexas como os protistas, os fungos, as plantas e os animais (MARGULIS & SAGAN, 2002).

As primeiras bactérias foram seres heterotróficos, isto é, nutriam-se de abundantes quantidades de compostos orgânicos retirados do meio onde viviam. Portanto, as bactérias mais antigas cresciam por fermentação e decompunham açúcares e outros compostos similares para obter energia química e alimento. Em face disto, nenhuma das primeiras bactérias foram obrigadas a produzir alimentos. Contudo, devido ao crescente número de indivíduos, através das gerações, houve uma rápida diminuição do alimento e uma baixa renovação do mesmo. Diante deste ambiente desfavorável, bactérias fermentadoras desenvolveram a capacidade de produzir seu próprio alimento (bactérias verdes), dando origem aos seres autotróficos. Estes organismos utilizavam a energia solar realizando a

fotosíntese, a qual foi responsável por uma grande revolução indutora de diversas modificações na Terra e pelo o acúmulo de oxigênio na biosfera. A fotosíntese foi uma das mais importantes inovações metabólicas do planeta. A capacidade autotrófica permitiu que os microrganismos produzissem e armazenassem suas próprias fontes de energia, como açúcares, proteínas e todos os componentes necessários para sua manutenção.

As bactérias cianofíceas ou cianobactérias evoluíram das bactérias verdes fotossintéticas. Estas últimas, apesar de serem fotossintetizantes, retiravam átomos de hidrogênio do sulfeto de hidrogênio (H_2S), enquanto que as cianobactérias retiravam hidrogênio de moléculas de água (H_2O), liberando o gás oxigênio na atmosfera. Desta forma, as cianobactérias acumulavam o hidrogênio em seu interior e liberavam o oxigênio que acumulava na atmosfera (MARGULIS & SAGAN, 2002; KUTSCHERA & NIKLAS, 2004). Em resumo, ao liberar o oxigênio, as cianobactérias (bactérias verde-azuladas) envolveram a atmosfera do mundo em átomos de oxigênio, e deram início ao Reino Monera, o reino mais primitivo do Planeta.

I.1.4 Procariotos e Eucariotos

Em 1937, Edouard Chalton, um biólogo marinho francês, denominou de procariotes as bactérias com DNA disperso no citoplasma não possuindo núcleo verdadeiro, e aos organismos que tinham o DNA no núcleo, envolvido por membrana, como eucariotes (ou eucariontes). Apenas esses dois tipos de células compõem o universo dos seres vivos: procariontes e eucariontes.

As células eucariontes se desenvolveram mediante interações simbióticas entre procariontes. Simbiose é o termo geral para co-habitação de organismos diferentes (MARGULIS & CHAPMAN, 1998). Desta forma, procariontes teriam evoluído para eucariontes pela fusão de diferentes tipos de bactérias dando origem aos eucariontes protistas. Esses seres unicelulares, posteriormente, evoluíram para formação dos protistas multicelulares, que por sua vez deram origem aos reinos Animália, Fungi e Plantae. Desta forma, todos os seres vivos teriam tido sua origem nos procariontes que evoluíram para eucariontes protistas que aumentaram a complexidade mediante longos processos de aproximação, associação, cooperação, e simbioses propiciando a formação de sincícios

precursores de metazoários e de organismos reconhecidos nos diferentes reinos, conforme segue abaixo.

I.1.5. Teoria endossimbiótica

O biólogo norte americano Ivan Wallin (1883 – 1969) propôs em 1927 que as bactérias seriam as grandes responsáveis pela origem das espécies. Ele afirmava que as novas espécies teriam se formado mediante aquisição de bactérias simbiotes. Wallin criou a teoria que afirma que a vida, animal e vegetal, teriam aparecido pelo “simbioticismo” ou “formação de complexos microsimbóticos”. Hoje, muitos pesquisadores concordam que fungos, plantas e animais evoluíram de protistas ancestrais através de associações endossimbióticas entre bactérias. A teoria endossimbiótica foi mais aceita a partir dos anos 60 com estudos da bióloga Lynn Margulis (2002). Segundo ela os protistas aeróbicos, formados pela fusão de mitocôndrias e bactérias, evoluíram para fungos e animais e as algas fotossintéticas, originadas da fusão de plastídeos e células bacterianas, foram as responsáveis pelo surgimento das plantas.

A endossimbiose é uma condição topológica na qual um organismo vive dentro de outro. A origem de diversas organelas importantes para o metabolismo de células eucarióticas, como a mitocôndria e os plastídeos, ocorreram através da endossimbiose de bactérias. A mitocôndria é uma organela presente na maioria das células protistas e em todas as células de plantas, animais e fungos. Sua principal função é possibilitar a respiração no interior da célula. Fortes indícios sugerem que as mitocôndrias se originaram a partir de seres unicelulares de vida livre que se fundiram a outras células (MARTIN & EMBLEY, 2004). De fato, essas organelas parecem bactérias, pois chegam a crescer e dividir com ritmo próprio (DNA). Estas observações sugerem que as mitocôndrias de eucariontes tiveram evolução gradual a partir de simbioses com bactérias.

Os plastídios, corpos coloridos responsáveis pela fotossíntese em plantas e alguns protistas (algas), também têm origem endossimbiótica. Eles contêm os mesmos pigmentos e componentes bioquímicos encontrados em cianobactérias esféricas produtoras de oxigênio. Também se acredita que a mobilidade e a divisão por mitose das células tenham sido adquiridas através da união endossimbiótica.

Qualquer que tenha sido o cenário exato da aquisição da mobilidade e dos talentos respiratórios e fotossintéticos dos eucariotos, a endossimbiose certamente deve fazer parte dessa narrativa (MARGULIS & SAGAN, 2002).

I.1.6. Multicelularidade

Os protistas unicelulares deram origem a todos os organismos multicelulares. Isto provavelmente ocorreu devido a uma falha de separação após o processo de divisão celular, resultando assim, em uma maior interação entre estas novas células. Verdadeiras colônias pluricelulares foram formadas a partir deste evento. Todas as células protista pertencentes à colônia tornaram-se membro de um grande grupo. Contudo, diversos dados indicam que a consolidação desta entidade maior, pluricelular, dependeu de processos interativos de transferências gênicas entre as células.

Este conjunto celular formou e interagiu em uma vasta gama de configurações. Portanto as formas pluricelulares de vida, plantas, animais e fungos, ampliaram enormemente a complexidade das células protistas de vida livre e evoluíram, em conjunto, para a formação de tecidos separados, como o tecido reprodutor e o tecido nervoso, dotados de funções distintas.

I.1.7. Origem das espécies

A formação dos animais, plantas e fungos foi resultado de montagens multicelulares que se desenvolveram a partir de unidades simbióticas. Pesquisas realizadas em fósseis indicam que os animais evoluíram antes das plantas e fungos. O surgimento destes dois últimos reinos ocorreu 100 milhões de anos depois do advento dos animais protegidos com carapaças.

Os registros iniciais de fósseis de animais marinhos datam da era Paleozóica. O geólogo inglês Adam Sedgwick (1785 – 1873) denominou o período cambriano de fósseis mais antigos de animais (início do eon Fanerozóico – Figura I.1). Para Sedgwick e outros paleontólogos, o aparecimento destes fósseis animais foi um acontecimento miraculosamente repentino, pois não existem registros de fósseis intermediários em rochas com datação anterior ao período Cambriano. Toda essa pré-história ficou conhecida como Pré-Cambriano (períodos Archean e Proterozóico). No entanto, o período Pré-Cambriano

foi documentado mais recentemente com a descoberta de fósseis de protistas de corpo mole (MARGULIS & SAGAN, 2002).

Os primeiros animais provavelmente desenvolveram-se num mundo já rico em oxigênio e em um ambiente não muito diferente do que temos hoje. A espécie animal mais simples é o *Trichoplax adhaerens*, um minúsculo organismo marinho, o mais simples dos metazoários e provavelmente o ancestral mais primitivo do reino animal (ENDER & SCHIERWATER, 2003).

Ao longo das épocas eônicas os animais evoluíram e desenvolveram extraordinárias aptidões como o movimento rápido e a visão, entre outras. Esta ampla faixa de variações de aptidões permitiu a origem de milhões de espécies diferentes.

Os fungos estão entre os primeiros seres vivos terrestres. Existe divergência quanto ao número de espécies pertencentes ao reino Fungi. O número de espécies pertencentes ao reino Fungi estão datados entre 100 mil e 1,5 milhões de anos. Os fungos diferem dos outros seres vivos por não realizarem fotossíntese e necessitarem de compostos à base de carbono e nitrogênio. Os organismos pertencentes a este reino realizam reprodução sexuada (mas podem se reproduzir assexuada e para-sexuada). Os fungos, tal como a celulose das plantas, possuem paredes celulares resistentes compostas de quitina. Através da decomposição de outros organismos, os fungos, conjuntamente com as bactérias, reaproveitam a matéria orgânica da Terra atuando como decompositores na cadeia alimentar dos seres vivos.

Assim como os reinos Animália e Fungi, o reino Plantae também evoluiu via protistas. Tendo evoluído das algas, as plantas foram os últimos organismos a surgir na Terra no período Siluriano (450 milhões de anos – Eon Fanerozóico). Porém, as plantas não foram os primeiros organismos a fazerem fotossíntese na Terra. Estudos em rochas, através da análise do teor de carbono indicam que as reações fotossintéticas eram feitas no Planeta pelas cianobactérias há aproximadamente 1,2 bilhões de anos. O reino Plantae é dividido em nove Filos. Contudo, somente um produz flores. Apesar disto, este filo é tão diverso que constitui mais da metade de todas as espécies de plantas conhecidas no planeta.

Algumas características apontam as briófitas (musgo, hepáticas) como as primeiras representantes do reino Plantae. As briófitas aquáticas teriam evoluído para seres mais complexos e mais adaptados a ambientes secos. A partir deste ponto, as plantas evoluíram e

aperfeiçoaram sua condição na Terra. Para isso, foi necessário o desenvolvimento de sistemas vasculares de condução que permitiu o crescimento, a evolução e o povoamento desses organismos na superfície da Terra.

I.2. Evolução Gênica

I.2.1. Evolução dos organismos e evolução gênica.

A evolução dos organismos está diretamente associada à evolução dos genomas. De fato, os animais divergiram de seus ancestrais comuns através de mudanças em seu DNA. A necessidade de melhor compreensão desses mecanismos evolutivos levou a um maior conhecimento de como as mudanças no DNA resultaram em um aperfeiçoamento nos mecanismos de sobrevivência e adaptação necessários para a vida. Este entendimento originou-se de estudos bioquímicos e moleculares que permitiram um correto entendimento do processo filogenético dos seres vivos.

A análise das seqüências dos genomas dos organismos tem demonstrado que as modificações no DNA, como transferências gênicas, duplicações, perdas de genes e falhas nos mecanismos de reparo, são as principais forças responsáveis pela evolução genômica.

Esta evolução ocorreu, portanto, através da aquisição de novas seqüências de DNA e pelo rearranjo de seqüências já existentes. A aquisição de DNA por transferência gênica horizontal (TGH) caracteriza-se pela troca de material genético entre organismos pertencentes a espécies diferentes. TGH é diferente de rearranjos internos dos genomas, pois, estes, são retratos de sucessivos eventos de recombinação dentro de um genoma (KURLAND, 2000). A partir destes processos de modelagem, o genoma expandiu-se e cresceu permitindo que fossem desenvolvidas diferentes formas de organismos que povoam a Terra. As forças de remodelamento do DNA surgiram de erros durante a replicação e nos sistemas de reparo, ou de recombinação e transposição de DNA. Estes são os principais agentes modeladores do genoma dos organismos (CARROLL e cols, 2001).

I.2.2. Agentes modeladores do genoma: recombinações legítima e ilegítima.

As recombinações são agentes remodeladores do genoma. A recombinação homóloga ou legítima se inicia pelo pareamento de seqüências homólogas de DNA. O pareamento das fitas, que ocorre principalmente no momento de replicação dos

cromossomos no processo de meiose (gametas), favorece a recombinação gênica. Ocasionalmente, pode ocorrer recombinação ilegítima (não homóloga) entre seqüências de DNA. Os elementos móveis (DNA transponíveis), por exemplo, ao se moverem para outros sítios do DNA, podem servir como substratos que favorecem a recombinação desigual ou ilegítima. A multiplicação de vários elementos transponíveis no genoma de mamíferos e demais seres vivos, como elementos Alu e LINE-1 pode ser mediada pela recombinação ilegítima, e subsequente duplicação do *loci*. De fato, todos esses processos têm como resultado a duplicação ou rearranjo do genoma.

Os eventos de duplicação resultam na formação de novos genes. A importância desse processo tem sido apreciada desde a primeira demonstração de duplicação espontânea no locus *Bar* em *Drosophila melanogaster* por H.J. Muller, em 1936. Desta descoberta, Muller deduziu que se um gene surge de uma cópia funcional, um dos dois estará livre para acumular mutações e gradualmente evoluir para uma nova função, permitindo um aumento do conteúdo e da complexidade do DNA. Deste modo, pode-se sugerir que todos os genes podem ter surgido de alguns genes pré-existent (PRESGRAVES, 2004).

I.2.3. Agentes modeladores do genoma: a recombinação sítio específica.

Na recombinação sítio-específica, algumas proteínas reconhecem seqüências específicas em cada uma das pontas das fitas de DNA que irão se recombinar. Os sítios de recombinação na seqüência não precisam ser idênticos, e isto distingue a recombinação sítio-específica da recombinação homóloga. Um complexo proteína-DNA realiza então a troca das fitas. Este tipo de recombinação é o principal responsável pela integração de fagos no genoma hospedeiro.

A definição estrita de recombinação sítio específica exclui outros processos de recombinações especializadas como a maioria dos eventos de transposição de DNA (quando um sítio alvo específico é usado), incluindo a integração de retrovírus e DNA transposons (GRINDLEY e cols, 2006).

I.2.4. Agentes modeladores do genoma: elementos transponíveis.

Estudos têm revelado que o DNA da maioria dos eucariontes é composto em mais de 50% por seqüências repetitivas. (DEININGER & BATZER, 1999). Grande parte dessas

regiões repetitivas é formada por elementos transponíveis (ETs) ou DNAs móveis, também denominados inapropriadamente “DNA parasitário” (HAN e cols, 2005; KAPITONOV & JURKA, 2006). Esses elementos realizam um tipo diferente de evento que permite que uma seqüência de DNA seja inserida em outra, sem a necessidade de aliança ou homologia de seqüência. Desta forma, ETs têm como principal característica a capacidade de mover-se de um sítio de DNA para outro, levando consigo, em alguns casos, seqüências adicionais do genoma. Isto faz com que os elementos transponíveis sejam importantes não somente pelo mecanismo envolvido na reorganização do DNA já existente, mas também pela capacidade de transferência horizontal de seqüência de DNA entre organismos filogeneticamente distantes, com as conseqüências evolucionárias de sua mobilidade (mutação e recombinação). Todos os genomas eucariontes contêm estes elementos móveis, contudo sua proporção e atividade variam.

Os elementos transponíveis eucariontes, apesar da enorme diversidade, se dividem em apenas duas classes, os chamados retrotransposons e DNA transposons. Enquanto os retrotransposons são transpostos via transcrição reversa de seu mRNA, os DNA transposons se movem por transferência de sua cópia de DNA para outro sítio do genoma do hospedeiro (KAPITONOV & JURKA, 2006). Existe também uma divisão funcional entre os elementos transponíveis: enquanto os transposons são responsáveis por rearranjos em larga escala, os retroelementos mobilizam segmentos menores, geralmente não maiores que algumas quilobases.

Em mamíferos, os elementos transponíveis consistem tanto de DNA transposons quanto de retrotransposons. O sequenciamento dos genomas do camundongo e do homem tem confirmado que elementos transponíveis possuem um grande papel no modelamento genômico destas duas espécies. As duas classes de elementos móveis compõem 45 e 37% dos genomas de humanos e do camundongo respectivamente (LANDER e cols, 2001; WATERSTON e cols, 2002). Contudo, aproximadamente 3% do genoma humano são compostos de DNA transposons, que são remanescentes ou fósseis de elementos ancestrais, sendo improvável que exista alguma atividade de DNA transposon (LANDER e cols, 2001). Os retrotransposons, por sua vez, constituem a maioria dos elementos transponíveis de mamíferos compreendendo 42% do genoma de seres humanos.

Todos estes mecanismos de mobilização do DNA têm sido indispensáveis nos processos de evolução e divergência entre as espécies. O sequenciamento do genoma de *H. sapiens*, *Mus musculus*, e *Gallus gallus*, entre outros, tem possibilitado a avaliação do impacto da atividade destes elementos no processo evolucionário dos seres vivos. A figura I.2 exibe um esquema com os principais elementos transponíveis.

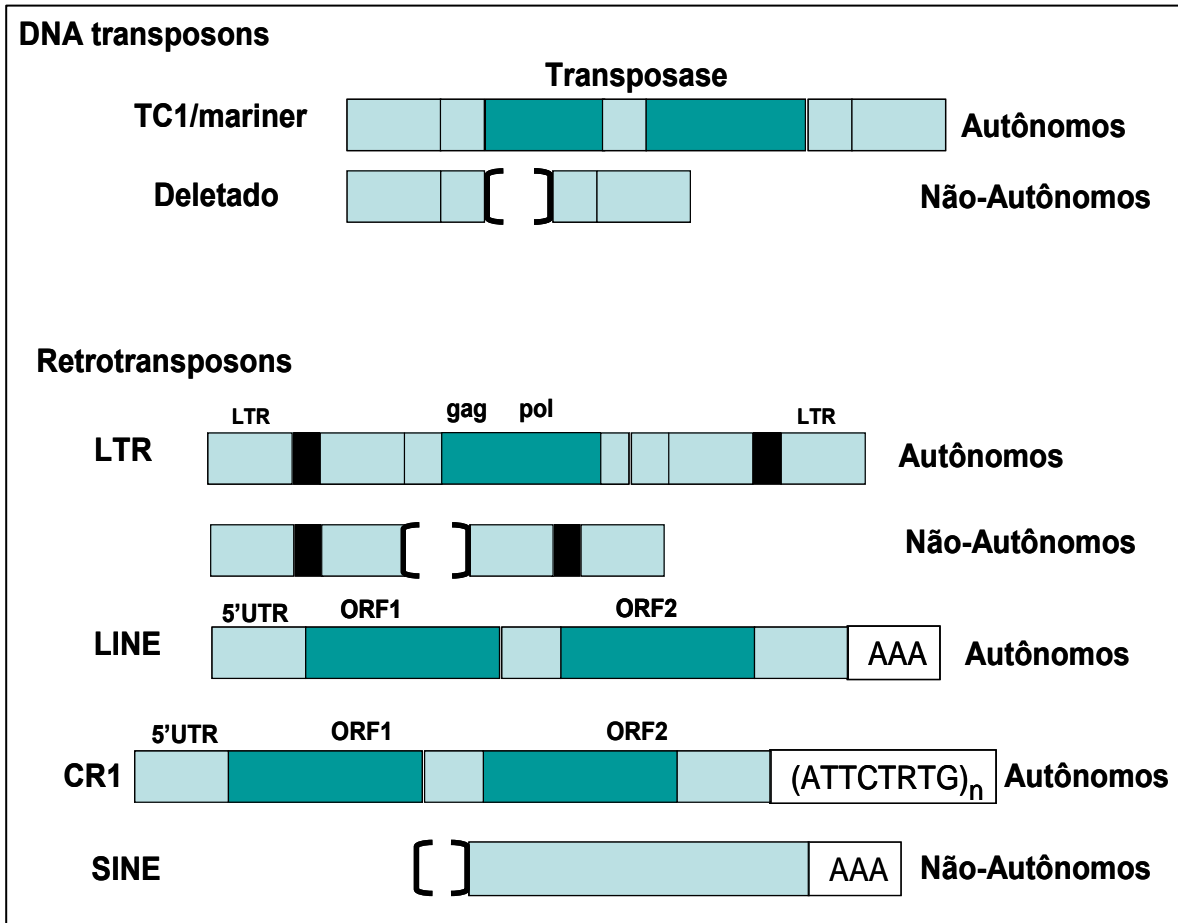


FIGURA I.2. Variedade de elementos transponíveis no genoma de eucariontes. Os elementos CR1 no genoma de aves são equivalentes aos elementos LINE-1 de mamíferos. (adaptado de BUSHMAN, 2002).

I.2.5. Características e conseqüências evolucionárias dos DNA transposons.

Os transposons mobilizam-se via DNA e estão presentes tanto em eucariontes quanto em procariontes. Estes elementos multiplicam-se usando a maquinaria de replicação do hospedeiro e codificam somente uma proteína, denominada transposase, que age como endonuclease, além de catalizar a transferência das fitas de DNA transposon de um sítio do genoma para outro. (MIZROKHI , 1992; SMIT & RIGGS, 1996; KAPITONOV & JURKA, 2006).

Os DNAs transposons foram inicialmente descritos em bactérias e o mais simples elemento foi denominado de IS (seqüência de inserção). Tais elementos são unidades autônomas que codificam as enzimas necessárias para sua transposição, sendo desta forma, constituintes comuns dos cromossomos bacterianos e plasmídios. A principal característica dos IS é possuir repetições invertidas *inverted terminal repeats*. Quando um elemento deste tipo se transpõe, a seqüência do DNA alvo é duplicada no sítio de inserção no genoma do hospedeiro (KAPITONOV & JURKA, 2001).

Em eucariontes, os DNAs transposons dividem-se em duas classes caracterizadas de acordo com o seu mecanismo de transposição: cortar e colar e *rolling circle*. Diversos elementos compõem essas classes, como os típicos mariners, hAT, piggy Bac, P, Merlin transibe e o elemento P de *Drosophila*. Uma terceira classe de DNAs transposons, denominada Polintons, foi identificada por KAPITONOV & JURKA (2006). Esses estudos demonstram que os Polintons estão espalhados nos reinos Protistas, Fungi e Animália. Os polintons autônomos contêm tipicamente de 15 a 20 kb e codificam mais de 10 proteínas diferentes sendo desta forma, os mais complexos DNAs transposons encontrados em eucariontes (KAPITONOV & JURKA, 2006)

Membros da família TC1/mariner são provavelmente os DNA transposons mais encontrados na natureza (PLASTERK, 1999). Seus tamanhos são aproximadamente de 1,3 a 2,4 quilobases e contêm o gene que codifica a enzima transposase, o qual é também flanqueado pelas repetições terminais invertidas (IRs) que possuem sítios de ligação da transposase (Fig I.2) (BUSHMAN, 2002). Elementos TC1/mariner ativos são frequentemente encontrados em seres invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (TC1 e TC3) e *Drosophila* (Mos1, Minos), além de seres humanos e outros vertebrados. Contudo,

tais elementos não são evidenciados, na forma ativa, em genomas tanto de mamíferos quanto de qualquer outro vertebrado.

Extensivos estudos filogenéticos têm levado a evidência de transferência lateral de elementos TC1/mariner. A relação filogenética entre seqüências TC1/mariner mostra diferenças com seus hospedeiros. Como exemplo, pode-se citar a estreita relação entre subfamílias de mariner em seres humanos, insetos e helmintos (LAMPE e cols, 2001). Tem sido sugerido que este evento ocorre pela transferência horizontal entre filos distantes (LOHE e cols, 1995). Ainda não se sabe o mecanismo exato deste fenômeno de transferências. Contudo, sugere-se que vírus e parasitas intra e extracelulares sejam os responsáveis por estes eventos (KIDWELL, 1992).

I.2.6. Características e conseqüências evolucionárias dos retrotransposons

Esta via de transposição está presente apenas em eucariontes, sendo da maior importância na evolução destes organismos. Sua principal característica é a ação da transcriptase reversa em suas seqüências. A atividade desta enzima faz com que os retrotransposons possam se mover pelo processo cortar e colar envolvendo um RNA intermediário. Desta forma, o retrotransposon original é mantido *in situ* enquanto sua seqüência é transcrita. O RNA resultante é então reversamente transcrito para DNA e integrado em uma nova localização (LUAN e cols, 1993; WHITCOMB & HUGHES, 1992).

Elementos retrotransponíveis podem ser classificados como autônomos e não autônomos. Os autônomos contêm em sua seqüência segmentos (ORFs) cuja atividades são necessárias para sua mobilidade e são divididos em duas classes com base na presença ou ausência de repetições terminais longas ou LTR – *long terminal sequence* - sendo assim chamados de retrotransposons LTR e não-LTR respectivamente. Os elementos não-autônomos não produzem nenhum produto gênico funcional relacionado à transposição, dependendo desta forma, da maquinaria dos retrotransposons autônomos (Fig I.2).

I.2.7. Retrotransposons autônomos LTR

Os retrotransposons LTR possuem uma estrutura caracterizada por seqüências LTR em cada ponta do DNA integrado no genoma hospedeiro, além de possuírem estruturas

gênicas similares aos retrovírus simples (genes Gag e Gag-Pol) (Fig I.2). Os retrovírus diferem apenas pelo fato de possuírem o gene que produz o envelope funcional (env) (BUSHMAN, 2002). Todos os elementos LTR produzem apenas uma forma de RNA o qual serve como genoma e como mRNA para a síntese de proteínas.

Esses retrotransposons são detectados em todos os genomas de mamíferos e em aproximadamente 8% do DNA dos seres humanos. A atividade destes elementos é bastante variável entre os organismos. Essencialmente os retrotransposons LTR de seres humanos são imóveis, contudo, alguns elementos como HERV (retrovírus endógenos humanos) podem permanecer ativos (DEININGER e cols, 2003). Em contraste, no genoma de camundongos, existem retrotransposons LTR ativos na forma de partículas intracisternais A (IAPs), elemento MaLR e ETn (MEDSTRAND & MAGER, 1998; BAUST e cols, 2002)

I.2.8. Retrotransposons autônomos não-LTR (LINEs)

A segunda grande classe de retroelementos autônomos são os retrotransposons não-LTR, também chamados de retrotransposons poli (A) ou elementos nucleotídicos interespaçados longos (LINEs). Os elementos mais estudados desta classe são os LINEs de humanos (também chamados L1), o *fator I* de *Drosophila*, o R2Bm de *Bombyx mori* e os elementos TAD de *Neurospora crassa* (BUSHMAN, 2002).

Os retrotransposons não-LTR apresentam uma região 5' não transcrita 5'UTR – *untranslated region* - ligeiramente variável entre diferentes elementos com um promotor interno ativo. Esta região contém sítios de fatores de transcrição celular que controlam a taxa de síntese de RNA. Associado a isto, esses elementos possuem duas fases abertas de leitura (ORF 1 e 2). A ORF1 codifica uma proteína com capacidade de se ligar a RNA e a ORF 2 codifica enzimas com atividade endonucleásica e de transcriptase reversa as quais são importantes na inserção do retrotransposon no DNA celular. Além disso, estes retrotransposons contêm uma região 3'UTR que termina com um sinal de poliadenilação AATAAA e uma cauda poli-A (Fig I.2) (OSTERTAG & KAZAZIAN, 2001).

Esta classe de retrotransposons é representada por segmentos longos de DNA, cujas seqüências são largamente detectadas no genoma de humanos e camundongos. Contudo, podem-se encontrar representantes de elementos inativos, como L2 (LINE 2 e 3), e ativos, como L1 (LINE 1), em humanos e camundongos. (LANDER e cols, 2001; WATERSTON

e cols, 2002). Aproximadamente 21% do genoma humano são compostos por estes retrotransposons não-LTR autônomos (WATERSTON e cols, 2002). Os LINEs tiveram, ao longo do tempo, um grande número de intervenções eficientes no genoma de eucariontes. Os genomas de mamíferos contêm aproximadamente 100.000 cópias de LINE.

Estudos demonstram a seguinte rota de integração “de novo” dos LINEs no genoma de mamíferos: após a transcrição, o RNA é processado no núcleo e encaminhado para o citoplasma, onde é feita a tradução. Com o término da síntese de proteínas, o RNA LINE reúne suas proteínas e se move novamente para o núcleo, onde a atividade endonucleásica da ORF 2 promove um corte em uma das fitas do DNA. Este DNA cortado serve como iniciador (primer) para o processo de transcrição, realizado pela enzima transcriptase reversa, que produz um cDNA complementar a fita molde de RNA. Os passos que seguem à síntese da primeira fita de cDNA não são claros. Algumas evidências sugerem que uma nuclease possa clivar a outra fita possibilitando à ponta 3' da primeira fita a atuar como primer para a produção da segunda fita (BUSHMAN, 2002). A transcrição reversa frequentemente produz falha nas seqüências do LINE copiado, resultando em múltiplas inserções truncadas e não funcionais (SHEEN e cols, 2000).

Os elementos LINEs efetivamente ativos, são aqueles que possuem as duas ORFs intactas. Alguns estudos demonstram que estes elementos podem servir de carreadores, levando consigo seqüências adicionais de DNA durante a retrotransposição. Este evento ocorre quando o sinal de poliadenilação presente na seqüência 3' é silenciado e, assim, o elemento L1 utiliza o sítio de poliadenilação de uma região mais abaixo, isto é, DNA não-LINE. Desta forma, os elementos L1 podem transportar parte da região flanqueadora a suas terminações 3' para novos sítios do genoma. Esse constitui um dos mecanismos para o remodelamento genômico através da mistura aleatória de genes (GOODIER e cols, 2000; PICKERAL e cols, 2000).

O número de LINEs ativos no genoma e a sua localização associado à taxa de retrotransposição são fatores que podem dar uma idéia da magnitude desses mecanismos. A quantidade de DNA flanqueador que pode ser traduzido e integrado em outros sítios do genoma, além da extensão desta inserção na evolução do genoma, ainda é assunto de muitos estudos. Entretanto, sabe-se que existem aproximadamente 63 LINEs ativos no genoma humano e 3000 LINEs no genoma dos camundongos. Esses dados sugerem que o

remodelamento genômico intermediado por L1 pode estar efetivamente ocorrendo em várias espécies, expandindo assim a diversidade e o tamanho dos genomas (KAZAZIAN, 2000).

I.2.9. Retrotransposons não-LTR não autônomos (SINEs)

Os retrotransposons não-LTR não autônomos, mais pronunciados na cadeia genômica de mamíferos são os SINEs (Elementos Nucleotídicos Interespaçados Curtos). Todos os genomas de mamíferos contêm altas proporções destes retroelementos, contudo, a natureza específica e o número de cópias de SINEs variam enormemente (DEININGER e cols 2003). Estes elementos são pequenos (90 a 300 pares de base), possuem um promotor interno para RNA polimerase III (enzima responsável pela transcrição) e não codificam proteína, por isso dependem da atividade de um retrotransposon autônomo para sua mobilidade (Fig I.2). Os SINEs estão distribuídos entre regiões não repetitivas do genoma e encontram-se principalmente em regiões ricas em bases nitrogenadas GC, frequentemente próximos à regiões codificadoras de genes. Os SINEs são ancestralmente derivados de vários genes tRNA (RNA transportador) ou do gene RNA 7SL como parte do complexo ribossômico (ULLU & TSCHUDI, 1984).

Duas evidências sugerem que os SINEs usam a maquinaria dos LINEs, como a enzima transcriptase reversa, para realizar o seu processo de transposição (DEWANNIEUX e cols, 2003). A primeira é vista em algumas espécies onde a região 3' dos SINEs mostram alta identidade com a região 3' do LINE correspondente. É provável que os SINEs possam ter surgido da união da seqüência de tRNA relacionado com a parte final 3' de um LINE. Isto resultou na habilidade do LINE de complementar a amplificação dos SINEs. A outra evidência vem do fato dos LINEs compartilharem duas características com os SINEs, sua extensão poli-A na cauda 3' e as repetições diretas com tamanhos variáveis (WEINER, 2002; DANIELS & DEININGER, 1985).

Os mais importantes membros desta classe são os elementos *Alu* em humanos e B1 em camundongos (ROWOLD & HERRERA, 2000). Durante os últimos 65 milhões de anos, os elementos *Alu* propagaram mais de um milhão de cópias no genoma de primatas (DEININGER & BATZER, 2003). Pode-se encontrar mais de 1 milhão de elementos *Alu* no genoma humano, isto corresponde a 11% da massa total de DNA, enquanto

aproximadamente 100.000 elementos B1 podem ser encontrados no genoma de camundongos (LANDER e cols, 2001; WATERSTON e cols, 2002). As seqüências dos membros individuais da família Alu são muito semelhantes; sua identidade chega a 87%. Os elementos Alu afetam o genoma de diversos modos, causando inserções, mutações, recombinações entre elementos, conversão gênica e alterações na expressão dos genes (DEININGER & BATZER, 2003; SMIT & RIGGS, 1999).

Existem outros retrotransposons não autônomos no genoma humano como os pseudogenes processados e os elementos SVA. Pseudogenes processados representam cópias de mRNA maduros inseridos em novas localizações do genoma. Frequentemente os pseudogenes produzem mutações pontuais em regiões codificadoras, incluindo “stop codons” que eliminam a produção normal de proteínas. Este elemento, na maioria das vezes se insere em introns presentes em cópias funcionais de genes. Os pseudogenes também são dependentes de elementos LINEs para sua amplificação (OSTERTAG e cols, 2003) e que a expressão de L1 pode facilitar a formação de pseudogenes processados (ESNAULT e cols, 2000). Esses pseudogenes geralmente ocorrem em uma ou duas cópias de qualquer mRNA celular. Além disso, um terço dos genes humanos tem estes elementos levando a soma de 10.000 a 20.000 pseudogenes diferentes (GONÇALVES e cols, 2000).

I.2.10. Inserções de retroelementos no genoma humano e suas conseqüências

A identificação, por Haig Kazazian e colaboradores, de integração de elementos L1 ativos no gene do fator VIII pertencente à cascata de coagulação, foi a primeira demonstração de que tais elementos podem levar a alterações genéticas no organismo hospedeiro. Em sua pesquisa, Kazazian investigou a base molecular da hemofilia humana, desordem que prejudica o mecanismo de coagulação. Em dois casos entre 240, ele encontrou inserções “de novo” de elementos L1 na parte codificadora do gene do fator VIII. (KAZAZIAN & MORAM, 1998).

Estimativas indicam que entre 100 e 200 nascimentos de humanos um indivíduo retém inserções Alu (DEININGER & BATZER, 1999). Análise similar tem sugerido a mesma taxa de mutação pelos elementos L1 (KAZAZIAN & MORAM, 1998). O sequenciamento de 727 mutantes no *locus* do fator IX (da cadeia de coagulação sanguínea) mostrou uma inserção Alu e L1 neste gene (LI e cols, 2001). Estes dados sugerem a

existência de uma inserção de elementos móveis a cada 17 nascimentos. Todas estas evidências de transposição indicam que os elementos transponíveis são também responsáveis por desordens genéticas. Doenças como câncer de mama, hemofilia, síndrome de Alport, distrofia muscular, câncer de cólon, podem estar associadas direta ou indiretamente, a inserções de elementos transponíveis. Estas inserções resultam em mutações, alterações de regulação e função de genes (MIKI, 1998; DEININGER & BATZER, 1999).

A maioria das inserções de L1, que causam doença, estão no cromossomo X (KAZAZIAN, 2000). Esse cromossomo tem duas vezes o nível normal de elementos L1 (30% contra 17%) indicando a ocorrência de sítio preferencial (*hot spot*) de inserções ou a existência de uma seleção positiva para L1 nesta parte do genoma (BAILEY e cols, 2000). É possível que doenças ligadas ao cromossomo X sejam mais visíveis devido a sua única cópia no indivíduo macho. Contudo, o fato de ocorrer poucas inserções *Alu* neste cromossomo indica certa preferência indicada pela desproporcionalidade de elementos L1 neste cromossomo (BATZER & DEININGER, 2002).

Em geral, os elementos móveis causam danos significativos no genoma humano. Todavia, as recombinações ilegítimas entre estes elementos causam ainda mais danos. Estimativas indicam que no mínimo 0,3% de todas as doenças genéticas humanas são causadas por recombinação ilegítima entre elementos homólogos *Alu* (*Alu/Alu*). Este evento pode causar deleções ou duplicações (DEININGER & BATZER, 1999). Elementos *Alu* parecem estar mais envolvidos nestas recombinações ilegítimas que os elementos L1 (DEININGER & BATZER, 1999, KAZAZIAN, 2000). Sabe-se que alguns genes são muito mais susceptíveis à recombinação *Alu/Alu* que outros. O gene do receptor LDL, o locus inibidor C1, o gene *All-1* e *BRCA1* além de diversos outros, realizam múltiplas recombinações. Estes eventos levam a uma grande variedade de doenças humanas (DEININGER & BATZER, 1999, EL-SAWY & DEININGER, 2005).

Além disso, tem sido proposto que elementos *Alu* contêm seqüências Chi-like. Essas seqüências aumentam o índice de recombinação destes elementos (RUDIGER e cols, 1995). Possivelmente existe alguma característica individual da seqüência ou do *loci* para criar esta incrível tendência de recombinação. Adicionalmente, diversos pesquisadores sugerem que algumas propriedades dos elementos *Alu* (taxa de transcrição, tamanho das

caudas Poli-A, etc) possam influenciar no processo de transcrição bem como na estrutura do cromossomo e nas variações genéticas entre regiões do genoma ou entre indivíduos. Como exemplo, pode-se citar os casos em que uma mutação no gene p53 (regulador) leva a um aumento na taxa de recombinação em até 20 vezes (GREGOW e cols, 2000).

Os eventos de recombinação ilegítima também têm sido observados nos elementos L1. Sabe-se que seqüências LINE produzem uma deficiência no armazenamento de glicogênio através de uma recombinação que leva a deleção da subunidade β da fosforilase (quinase) PHKB (BURWINKEL & KILIMANN, 1998). Nos camundongos, por exemplo, aproximadamente 10% de todas as mutações são resultados de inserção e recombinação de retroelementos. (OSTERTAG & KAZAZIAN, 2001) principalmente devido a altas taxas de integração com elementos LTR. O impacto de elementos móveis levando a mutagênese sobre genomas hospedeiros é altamente variável (DEININGER & BATZER 2002). Isto torna difícil a avaliação e a quantificação das doenças humanas associada a integrações de elementos Alu e L1.

I.2.11. Elementos transponíveis em aves

Menos de 9% do genoma de galinha (*Gallus gallus*) podem ser classificados como regiões de repetições interesparsadas, onde predominam os elementos transponíveis. Esta porcentagem é consideravelmente menor que 40 a 50% de repetições interesparsadas observadas em mamíferos.

Os elementos CR-1 (*Chicken Repeat 1*) pertencem a uma classe de retrotransposons não-LTR e corresponde a 80% de todas as repetições interesparsadas do genoma das galinhas, o que representa 200.000 cópias (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCE CONSORTIUM, 2004). Em 2005 Coullin e colaboradores demonstraram que repetições CR-1 estão espalhadas em praticamente todos os cromossomos de galinhas com uma alta densidade nos macro cromossomos e com *hot spots* nas regiões subteloméricas dos cromossomos 1, 2, 3q, 4q e 5q (COULLIN e cols, 2005).

A seqüência completa de CR-1 contem aproximadamente 4,5 kB, contudo, nas aves, a maioria destes elementos são truncados na parte final da região 5', possuindo um tamanho de aproximadamente 200 pb (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCE CONSORTIUM, 2004). Esses retrotransposons assemelham-se a L1 de mamíferos, tendo

uma região 5' promotora interna rica em G+C seguidas por 2 ORFs. Estudos recentes, usando seqüências de CR-1B e CR-1 like, levaram a uma seqüência de consenso de CR-1 que completos, contêm uma 5'UTR, duas ORFs (CR1 ORF1 e CR2 ORF2) e uma 3'UTR. A ORF1 codifica uma proteína ligante a ácido nucléico e possui o tamanho aproximado de 36 kD. A ORF2 com 92 kD contem domínios de uma endonuclease e uma transcriptase reversa (HAAS e cols, 1997; BURCH e cols, 1993). Os domínios da ORF2 apresentam homologia com a endonuclease e a transcriptase reversa de elementos L1 de mamíferos (Fig I.2) (FENG e cols, 1996; XIONG & EICKBUSH, 1990).

A comparação com a distribuição de cópias de CR-1 de galinhas com L1 mamíferos sugere uma maior eficiência da transcriptase reversa de L1 bem como uma alta estabilidade de transcritos de L1. As análises filogenéticas, baseadas nas seqüências derivadas da região 3'UTR de vários CR-1 de galinhas, identificaram que existem no mínimo seis subfamílias distintas (CR1A-F) (VARDERGON & REITMAN, 1994). Numerosos dados apontam para a implicação destes retrotransposons na regulação da expressão gênica em seus organismos hospedeiros, sugerindo assim que os CR1 tenham surgido precocemente na evolução e se tornado retroelementos predominantes e essenciais em certos organismos (HAAS e cols, 2001). Em 1984, Sanzo e colaboradores confirmaram uma sugestão de participação de CR1 na regulação da expressão gênica. Ele demonstrou que segmentos conservados destes elementos tinham afinidade para proteínas nucleares (SANZO e cols, 1984).

Apesar de sua similaridade, os elementos CR1 e CR1-like possuem características que os distinguem do outros elementos não-LTR. A parte carboxi terminal da ORF2 de CR-1 contém um novo domínio protéico (CR) que é mais conservado, que os domínios de endonuclease e transcriptase reversa de CR1 e CR1-like. Além disso, os elementos CR-1 não terminam em uma cauda poli-A; eles contêm pequenas repetições diretas em sua parte 3' terminal que são altamente conservadas (ATTCTRTG)_n em todas suas subfamílias (Fig I.2) (SILVA & BURCH, 1989). Esta característica faz com que a enzima transcriptase reversa de CR-1 seja altamente específica ao seu substrato conservado. Já a transcriptase de L1 é altamente promiscua, pois todas as seqüências poliadeniladas são potenciais substratos para a transcriptase reversa de L1, o que pode levar adicionalmente a transposição de elementos que usam sua maquinaria para se inserir em outras localidades do genoma hospedeiro como pseudogenes processados e SINEs. Esta alta especificidade da

transcriptase reversa de CR-1 está ligada à ausência de novos SINEs no genoma de galinhas. Nas aves, foram encontradas apenas cópias de MIR e MIR3 que são SINEs associados a L2 e L3 respectivamente, sugerindo que esta partição teria ocorrido antes da divisão aves-mamíferos (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCE CONSORTIUM, 2004).

A contribuição dos DNA transposons nas regiões repetitivas do genoma de galinhas é inexpressiva. Em 2000, Jurka depositou 31 seqüências repetitivas de galinha no banco de dados RepBase contudo, somente 2 destas seqüências eram DNA transposons Mariner 1a e 1b (JURKA, 2000; WICKER, 2005).

I.2.12. Transferência horizontal de DNA

O processo de transmissão de genes mais conhecido é o da aquisição de alelos gênicos de uma geração para outra, denominado transmissão gênica vertical ou germinativa (TGV). Contudo existem inúmeras evidências da atuação de um mecanismo presente em procariontes e eucariontes, denominada transmissão genética horizontal (TGH). Essa transmissão não se baseia na recombinação homóloga, mas sim em recombinação sítio-específica, ilegítima e transposicional ou em elementos transponíveis ativos (WOLF e cols, 2001).

Em 1984, SYVANEN teorizou que a THG poderia ser a principal força evolucionária. De fato, múltiplos mecanismos de transferência física de DNA de uma espécie para outra são conhecidos. Além disso, o conceito de simbiose evolutiva possibilita que genes pertencentes a um genoma tenham se tornado parte de um outro, aumentando assim sua complexidade. Syvanen (1994) afirma, ainda, que a transferência horizontal de DNA poderia ter contribuído no processo de especiação de seres vivos (SYVANEN, 1984).

Diversos estudos documentam a transferência horizontal de seqüências de elementos transponíveis entre organismos eucariontes. Na classe dos retrotransposons existem fortes evidências de que elementos *cópia* (retrotransposons LTR) transferiram DNA de *D. melanogaster* para *D. willistoni*. Além disso, tem sido documentada a transferência de genes entre organismos parasitas e seus hospedeiros. STEGHICH e SCHAEFFER (2006) demonstraram a transferência do gene descarboxilase do hospedeiro vertebrado para o protozoário *Trypanosoma brucei* (STEGHICH & SCHAEFFER, 2006).

Sabe-se também da troca de retrotransposons LTR entre plantas. Esses achados baseiam-se na descoberta de elementos retrotransponíveis estreitamente relacionados em espécies hospedeiras filogeneticamente distantes. Exemplos de transferência horizontal têm sido documentados também em elementos da classe de retrotransposons não-LTR (BUSHMAN, 2002).

A teoria de transferência gênica horizontal (TGH) mescla à teoria endossimbiótica, e consideramos que ambas se complementam. De fato, o vínculo entre seres vivos pode acarretar transferência de genes levando duas células a uma unidade de co-evolução. No caso de uniões endossimbióticas, como as ocorridas na origem dos cloroplastos e mitocôndrias, foi documentado diversos exemplos de transferência gênica para os cromossomos de células hospedeiras, e isso também ilustra os processos de trocas genéticas ocorridas na co-evolução destes organismos (HOFFMEISTER e cols, 2003).

A transferência gênica horizontal em procariontes já está claramente demonstrada em bactérias, mediante estudos de virulência e resistência a antibióticos. Além disso, a literatura registra vários exemplos de genes procariontes que foram lateralmente transmitidos para genomas eucariontes (KRISHNAPILLAI, 1996). Análises preliminares das seqüências contidas no genoma humano mostram que centenas de genes parecem ter sido adquiridas através da aquisição de genes de procariontes. Estes eventos teriam ocorridos em vários momentos, na evolução dos vertebrados. Algumas dezenas desses genes parecem ter sido mobilizadas através de elementos transponíveis. (LANDER e cols, 2001).

Várias teorias tentam explicar a transferência horizontal de elementos retrotransponíveis e de DNAs transposons. Evidências sugerem que vírus de eucariontes podem servir como meio de transporte entre células para estes elementos. O DNA móvel pode ser transportado de duas formas: integrado no genoma viral ou empacotado pelas proteínas do envelope junto aos constituintes virais. Relatos de transferência horizontal de genes envolvendo eucariontes se baseiam na comparação de similaridades entre seqüências depositadas em bancos de dados. As diferenças entre as datas de divergência evolutiva indicam que muitas dessas seqüências teriam sido adquiridas mediante transferências gênicas entre espécies. A identificação da transferência recente de DNA entre organismos eucariontes é muito difícil de ser demonstrada. Entretanto, é concebível que esses

mecanismos de recombinação gênica oferecem possibilidades de interferência e de remodelamento genômico, podendo causar grandes impactos nos processos evolutivos dos seres vivos (SHAPIRO, 1999; MAKALOWSKI, 2000; KURLAND, 2000).

I.3. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

I.3.1. Infecções humanas por parasitos.

Há aproximadamente 150.000 a.C, a espécie *Homo sapiens* emergiu no leste da África e se espalhou pelo mundo (TISHKOFF e cols 2001; TEMPLETON e cols, 2002). Até 15.000 a.C, os seres humanos já haviam migrado e habitado praticamente toda a superfície da Terra, levando consigo, nesta trajetória, alguns parasitos e adquirindo outros em seu caminho. O desenvolvimento de pequenos povoados e cidades facilitaram a transmissão de infecção entre os homens e as rotas de comércio auxiliaram na disseminação das doenças, inclusive parasitárias. A relevância destas enfermidades parasitárias foi aumentando com o passar do tempo, sendo que, nos dias de hoje, se destacam devido a diversos fatores, como as constantes injúrias do homem ao meio ambiente e sua conseqüente degradação e a fatores sócio-econômicos, principalmente nos países subdesenvolvidos. Além disso, o comportamento comumente oportunista dos parasitos em pacientes com comprometimento imunológico - como acontece nos indivíduos acometidos pelo vírus HIV ou submetidos a tratamentos radioterápicos, quimioterápicos e nos usuários de drogas imunossupressoras - têm contribuído para o aumento da prevalência de doenças parasitárias na Terra (AMBROISE-THOMAS, 2001).

I.3.2. Origem dos Tripanosomatídeos

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico causador da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Este protozoário pertence à ordem *Kinetoplastida*, cujos membros apresentam de 1 a 4 flagelos e uma organela auto-replicável que contém DNA, o cinetoplasto. Esta estrutura apresenta íntimas relações com o aparelho mitocôndrial da célula parasitária (BRENER, 2000).

Os membros da família Trypanosomatidae originaram-se originado a partir de ancestrais monogenéticos (parasitos de invertebrados) que habitavam insetos não-

hematófagos. A transmissão para o hospedeiro vertebrado se deu quando estes insetos adquiriram o hábito da hematofagia. No hospedeiro vertebrado, estes parasitas deram início a diversas modificações morfológicas, como o desenvolvimento de membrana ondulatória (dando origem ao estágio de tripomastigota). A partir daí, os organismos pertencentes a esta família estabeleceram-se como hemoparasitos, passando a utilizar dois hospedeiros (digenéticos) durante o seu ciclo de vida. Portanto, o inseto tornou-se hospedeiro intermediário enquanto os animais vertebrados, como o homem, adquiriram o papel de hospedeiro definitivo. A revisão de TEIXEIRA e cols, (2006) descreve de maneira objetiva o desenvolvimento evolucionário da família Trypanosomatidae juntamente com os hospedeiros intermediários.

I.3.3. Aspectos biológicos do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui dois genomas, sendo um pertencente ao núcleo celular e o outro à mitocôndria. Nesta organela existe uma complexa rede de moléculas circulares de DNA denominada cinetoplasto. Em seu núcleo, o *T. cruzi* possui um genoma diplóide pequeno contendo entre 25 e 55 megabases e organizado em aproximadamente 12.000 genes codificantes de proteínas (EL-SAYED e cols, 2005). O conteúdo do DNA nuclear pode variar de 87 a 200 x 10⁶ pares de bases. Esta variação reflete diretamente no número e tamanho de cromossomos nas diferentes cepas e clones do parasito.

O *T. cruzi* é classificado como uma espécie simples, contudo, existem diversas diferenças genéticas e fenotípicas entre os parasitos isolados (DVORAK, 1984; TIBAYRENC & AYALA, 1988; YEO e cols, 2005). Diferentes técnicas experimentais têm demonstrado uma variedade significativa de subgrupos de *T. cruzi*. As cepas podem ser divididas com base em marcadores protéicos e genéticos, como fenótipo de isoenzimas, perfil de DNA, seqüências de DNA com polimorfismos ribossomais e de miniexons e análise de microssatélites (BRISSE e cols 2000; OLIVEIRA, 1998; CAMPBELL e cols 2004; MILES e cols, 1978; SOUTO e cols 1996; TIBAYRENC, 1995). Todos estes marcadores moleculares resultaram na divisão de duas linhagens denominadas *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TCII). O TCII pode ser dividido em 5 sub-linhagens (*T. cruzi* IIa-IIe) (BRISSE e cols, 2000; GAUNT & MILES, 2000). Esta divisão atual do *T. cruzi* pode mudar tanto na medida em que mais isolados do parasito são examinados quanto em

decorrência do avanço nas técnicas de análise genotípica que sugerem enorme diversidade fenotípica das populações de *T. cruzi* (YEO e cols, 2005).

Apesar da replicação do *T. cruzi* ser predominantemente clonal, existem evidências de troca gênica entre linhagens (BOGLIOLO e cols 1996; BRISSE e cols 2003; CARRASCO e cols 1996; MACHADO & AYALA 2001; SOUTO e ZINGALES, 1993; STURN e cols 2003). Análise filogenética e a produção de híbridos em laboratório têm demonstrado que o *T. cruzi* possui uma grande capacidade de troca de DNA (MACHADO & AYALA, 2001; GAUNT e cols 2003). Estudos de quantificação de material genético demonstram que clones biológicos de uma cepa simples de *T. cruzi* têm entre 30 a 70% mais DNA que o estoque parental, indicando algum mecanismo de troca de DNA entre populações. As evidências de troca de DNA entre os clones de *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, foram finalmente documentadas (GAUNT e cols, 2003).

I.3.4. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*

I.3.4.1. Cinetoplasto

O *T. cruzi* e outros membros de sua família possuem somente uma mitocôndria. Nesta organela, próximo ao seu corpo basal, há um arranjo complexo de DNA na matriz mitocondrial que forma a estrutura do cinetoplasto (TEIXEIRA, 2006). Este DNA é denominado kDNA “kinetoplast DNA”, constitui cerca de 10 a 30% do DNA celular do parasito sendo responsável pela codificação de RNAs ribossômicos e das enzimas envolvidas na respiração celular do microrganismo. A microscopia eletrônica demonstrou que o kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função sendo denominadas minicírculo e maxicírculo.

Os minicírculos totalizam 10.000 a 20.000 cópias por célula, e estão organizados como anéis de uma rede concatenada. Análises com enzimas de restrição têm demonstrado que cada minicírculo tem 1.4 kb e estão representados por seqüências heterogêneas que se traduzem em enorme diversidade genética (MOREL e cols, 1980). Os minicírculos possuem quatro regiões conservadas com extensão de 120 a 160 pb, separadas por quatro seqüências variáveis de aproximadamente 280 a 320 pb (DEGRAVE e cols, 1988). As regiões variáveis transcrevem pequenos RNAs guia que participam no processo de editoração de transcritos de maxicírculos.

Os maxicírculos possuem a mesma função do DNA da mitocôndria de organismos eucariontes, contendo alguns RNAs mitocondriais (rRNA 9S e 12S) e subunidades de complexos respiratórios como citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenases, específicos da organela mitocondrial (Fig I.3) (OCHS e cols, 1996; HORVATH e cols, 2000).

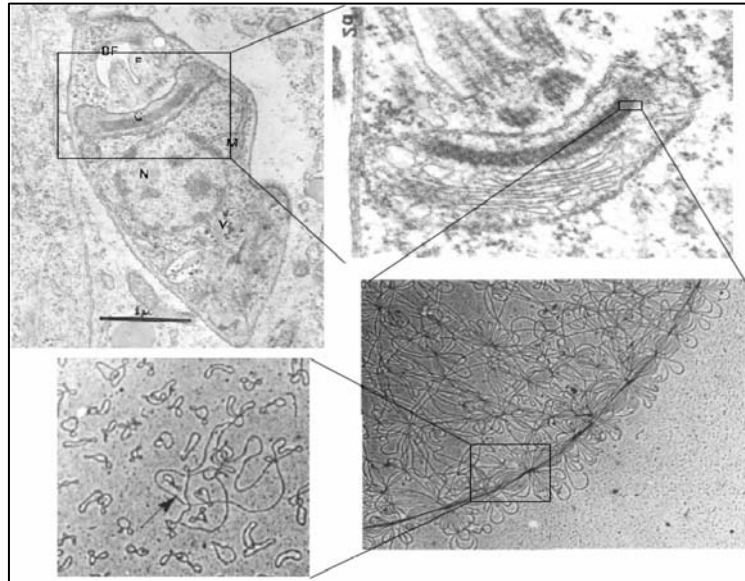


FIGURA I.3. Cinetoplasto de *T.cruzi*. Note na série de fotografias ao microscópio eletrônico, a íntima relação do cinetoplasto com a mitocôndria do parasito e a sua disposição concatenada envolvendo maxicírculos e minicírculos. (RUBIN-DE-CELIS, 2006).

A replicação do kDNA coincide com a do DNA presente no núcleo do parasita. Sua duplicação é facilitada pelo fato da maquinaria de replicação ser precisamente organizada em torno dos anéis de minicírculos e maxicírculos. A topoisomerase II é uma enzima responsável pela replicação do kDNA. Esta proteína atua afrouxando a rede concatenada de DNA, iniciando assim sua duplicação. Estudos subseqüentes revelaram a localização de outras proteínas replicativas como a DNA polimerase (pol β) e a endonuclease I (enzima com atividade de RNase H). Após a duplicação os mini e maxicírculos das redes de kDNA resultantes são segregados para as células filhas (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004).

I.3.4.2. Editoração do RNA

A editoração é uma forma de processamento de mRNA que regula a expressão de genes mitocondriais em tripanosomatídeos. Neste processo, a associação e dissociação de ribonucleoproteínas contendo mRNAs precusores e RNAs guias (gRNAs) são cruciais para iniciação e propagação do processo de editoração do RNA (MADISON-ANTENUCCI, 2002).

A descoberta desta editoração surgiu da observação inicial da adição e deleção de resíduos de uridinas em seqüências de RNAs mensageiros de mitocôndria de tripanossomas. Desta forma, demonstrou-se que os mRNAs codificados nos maxicírculos sofrem modificações através da adição e deleção de resíduos de uridinas antes de serem traduzidos. Os gRNAs, produzidos pelos minicírculos, atuam como doadores ou aceptores de resíduos de uridina no mRNA. Os gRNAs possuem cerca de 15 nucleotídeos e são complementares a cada região do mRNA a ser editada, formando assim um híbrido entre o mRNA e gRNA. Esta união de RNAs, associada à proteínas codificadas por genes nucleares e importadas para a mitocôndria, formam um complexo ribonucléico que é essencial para o transporte mitocondrial de elétrons e para a fosforilação oxidativa (MADISON-ANTENUCCI, 2002).

I.3.5. Epidemiologia

A Doença de Chagas abrange amplas regiões do continente americano, estendendo-se desde o México até o sul da Argentina. Dados indicam que existem aproximadamente 120 milhões de pessoas, em 21 países, expostas ao risco de contrair a doença, onde 16 a 18 milhões de indivíduos já estão infectados (MONCAYO, 1999; MONCAYO, 2003). Estes dados colocam a Doença de Chagas como a principal patologia parasitária da América Latina e a terceira em escala global, ficando atrás somente da malária e esquistossomose. Estima-se que no Brasil existam 6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, em praticamente todas as regiões do país.

Esta endemia atinge principalmente populações pobres da América Latina que residem em condições precárias, e constitui uma das principais causas de morte súbita na fase mais produtiva do indivíduo. Isto resulta em um grande problema social, pois na maioria dos casos, as mortes prematuras levam a um desestruturamento familiar.

I.3.6. Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo geral do *T. cruzi* pode ser descrito de acordo com as seguintes etapas: as formas tripomastigotas metacíclicas são depositadas na pele ou mucosa do mamífero durante o repasto do inseto triatomíneo. Ao coçar, essas formas penetram na circulação sanguínea do hospedeiro definitivo e são internalizados nas células. Após entrar no citoplasma celular, os tripomastigotas são envolvidos por uma membrana, formando um componente denominado fagossoma ou vacúolo parasitóforo (VP). Quando os parasitos evadem o vacuolo, ocorre a diferenciação para a forma amastigota e sua conseqüente divisão binária. Com o crescente número de parasitos no interior da célula, estes voltam a se diferenciar em tripomastigotas, são liberados no sangue com a destruição celular e tornam a parasitar células adjacentes. O inseto hematófago ao fazer o seu repasto em um hospedeiro mamífero infectado, suga as formas tripomastigotas circulantes; estas, por sua vez, transformam-se em epimastigotas. No intestino do inseto, os epimastigotas multiplicam-se pela divisão binária. No reto, certa porção dos epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos infectantes eliminado nas fezes (BRENER 2000).

Mamíferos pertencentes a sete diferentes classes já foram encontrados naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, formando o ciclo silvestre. Todos os mamíferos são susceptíveis ao *T. cruzi* e, portanto, são considerados reservatórios naturais de grande importância epidemiológica (Fig I.4).

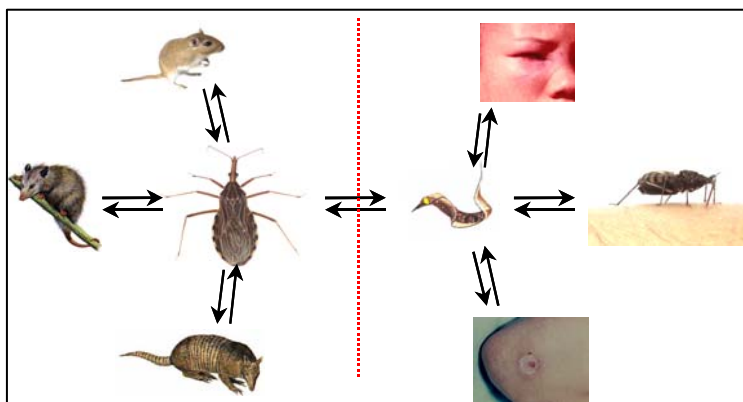


FIGURA I.4. Ciclo silvestre e peri-doméstico do *Trypanosoma cruzi*. (a) Insetos hematófagos contaminados com o parasito podem ser ingeridos ou picar animais silvestres. (b) Quando o triatomíneo se alimenta de sangue humano inicia-se o ciclo peri-doméstico (TEIXEIRA e cols, 2006).

I.3.7. Patologia da doença de Chagas

As características iniciais da infecção pelo *T. cruzi* em hospedeiros mamíferos se assemelham às de outras infecções intracelulares crônicas como leishmaniose, tuberculose e hanseníase (TEIXEIRA e cols, 2006). Os casos clínicos variam de imperceptíveis a agudo. O caso agudo acomete, ocasionalmente, crianças abaixo dos 15 anos, sendo caracterizada por febre, alta parasitemia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e inflamação no sítio de infecção, podendo levar a aproximadamente 5% de mortalidade. A principal causa de morte nesta fase é a insuficiência cardíaca, resultante da miocardite severa que se instala no paciente infectado (LARANJA e cols, 1956; CUNHA-NETO e cols, 2006). Contudo, na maioria dos casos, os sintomas clínicos são ausentes ou suaves e não específicos, dificultando o diagnóstico da doença nesta fase da infecção. A forma indeterminada pode durar décadas e é caracterizada pela baixa parasitemia, pela presença de formas amastigotas quiescentes do parasito no tecido muscular e pela dificuldade na detecção do agente infeccioso. Mais de 30% dos indivíduos do estágio indeterminado desenvolvem a fase crônica da doença: 84,5% apresentam lesões no tecido cardíaco e os 5,5% restantes desenvolvem desnervação das camadas musculares do esôfago e cólon levando à severa dilatação e disfunção destes órgãos (CUNHA-NETO e cols, 2006). Os fatores responsáveis pela transição da fase indeterminada para a fase crônica ainda não foram elucidados. (TEIXEIRA e cols, 1987; CUNHA-NETO e cols, 2006).

A variação nas características da doença tem sido ligada diretamente à genética do hospedeiro ou do parasito. Esses dois fatores têm um papel relevante na patogênese da doença (CAMPBELL e cols, 2004; MACEDO e cols, 2002; MACEDO & PENA, 1998). As revisões de TEIXEIRA e cols, 2006 e CUNHA-NETO e cols, 2006 fornecem uma atualização sobre as reações do sistema imune do paciente chagásico nos diferentes estágios da doença.

I.3.8. Patogênese da doença de Chagas

A relação direta entre o parasitismo nos tecidos e a patogênese em pacientes chagásicos foi a primeira hipótese sobre a origem das lesões causadas pelo *T. cruzi* no ser humano. De fato, a ruptura mecânica da célula hospedeira, causada pelos parasitos, e a degradação dos tecidos afetados podem levar a inflamação crônica. Contudo, a principal

dificuldade na associação entre infecção por *T. cruzi* e doença crônica é a ausência de ninhos de parasitas nas secções histológicas de 80% dos pacientes mortos. Ainda que diversos estudos, usando imunohistoquímica ou PCR, detectarem o parasito no tecido cardíaco de pacientes e confirmarem infecção críptica nos chagásicos crônicos, persiste a dificuldade de associar o protozoário com as lesões inflamatórias. Isto sugere que o parasitismo tecidual não seria insuficiente para causar as lesões observadas nos tecidos do indivíduo chagásico crônico. Possivelmente, outros fatores poderiam produzir danos no coração. Desta forma, surgiu a hipótese de que as lesões chagásicas seriam decorrentes, pelo menos em parte, de um processo de auto-imunidade. As lesões patológicas características, com destruição de células alvo por infiltrados de células inflamatórias mononucleares, precisam ser estudadas em modelos que excluam a infecção residual ou críptica pelo *T. cruzi* (TEIXEIRA e cols, 2006).

A literatura mostra que nas infecções por *T. cruzi* (experimentais ou em seres humanos), surgem diversos anticorpos reconhecidos por participarem de um processo denominado mimetismo molecular. Neste processo, epítomos de antígenos do parasito induzem a produção de anticorpos que provocam reação cruzada com epítomos de moléculas tissulares do hospedeiro. Estes anticorpos poderiam induzir mecanismo auto-imune de rejeição de tecidos, como o cardíaco. Exemplos típicos desta auto-reação são moléculas da miosina cardíaca e proteínas ribossomais que possuem epítomos semelhantes àqueles das proteínas de *T. cruzi* (KIERSZENBAUM, 2005; CÓSSIO e cols, 1974a, 1974b; SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974; WOOD e cols, 1982). As reações direcionadas aos próprios tecidos do hospedeiro poderiam induzir destruição dos tecidos alvo.

Outros achados indicam que a auto-imunidade na doença de Chagas também está relacionada com a presença de células de defesa autorreativas, como as células T (RIZZO e cols, 1989). SANTOS-BUCH e TEIXEIRA (1974) observaram a rejeição acelerada de células cardíacas alogênicas pelos linfócitos de coelhos chagásicos crônicos. RIBEIRO-DOS-SANTOS e cols (2001) demonstraram que corações saudáveis de camundongos BALB/c singênicos eram rejeitados quando transplantados no tecido subcutâneo de camundongos chagásicos crônicos. CUNHA-NETO e cols (1996) relataram que a miosina cardíaca induzia a proliferação de clones de células T CD₄⁺, derivados de infiltrados nas lesões cardíacas em pacientes chagásicos crônicos. Aliado a isso, estudos demonstram a

ativação policlonal de anticorpos e células T autorreativas durante a fase aguda da infecção murina pelo *T. cruzi* (TEKIEL e cols, 1999; KIESZEMBAUN, 1986; LANGUES e cols, 1999; SOARES & RIBEIRO DOS SANTOS, 1999).

Alguns pesquisadores pensam que as lesões chagásicas são produzidas apenas pelo parasito, e certamente não seria redundância repetir que jamais existe doença de Chagas sem infecção inicial pelo *T. cruzi*. Entretanto, vários estudos têm indicado que reações de auto-imunidade ocorrem no organismo hospedeiro no curso da doença de Chagas. Para melhor elucidação dessas discussões, indicamos a leitura das revisões de LEON & ENGMAN (2003) e de TARLETON (2003).

I.3.9. Transferência gênica horizontal do *T. cruzi* para a célula hospedeira

A origem da auto-imunidade na doença de Chagas começou a ser desvendada com resultados de trabalhos realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Universidade de Brasília. Uma linha de pesquisa tem sugerido que as reações auto-ímmunes decorrentes da infecção por *T. cruzi* estariam relacionadas com a transferência genética do kDNA deste parasito para o genoma do hospedeiro. De fato, achados sugerem que a auto-imunidade na doença de Chagas, como a rejeição das células cardíacas, estaria diretamente associada à alterações fenotípicas subseqüentes à integração de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro.

TEIXEIRA e cols (1990) observaram que o tratamento de coelhos chagásicos com benzonidazol anti-tripanososoma diminui a parasitemia, mas não interrompe as lesões destrutivas no coração do hospedeiro. Outros estudos (BRAGA e cols, 2000; LAURIA-PIRES e cols, 2000) revelaram, ainda que os animais tratados mantivessem a infecção críptica, que a rejeição das fibras cardíacas nos animais tratados requeria explicação convincente. A persistência da doença cardíaca nos animais tratados sugeriu a hipótese de transferência genética para explicar a patologia da doença de Chagas (Teixeira e cols, 1990). Em seguida, foi identificada a inserção de kDNA de *T. cruzi* no genoma de macrófagos peritoniais infectados, pelo método de hibridização *in situ* com sonda homóloga. Outros resultados demonstraram que somente seqüências de minicírculos do kDNA foram transferidas para o genoma de células em cultura (TEIXEIRA e cols, 1991; TEIXEIRA e cols, 1994). Adicionalmente, ARGAÑARAZ, em sua tese de doutorado

(1996) demonstrou que linhagens de macrófagos de camundongo adquiriram horizontalmente seqüências de minicírculos de kDNA ligadas preferencialmente a elementos retrotransponíveis LINE-1 do hospedeiro. Outro importante achado foi obtido por SIMÕES-BARBOSA (1999) quando observou que o kDNA pode alterar a expressão gênica das células hospedeiras. Associado a isto, SIMÕES-BARBOSA (2000) mostrou que o kDNA inserido foi mobilizado por um elemento LINE-1 ativo e transferido para a região codificante do gene p15. Essa integração foi mediada por um elemento retrotransponível (LINE-1), levando à inativação do gene p15 e ausência da expressão da proteína na célula hospedeira. O fator de ativação da polimerase II codificado pelo gene p15, tem a função de ativar substratos ou proteínas que se ligam ao DNA nuclear juntamente com outros transdutores de sinal do controle da divisão celular.

Recentemente, foi demonstrado que segmentos de minicírculos do kDNA do parasito são inseridos em regiões do genoma de coelhos ricas em SINEs, que apresentam também fragmentos com mais de 95% de identidade com LINE-1 (NITZ, 2001). Outro trabalho deste laboratório documenta que as integrações de kDNA ocorrem durante a infecção natural de pacientes chagásicos e reproduz experimentalmente eventos de transferência horizontal e vertical de kDNA em coelhos e galinhas (NITZ e cols, 2004).

I.3.10. Interação entre moléculas, células e organismos: um concerto na evolução dos seres vivos

O conhecimento científico dos tópicos percorridos nesta introdução avança aceleradamente. A compreensão desta complexa rede de interações entre moléculas, células e organismos tentam explicar a intrincada cadeia da evolução dos seres vivos. De fato, as mudanças e adaptações moleculares e celulares são, em grande parte, derivadas do contato natural entre organismos, propiciando endossimbiose e troca gênica. A compreensão desses sofisticados laços também pode auxiliar no entendimento de mecanismos patogênicos de doenças que afetam os seres vivos. Os resultados de experimentos conduzidos ao longo dos últimos quinze anos no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas sugerem que a transferência de DNA do *T. cruzi* para o genoma de hospedeiros vertebrados, corrobora a teoria simbiótica sobre evolução molecular, à medida que as inserções resultam nos descendentes modificados. A informação de que elementos

repetitivos de DNA permitam a transferência horizontal de genes e auxiliam, de diversos modos, no remodelamento do genoma, coloca este processo como uma das principais forças evolutivas.

Ainda da maior importância, nós também temos investigado se o conjunto do conhecimento já obtido conflui para explicar a patogênese da doença de Chagas. Como comentado, uma importante face destas interações evolutivas entre organismos se dá ao nível molecular. Também é evidente que a transferência de DNA pode levar as alterações no genótipo e no fenótipo do organismo hospedeiro. Todos estes resultados nos levaram a continuar a pesquisa visando aprofundar os conhecimentos sobre transferência gênica horizontal e vertical de kDNA do *T. cruzi* para aves refratárias à infecção.

I.3.11. O uso da galinha como modelo experimental

As aves são modelos importantes neste estudo, pois são refratárias à infecção por *T. cruzi*. Isto porque o uso deste modelo permite eliminar a persistência de infecção críptica e, então, o kDNA remanescente só poderia ser achado quando integrado no genoma hospedeiro.

Nós demonstramos previamente que as aves são susceptíveis ao *T. cruzi* somente nos primeiros dias do período embrionário. Após este período, a infecção é eliminada. Um evento de integração de kDNA poderia ocorrer naqueles poucos dias de replicação e sobrevivência do parasito nas células tronco do embrião de galinha. Este acontecimento resultaria na geração de galinhas adultas com a integração do kDNA em células somáticas e germinativas. A integração do kDNA nas células germinativas possibilitaria a transferência vertical da integração para a progênie dessas aves (NITZ e cols, 2004). Esse modelo permite analisar apenas a transferência vertical de DNA do *T. cruzi* para a progênie livre de infecção. A integração de kDNA do *T. cruzi* no hospedeiro, que desenvolve alterações patológicas subsequentemente indissociáveis da integração, favorece a elucidação do papel da auto-imunidade na patogênese da doença de Chagas.

1.3.12. Nota

A Editora-Chefa da revista *Cell*, procedendo de maneira unilateral, desautorizou o trabalho de Nitz *et alli*, (2004) um ano depois da publicação. A comunidade científica refutou o procedimento porque os “experts” da *Cell* não ofereceram aos leitores os seus dados experimentais que desautorizariam a publicação dos pesquisadores da Universidade de Brasília, aprovada por três revisores ao longo de mais de três anos de tramitação do processo de aceitação da pesquisa publicada. A revista tentou explicar sua decisão em editorial publicado no dia 21 de outubro de 2005 (*Cell* Editorial Controversy. Volume 123, Issue 2, 2005, Pages 173-175). No seu Editorial, a Editora-Chefa da revista convalidou os dados publicados, ficando dúvida apenas quanto aos “*sítios de integração das integrações de kDNA no locus da β -globina, podendo sugerir interpretação alternativa*” . O editorial da *Cell* não apenas deixou de apresentar dados experimentais em contrário como também deixou de informar qual seria a tal “*interpretação alternativa*” do trabalho. Mesmo se o dado da integração do kDNA no sítio da β -globina não fosse confirmado, ainda assim seria irrelevante para sua interpretação, pois, o principal eixo da interpretação é a associação entre as inserções introduzidas no genoma das aves com a patologia semelhante àquela descrita na doença de Chagas. Nada disso abateu o ânimo dos autores do trabalho, pois, ficou claro que a controvérsia pode ser resolvida pela apresentação de novos dados e informação oriunda de mais experimentação. Essa é a conduta preferida pelos autores do artigo da *Cell*.

Capítulo II

OBJETIVOS

II.1. Objetivo Geral

Considerando os aspectos anteriormente descritos, definimos como objetivo central do nosso trabalho verificar a integração de seqüências de kDNA no genoma de *Gallus gallus* nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* e demonstrar sua transferência vertical, via células germinativas, para a progênie na ausência da infecção.

II.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa são os seguintes:

- 1) - Padronizar um modelo de transferência gênica horizontal (TGH) de kDNA de *T. cruzi* para aves refratárias à infecção;
- 2) – Avaliar a transferência gênica (TGV) vertical pelo cruzamento de aves com inserção do kDNA no genoma;
- 3) – Identificar as seqüências de minicírculos de kDNA integrado em sítio específico do genoma das aves;
- 4) – Observar se as aves kDNA positivas, pertencentes às gerações F1, F2 e F3, com o kDNA integrado no genoma, apresentam lesões patológicas semelhantes àquelas da doença de Chagas.

Capítulo III

MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Modelo animal

Foi utilizada como modelo experimental a galinha (*Gallus gallus*), visto que este vertebrado é refratário ao *T. cruzi*, ainda que a infecção possa ser estabelecida nos primeiros dias de vida do embrião. Após esta fase, o parasito é eliminado do organismo. Ao eclodir, o pinto nasce sem a infecção, e isto faz com que a ave seja o modelo limpo para a análise da transferência horizontal de DNA. Ademais, o fato da infecção pelo *T. cruzi* ser viável apenas nos primeiros dias de desenvolvimento do embrião poderia resultar no parasitismo das células tronco embrionárias, possibilitando a transferência de kDNA via células germinativas. Estas aves mostrando integração de kDNA estariam livre do parasito. Este aspecto da interação do parasito com as aves explica porque foi usado este modelo, adequado para análise de transferência horizontal e vertical de minicírculos de kDNA.

III.2. Parasita

III.2.1. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* arquetipo Berenice (CHAGAS, 1909) foi mantido no Laboratório por sucessivas passagens em camundongos ou em cultura de células. As formas do *T. cruzi* cultivadas em diferentes meios de cultura foram usadas em diferentes experimentos. As formas tripomastigotas colhidas de cultura de células cardíacas murinas da linhagem L6, foram cultivadas em DMEM, pH 7,2, acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 250 mM de L-glutamina, sob atmosfera de CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C. As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (infusão de fígado e triptose) a 27 °C (NITZ e cols, 2004).

III.3. Inoculação de *Trypanosoma cruzi* em ovos férteis de galinhas

Ovos de galinhas, geneticamente selecionadas, da raça White Ross foram obtidos da granja ASA ALIMENTOS (Recanto das Emas – Distrito Federal). Os ovos desta raça

tinham índice de fertilidade de $86\% \pm 3\%$. A inoculação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi feita pela perfuração de um orifício de 1 mm de diâmetro na casca sobre a bolha de ar num dos pólos do ovo. As formas tripomastigotas, previamente quantificadas numa câmara de Neubauer, ressuspensas em 5µl de meio de cultura, foram injetadas na câmara de ar. Os ovos controle (mock) receberam somente 5 µl de meio de cultura. Os orifícios na casca foram selados com parafina derretida e os ovos foram imediatamente transferidos para chocadeira a 37°C e a 65% de umidade, com ciclo de rotação a cada 30 min. Os ovos eram inspecionados periodicamente por trans-iluminação num ovoscópio. Os embriões ou fetos mortos antes da eclosão do pinto, em diversos estágios, foram processados para a extração de DNA (SAMBOOK & RUSSEL, 2001). Sangue de uma veia das aves nascidas dos ovos infectados era usado como fonte de DNA para análises da integração do kDNA do parasito (NITZ e cols, 2004).

III.4. Grupos experimentais

O experimento iniciou-se com a inoculação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (tripos) em ovos fertilizados de galinhas da linhagem White Ross. Os ovos foram distribuídos em três grupos experimentais A, B e C que receberam o inóculo de 10, 100 e 1000 tripos, respectivamente. Cada grupo foi composto por 36 ovos-teste e 12 ovos controle e divididos em três subgrupos de acordo com o período de desenvolvimento embrionário em que se inoculou o protozoário (dia 0, 2º e 5º dias). Após a inoculação, selecionava-se regularmente 1 ovo do grupo controle (mock) e 1 do grupo experimental, ao longo do período incubatório de 21 dias, para extração dos tecidos dos embriões, obtenção do DNA e confecção de lâminas histológicas. Aguardou-se o desenvolvimento embrionário completo dos ovos restantes até o nascimento dos pintos. As aves resultantes deste experimento que se tornaram adultas eram cruzadas para produção das gerações subseqüentes (F1, F2, F3).

III.5. Exames eletrocardiográficos

As aves das gerações F0, F1 e F2 foram submetidas ao registro eletrocardiográfico mensal visando, particularmente, a avaliação da variação do eixo elétrico médio, sugestivo de aumento do coração. Um eletrocardiógrafo marca FUNBEC, ECG-4 de um canal foi

usado com padronização de 1mV/cm e velocidade de 25 mm/seg. O exame consistiu no registro das derivações padrões do plano frontal. Os animais foram postos em decúbito dorsal com restrição peitoral e sem anestesia. Os eletrodos relativos aos braços (aVR e aVL) foram posicionados na parte interna da asa da galinha após retirada das penas e limpeza da pele. Os eletrodos (aVF e o fio terra) foram posicionados na parte posterior das pernas, após limpeza. Além da avaliação do eixo elétrico médio por meio dessas derivações, analisou-se a frequência cardíaca e a possível presença de arritmias. Os dados foram comparados com os registrados em galinhas controle.

III.6. Obtenção de tecidos das aves

Aves kDNA-positivas dos grupos teste e kDNA-negativas dos grupos controles foram criadas no galinheiro, sob as mesmas condições experimentais. As aves que sucumbiam naturalmente eram submetidas à necropsia. Eram colhidos oito secções representativas de tecidos do coração e igual número do tubo digestivo (esôfago e intestino delgado e grosso), e duas secções representativas de músculo esquelético, fígado, baço e rins. Uma parte do tecido foi fixada em formol a 10% e, posteriormente, o tecido fixado foi emblocado em parafina para análise da histopatologia. Uma parte do tecido foi guardada a -80 °C e uma fração desta parte foi triturada, macerada, suspensa em solução de extração contendo proteinase K (100 µg/ml) para purificação subsequente do DNA (ver item III.7.3)

III.7. Extração de DNA

III.7.1. Extração do DNA de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T.cruzi* foram crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1.500 x g por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com TBS, ressuspenso em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células por ml de solução, em tampão de lise e incubado por 1 hora a 37°C. Após a incubação, foi adicionada proteinase K (100 µg/ml), seguida por incubação por mais 12 horas a 37 °C. A partir desta etapa, foram realizados dois tratamentos com clorofane (Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico; na proporção de 25: 24: 1) e uma com clorofil. (Clorofórmio: Álcool Isoamílico; na proporção de 24: 1). O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% (gelado) e com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, pH 4,7. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol

70% (gelado), secado e resuspensão no tampão TE. O DNA foi analisado e quantificado pela visualização em agarose a 0,8% após eletroforese em tampão TAE 1X. Aliquotas do DNA foram estocadas a 4 °C.

III.7.2. Extração de kDNA

A extração do kDNA de *Trypanosoma cruzi* para a produção de sonda (radioativa e de quimioluminescência) foi realizada seguindo a adaptação da metodologia descrita por PEREZ-MORGA & ENGLUND, 1993. Uma quantidade de 5×10^7 formas de cultivo foi colhida por centrifugação a $1.500 \times g$ por 15 min e o sedimento lavado duas vezes com PBS. Após isso, o sedimento foi ressuspenso em 630 μ l de tampão NET 100 (10mM de Tris-HCl pH 8,0; 100mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl) e as células lisadas com 71 μ l de SDS 10%. Em seguida, foram adicionados 7 μ l de proteinase K (20 μ g/ml) seguido de uma incubação a 37°C por 12h. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com ajuda de uma pipeta (P 1000). Então, foram acrescentados 690 μ l de tampão NET-100 com sacarose a 20 %. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 min. Depois, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta, deixando aproximadamente 30 μ l. Em seguida, adicionou-se novamente mais 690 μ l de NET 100 com sacarose 20 % e repetiu-se a centrifugação.

Depois da segunda centrifugação, o pellet foi ressuspenso em 1 ml de água destilada, seguindo-se duas extrações de clorofane e clorofil. O kDNA foi precipitado adicionando 2,5V (volumes) de Etanol 100% (gelado) e 0,1V de acetato de sódio 3M, pH 8,0. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspenso em 200 μ l de tampão TE. O kDNA foi digerido com *Eco* RI e o produto de digestão corrido em gel de agarose a 0,8% (p/v). Após, cortou-se a banda de kDNA linearizada (1,4 Kb) e eluiu-se em coluna de purificação (GFX PCR and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences). O kDNA foi mantido a 4°C.

III.7.3. Extração do DNA do tecido das aves adultas

A extração do DNA de tecidos das aves foi realizada de acordo com o método descrito por SAMBROOK E COLS, 1989. Após a coleta, 2 ml de sangue foram centrifugados a $1.300 \times g$ por 10 min, o plasma sobrenadante descartado e o sedimento

lavado por duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) a 3.500 x g por 15 min. O sedimento foi posteriormente ressuspensão em 5 ml de tampão de extração (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 % SDS). Sabe-se que as hemácias de aves são nucleadas, isto justifica a ressuspensão direta de todas as células sanguíneas com tampão de extração. Os tecidos foram macerados e depois incubados em tampão de extração por 1 hora, na proporção de 5 ml de tampão para cada miligrama de tecido. Após a incubação, adicionou-se proteinase K (100 µg/ml), seguido de incubação por mais 12 horas. O material (sangue ou tecido) foi então submetido ao tratamento, por duas vezes, com igual volume de clorofane, com posterior separação das fases orgânica e aquosa por centrifugação a 5000 x g por 10 min. Este tratamento com clorofane é feito para retirar proteínas do material. Este procedimento foi seguido pelo tratamento com igual volume de clorofil, e centrifugação a 5000 x g por 10 min. O clorofil retira o fenol da amostra. Todos os tratamentos foram feitos à temperatura ambiente e sob leve agitação.

O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% (gelado) e 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 4,7. Este material foi então colocado em incubação a 80 °C por 30 minutos e centrifugado a 12.000 x g a 4 °C, por 15 minutos. O sedimento resultante foi lavado por duas vezes com etanol 70 % (gelado), secado ao ar livre e ressuspensão em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O DNA foi analisado e quantificado com eletroforese utilizando tampão TAE (90 mM tris-acetato pH 8,0, 25 mM EDTA) em gel de agarose 0,8 % e estocado a 4 °C.

III.8. Análise do DNA

III.8.1. Extração do DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial de células competentes (*E. coli* XL10 Gold e JM 109), em pequena escala (miniprep, 1,5 ml de cultura bacteriana crescida em meio LB a 37 °C) foi feito seguindo o método de lise alcalina descrita por SAMBOOK and RUSSEL (2001). Uma colônia bacteriana foi transferida para um tubo falcon de 15 ml contendo 5 ml de meio LB líquido com 5 µl ampicilina na concentração de 5 µg/µl. Logo após, a cultura foi incubada por 12 horas a 37 °C sob agitação. Em seguida, 3 ml da cultura crescida foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min. O meio sobrenadante foi removido por aspiração ficando somente o pellet. Posteriormente, o pellet foi ressuspensão em 100 µl de solução I

(gelada) (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0). Em seguida, foi adicionado 200 µl de solução II (0,2 N NaOH; 1% SDS) e homogeneizado por inversão. Foi acrescentado 150 µl de solução III (5M de acetato de potássio; 11,5 ml de ácido acético glacial; 28,5 ml de água). O material foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Esse material foi então submetido ao tratamento com igual volume de clorofane seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionado igual volume de clorofil com posterior centrifugação a 14.000 rpm por 10 min. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100 % (gelado) e 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, pH 4,7 e em seguida, incubado por 30 min a -80°C e centrifugado por 15 min a 4°C. O sedimento resultante foi lavado por 2 vezes com etanol 70% (gelado), secado ao ar livre e ressuspensão em 50 µl de tampão TE.

Após a extração, os DNAs foram digeridos com a enzima de restrição *Eco* RI, onde se seguiu o protocolo indicado pelo fabricante (INVITROGEN). Os produtos digeridos foram aplicados em gel de agarose a 1 % para análise do tamanho do inserto.

III.8.2. Quantificação, digestão enzimática e eletroforese de DNA genômico das aves

As amostras de DNA genômico, extraído dos tecidos das aves, foram analisadas para avaliação de sua qualidade e integridade e quantificadas em gel de agarose 0,8% (p/v), em tampão TAE 1X, conforme descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

Para a digestão enzimática das amostras de DNA do genoma das aves, foram utilizadas as enzimas de restrição, *Eco* RI e *Mbo* I, fabricadas por INVITROGEN® ou PROMEGA®. A digestão foi feita em 50 µg de DNA, sendo utilizadas 2 a 3 unidades de enzimas para cada µg de DNA, em um volume final de 200 µl, seguida de uma incubação de 12 horas a 37°C. Após este período, o produto da digestão foi extraído com clorofane/clorofil e precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% (gelado), 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M pH 4,7 e lavado duas vezes com etanol 70 % (gelado). O sedimento resultante foi secado e ressuspensão em 50 µl de água Mili-Q. O DNA digerido foi então separado por eletroforese em gel 0.8% (p/v) e tampão TAE 1 X sob aproximadamente 50 Volts por 18 horas.

Com o término da eletroforese, o gel corado com brometo de etídio, submetido a luz ultravioleta, fotografado e transferido para membrana de nylon.

III.8.3. Southern Blot Genômico

Após a separação eletroforética, os 50 µg de DNA da reação de digestão enzimática foram transferidos do gel para membrana de nylon carregada (Hybond XL- Amersham Pharmacia Biotech). O gel de agarose foi inicialmente depurinado com solução de 0,2N de HCl por 10 min, seguido por dois enxágües com água destilada. Logo após, o gel foi tratado com a adição de 10 volumes de solução de desnaturação (0,4M NaOH) por 45 min, sob leve agitação e enxaguado com água por duas vezes.

Após os tratamentos no DNA, este foi transferido do gel para uma membrana de nylon através da técnica de transferência alcalina por capilaridade, descrita por SAMBROOK & RUSSEL (2001). A técnica consiste em utilizar uma solução de desnaturação (NaOH 0,4M) que, por capilaridade, transfere o DNA do gel de agarose para a membrana.

III.8.4. Southern Blot dos produtos de PCR

Após a separação eletroforética, com gel de agarose a 1 % (p/v) em tampão TAE 1 X, o DNA, produto de PCR, foi transferido para uma membrana de nylon carregada (Hybond-XL – Amersham Pharmacia Biotech) através do método de transferência alcalina SAMBROOK e RUSSEL (2001). A técnica consiste em desnaturar o DNA com solução alcalina (0,4M NaOH) por 20 min, sob leve agitação, seguida pela transferência por capilaridade do gel de agarose para a membrana, com a mesma solução alcalina. Após a transferência, o DNA foi fixado pela secagem da membrana, não sendo necessário os pulsos de luz UV.

III.8.5. Transferência de colônias de bactérias transformantes para membrana de nylon

Para a hibridização de colônias, foi usado o método de lise *in situ* das colônias bacterianas em membrana de nylon. Os clones de bactérias transformantes, obtidos durante a clonagem, foram desta forma, replicados para uma membrana de nylon colocada na

superfície de uma placa de petri contendo meio LB sólido com 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. O tratamento das membranas para o processo de hibridização foi realizado da seguinte forma: as membranas foram embebidas em papel de filtro contendo solução de lise (SDS 10 %) por 5 min, seguida de solução de desnaturação (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) por 5 min e solução de SSC 2 X por 10 min. Os plasmídeos expostos na membrana foram hibridizados com sonda específica de kDNA.

III.9. Sondas radiomarcadas e hibridizações

III.9.1 – Marcação de seqüências de DNA

Para a marcação das sondas radioativas, foi utilizado o Kit Random Primer Labelling System (INVITROGEN). Esta técnica consiste na inserção de um dos nucleotídeos marcados radioativamente [α -³²P] dNTP na seqüência da fita de DNA molde, a qual é sintetizada pela atividade polimerásica da enzima Klenow (fragmento da DNA polimerase I de *E. coli*) e pela presença de primers hexaméricos (random primers) que se ligam aleatoriamente na seqüência desejada iniciando a reação de polimerização (SAMBOOK & RUSSEL, 2001).

Inicialmente, 30 ng de DNA molde foi colocado em um volume final de 25 µg de água mili-Q seguido pela desnaturação a 100°C por 10 min e pelo imediato resfriamento em gelo. Foram adicionados 2 µl dos nucleotídeos dCTP, dGTP e dTTP e 15 µl de tampão contendo Randon Primer. Finalmente, foram adicionados 3µl de [α -³²P]dATP (3.000µCi) (Amersham) e 1 µl da enzima Klenow. Em seguida, esta reação foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 5µl de tampão de parada.

Após a parada da reação, a sonda foi purificada usando uma coluna Sephadex G50 e lâ de vidro. Este processo foi iniciado com a perfuração (com uma agulha) na parte inferior de um eppendorff de 0,5 ml, sendo posteriormente colocado lâ de vidro (peso) no fundo do tubo. Logo após, foi acrescentado 600 µl de Sephadex G50 sobre a lâ de vidro. Este tubo foi então colocado no interior de um eppendorff de 1,5 ml, seguida por breve centrifugação (spin). Finalmente, todo o volume da sonda foi adicionado sobre a coluna e centrifugado a 14.000 rpm por 5 segs. A sonda purificada foi mantida a -20°.

Para a quantificação, 1 µl de sonda purificada foi aplicada em um pequeno pedaço de papel de filtro Whatman número 1. O papel foi então colocado em um tubo ependorff de 1,5ml contendo 1ml de solução cintilizadora. O material foi finalmente quantificado em um medidor de radiação β (Liquid Scintillation Analyzer Packard). A atividade específica da sonda (apta para o uso) foi sempre maior que 10⁸cpm/µl de DNA.

III.9.2 – Hibridização

As membranas de nylon foram pré-hibridizadas com solução de pré-hibridização (6 X SSC, solução de Denhardt 5 X, 0,5% SDS, 100µg/ml de DNA de esperma de salmão) por 6 horas a 65°C. Após este período, as sondas foram desnaturadas a 100°C por 5 min e adicionadas à solução de pré-hibridização, onde ocorreu a hibridização por um período de 18 horas a 65°C. Em seguida, as membranas foram lavadas por duas vezes com SSC 2 X e 0,1 % SDS a 65°C por 15 min, seguidas de uma lavagem com SSC 0,1 X e 0,1% SDS a 65 °C por 15 min. Logo após, as membranas foram umidificadas com solução SSC 0,1 X e 0,1% SDS, revestidas no filme plástico PVC, fixadas em um cassete metálico e expostas a filme sensível a Raios-X (KODAK T MAT). Os cassetes foram então mantidos a -80°C por um período que variou de 18 horas a 7 dias (as hibridizações com Southern blot genômico são incubadas por um período que pode variar de 7 dias a 1 mês). Após este tempo, os filmes foram revelados por lavagens com 1 Litro de solução reveladora (Kodak) por 3 min sob leve agitação seguida por uma lavagem em água por aproximadamente 15 segundos e pela permanência por 1 min em 1 L de solução fixadora (Kodak) também sob leve agitação.

III.10. Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação de seqüências de kDNA e DNA nuclear de *T. cruzi*

Primers específicos para amplificação de minicírculos de kDNA e DNA nuclear de *T. cruzi* foram usados. Os conjuntos de primers S34/67 e S35/36 (STURM e cols, 1989) (Fig III.1) amplificam minicírculos de kDNA e os primers TcZ1/TcZ2 (MOSER e cols, 1989) amplificam regiões repetitivas do núcleo do parasita, produzindo fragmentos de seqüências de, respectivamente, 350 e 190 nucleotídeos, e seus catâmeros.

As seqüências dos conjuntos que amplificam kDNA utilizados são os seguintes: **S34:** 5' ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'; **S35:** ATA ATG TAC GGG (T/G)GA

GAT GC 3'; **S36**: 5' GGT TCG ATT GGG GTT G 3' e **S67**: 5' GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (C/C)(T/G)T C;. As seqüências dos primers que amplificam DNA nuclear são: **TcZ 1**: 5' GAC CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3', **TcZ 2**: CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3'.

As amplificações foram realizadas em termociclador modelo PTC-100 da MJ Research e seguiu as seguintes condições: 100 ng de DNA de galinha foram utilizados como molde sendo os reagentes empregados na reação pertencentes ao Kit de PCR da INVITROGEN: tampão de reação (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0 e 1,5 mM MgCl₂); 100ng de cada primer; 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Em todas as reações foram incluídos os controles positivos (100 µg de DNA de *T. cruzi*) e negativos (galinhas controle não infectadas). As reações de PCR foram programadas para os seguintes ciclos:

32 ciclos { 94°C/5min
94°C/30seg
T_m°C do primer/1min
72°C/1min
72°C/7min

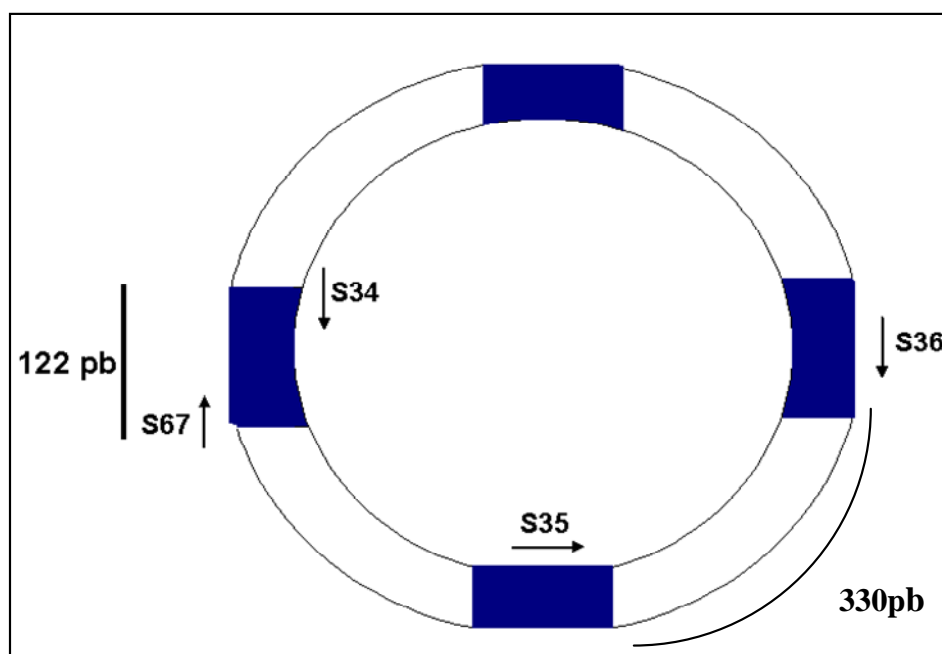


FIGURA III.1. Estrutura do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*. Podem ser observadas as quatro regiões conservadas (barras azul) separadas por regiões hipervariáveis. As setas representam os locais de onde foram derivados os *primers*

Posteriormente, foi feita a eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 1% (corado com 0,5mg/ml de brometo de etídio) e tampão TAE 1X. Após, estes produtos foram transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sondas específicas.

III.11. Clonagem

III.11.1. Clonagem em vetores plasmidiais e transformação em células competentes

Os DNAs amplificados por PCR foram clonados no vetor comercial pGEM-T easy (PROMEGA), conforme as instruções do fabricante. Estes vetores são produzidos pelo corte dos vetores pGEM[®]-5Zf(+) e pGEM[®]-T easy com *ECO* RV seguida pela adição de uma timina nas extremidades 3' (T-overhang) das duas pontas do DNA, isto facilita a ligação dos produtos de PCR pelo fato de algumas enzimas Taq DNA polimerase terem a capacidade de adicionar uma adenina às extremidades 3' dos produtos amplificados.

O protocolo de ligação do inserto ao vetor foi feito segundo as recomendações do Kit comercial pGEM-T Easy Vector Systems (PROMEGA). Após a ligação, o vetor é transformado em células competentes.

A seleção dos vetores, que contêm o inserto é baseada no rompimento do gene da β -galactosidase, presente na região de ligação do inserto no vetor. Desta forma, quando o inserto é adicionado ao plasmídeo (vetor), o gene da β -galactosidase é inativado dando origem, após transformação do plasmídeo na bactéria competente, às colônias brancas, quando estas são cultivadas em meio LB (sólido) com o substrato da β -galactosidase (X-gal). As colônias azuis não apresentam o inserto, indicando que o gene da β -galactosidase está ativo. Aliado a isto, estes vetores possuem gene para ampicilina, permitindo que apenas as bactérias que contenham os plasmídeos (transformantes) possam crescer em meio que contém o antibiótico.

O vetor pGEM contém diversos sítios de restrição. Estes sítios permitem a liberação do inserto quando este é colocado em contato com enzimas de restrição. Através desta característica, foi possível analisar o tamanho do inserto após a extração do DNA plasmidial.

III.11.2. Preparação das células competentes

A transformação é o processo no qual DNA exógeno (plasmídeo, bacteriófago) é inserido no interior de uma célula receptora. Nos processos de transformação, uma célula pode ser tratada para receber o plasmídeo sendo assim denominada célula competente. O tratamento induz a um estado transitório de competência nas bactérias receptoras, e, durante este período, elas estão aptas a receber DNA de uma variedade de origens (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As células competentes, usadas neste trabalho, foram preparadas de acordo com o protocolo de cloreto de rubídio, descrito no manual PROMEGA (Hanahan D. DNA Cloning, Volume 1, Glover D ed., IRL Press Ltd, London UK, 1985). Foram utilizadas duas linhagens de *E. coli* para a transformação: XL10-Gold (STRATAGENE) e JM109 (PROMEGA).

III.11.3. Transformação

Após a ligação do produto de PCR ao vetor, foi realizada a transformação. Neste processo utilizaram-se meios de cultura LB sólido e líquido (GIBCO-BRL) observando o seguinte protocolo: 4µl de ligação foi adicionado a 100µl de células competentes (XL10 Gold ou JM109) e incubadas no gelo por 30 min. Logo após, estas células receberam o choque térmico através da incubação a 42°C por 2 min, seguido imediatamente por incubação por 5 min no gelo. Adicionou-se 900 µl de meio LB líquido e as células cresceram por 1h e 30 min, a 37°C sob agitação de 225 rpm. Finalmente, as bactérias foram centrifugadas, ressuspensas em 200 µl de meio LB e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de X-Gal. As colônias brancas foram selecionadas para hibridização com sonda específica, os plasmídeos foram isolados e sequenciados do inserto.

III.12. Amplificação das regiões flangeadoras do kDNA integrado no genoma de Aves

Esta técnica de obtenção de regiões flangeadoras baseou-se na reação de 5'RACE descrita por RUDI e cols (1999), e consiste em uma primeira amplificação utilizando apenas um primer específico à seqüência desejada, sendo responsável pela amplificação em somente um sentido desta seqüência; podendo, nesta reação, ultrapassar os limites da

seqüência conhecida (região flanqueadora). Esta PCR produz apenas uma fita simples de DNA, a qual pode ser ligado a uma cauda poli-C. Uma nova amplificação é realizada, agora usando um segundo primer específico, mais interno que o anterior, e um outro primer que ancora na região da cauda poli-C. Esta reação dá origem a uma seqüência de DNA dupla fita que pode ser reamplificada, clonada e seqüenciada (Fig III.2).

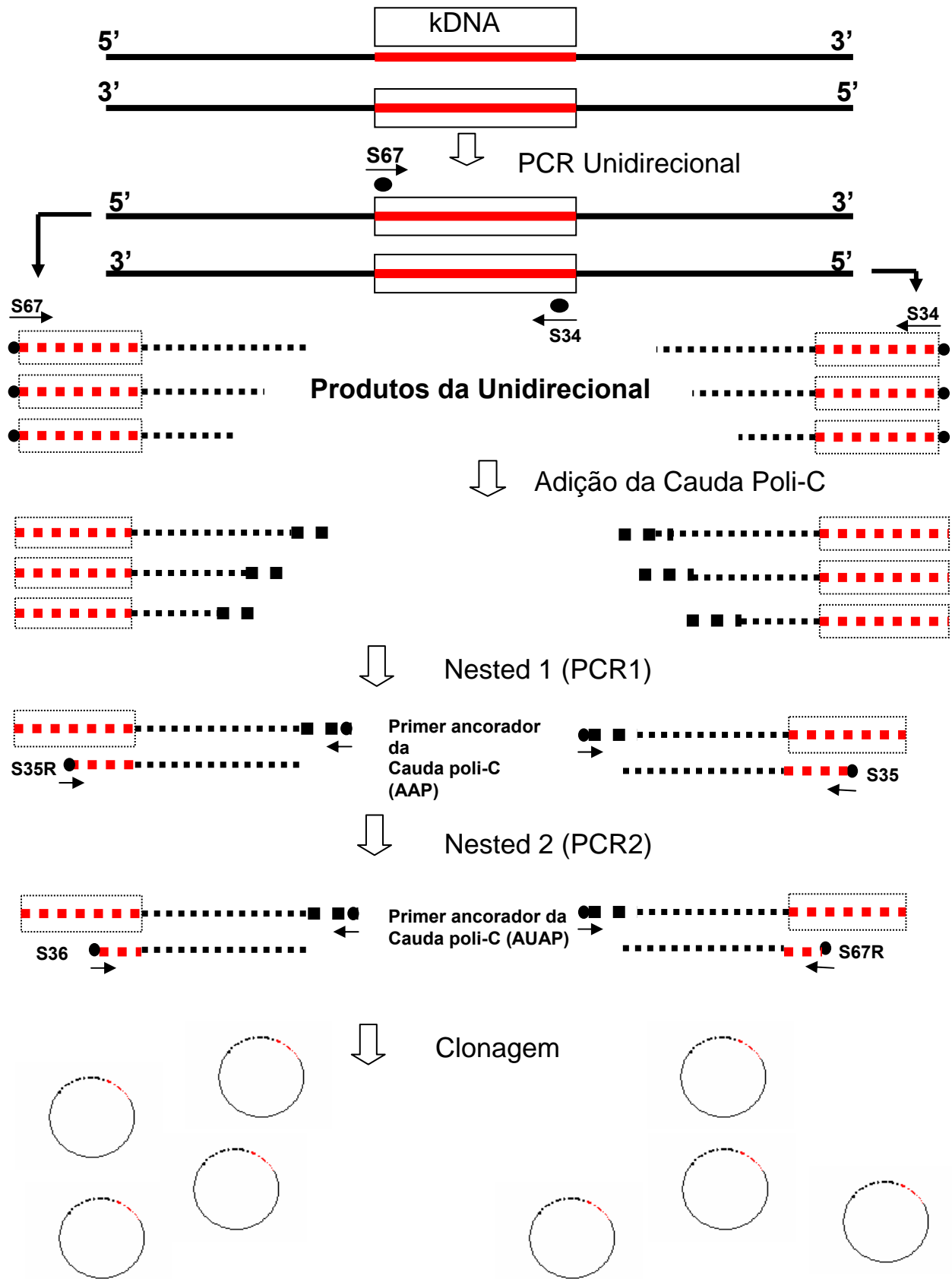


FIGURA III.2 – Representação esquemática da técnica de 5'RACE utilizada para a obtenção das regiões flangeadoras do kDNA de *T.cruzi* integrado no genoma de galinhas

Para este procedimento, foi utilizado 1 µg de DNA genômico do tecido de ave (sangue, coração) para a primeira reação de PCR, denominada unidirecional. Nesta etapa inicial, foi empregado somente um primer (S67 ou S34) externo à seqüência de kDNA. Dois Kits de Taq DNA polimerase foram testadas nas reações de 5'RACE, a Platinum Taq DNA Polimerase e a Platinum Taq PCRx (INVITROGEN). A enzima Platinum Taq PCRx foi escolhida por ter a capacidade de amplificar moléculas maiores de DNA além das seqüências repetitivas, sendo possível, desta forma, obter produtos de PCR com tamanho maior. As condições das reações de PCR foram as seguintes: 1 µg de DNA; tampão de amplificação 1X; tampão "enhancer" 1X; MgSO₄ 2,5mM; 100ng de primer; 0,2 mM de dNTPs e 5 unidades da enzima Platinum. A reação seguiu o seguinte programa:

25 ciclos {
95°C/5min
95°C/45seg
62 °C /1min
68°C/5min
68 °C/5min
4°C/...

O produto amplificado da PCR unidirecional foi purificado pelo tratamento com clorofane e clorofil (adicionou-se volume igual ao da reação de PCR). Em seguida, a amostra foi precipitada com 2,5V (volumes) de etanol 100% (gelado), 1/10V de acetato de sódio 3M pH 4,7 e 0,01V de glicogênio 2mg/ml. O DNA foi então incubado a -80°C por 1 h e centrifugado a 14.000 rpm por 30 min. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (gelado), secado e ressuspenso em 10 µl de água mili-Q.

Este DNA fita simples, foi então utilizado na reação de adição da cauda poli-C. Para isto, foi empregado a enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT (PROMEGA), que cataliza a adição repetitiva de mononucleotídeos (dNTP) na parte terminal 3'-OH do DNA. A reação ocorreu nas seguintes condições: 10µl de DNA purificado, 5 µl de tampão de reação (cacodilato 100 pH 6,8, 1mM CoCl₂ e 0,1 mM DDT), 2,5 µl de dCTP 2mM e 6,5 µl de água. A reação foi incubada a 94°C por 3 min e, posteriormente, foi adicionado 1µl da enzima TdT, seguida de uma incubação a 37°C por 10 min e a 65°C por 10 min para inativar a enzima.

O DNA, agora com uma cauda poli-C, foi utilizado como molde para uma nova reação de PCR (PCR 1), na qual foi usado um primer que se anela à cauda poli-C (AAP) e outro que se liga a uma região mais interna do kDNA (S35 ou S35R) (Fig III.2). Esta reação origina um DNA fita dupla. Nessa amplificação foi empregada as seguintes condições: 5µl do produto de adição da cauda poli-C (DNA molde), tampão de amplificação 1X; tampão “enhancer” 1X; MgSO₄ 2,5 mM; 100 ng dos primers S35 ou S35R e AAP, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A reação seguiu o programa abaixo:

35 ciclos {
95°C/5min
95°C/45seg
60 °C /45seg
68°C/3min
68°C/5min
4°C/...

Os produtos da PCR1 foram reamplificados (PCR 2) usando uma diluição de 1/100 do DNA produto, sendo novamente empregados primers mais internos ao kDNA (S67R e S36) e um segundo primer que se anela com a cauda poli-C (AUAP). As condições da PCR 2 foram as mesmas que as da PCR 1. Os produtos da PCR 2 foram separados em gel de agarose 1% e transferidos para membrana de nylon e hibridizadas com sonda específica para kDNA. Com a confirmação do sinal positivo, estes produtos foram ligados no vetor pGem T-easy, transformado para células competentes. Os clones resultantes foram hibridizados com sonda de kDNA. Das colônias positivas foram feitas minipreps e os insertos excisados, e os clones selecionados foram enviados para o seqüenciamento automático.

III.13. Seqüenciamento dos clones e análise em banco de dados

Para o seqüenciamento do DNA, oriundo dos clones e obtidos a partir do 5'RACE, utilizou-se seqüenciadores automáticos. Na análise dos insertos em banco de dados, foi utilizado o programa de pesquisa BLASTn – www.ncbi.nlm.nih.gov restringindo a pesquisa ao banco de dados do genoma da galinha (ALTSCHUL e cols, 1997).

III.14.Patologia

Órgãos inteiros ou fragmentos de tecidos obtidos durante as necropsias de aves kDNA-positivas ou kDNA-negativas eram fixadas em formol a 10% para a análise histopatológica. Eram recortadas 8 secções (2 x 2 cm) do coração, sendo duas de cada uma das aurículas na porção entre as veias cava à direita, e as veias pulmonares à esquerda. Eram tomadas também duas secções de cada um dos ventrículos. Foram tomadas 6 secções transversais do esôfago, do intestino delgado e do intestino grosso de cada ave. Adicionalmente, foram tomadas secções do fígado, rins, baço, órgãos genitais e tecido muscular das aves kDNA-positivas e dos controles negativos.

As secções dos tecidos eram embebidas em parafina e cortadas em secções de 5µm de espessura. As lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina eram examinadas ao microscópico óptico e fotografadas.

Capítulo IV

RESULTADOS

IV.1. Análise da integração de minicírculos de kDNA e nDNA no genoma de embriões de galinhas

A demonstração de kDNA nos pintos nascidos de ovos inoculados com *T. cruzi* foi feita com ajuda de dois conjuntos de *primers* (S34/67 e S35/36) que amplificam seqüências específicas de minicírculos. O DNA dos embriões que tinham a integração deu origem a produtos de amplificação com os *primers* S34/S67 no tamanho esperado de aproximadamente 122 pb, correspondendo a uma região conservada completa do minicírculo de kDNA. Os *primers* S35/S36 amplificaram seqüência de aproximadamente 330 pb, representando uma parte da região conservada, uma região variável inteira mais a metade da região conservada subsequente (STURM e cols 1989). Além disso, como era esperado, foi possível amplificar catâmeros daquelas bandas, em decorrência de quatro regiões de DNA altamente repetitivas nestes minicírculos (Fig III.1). Os produtos de PCR foram hibridizados com sonda radiomarcada de kDNA de *T. cruzi* Berenice para confirmação da especificidade das seqüências amplificadas.

O DNA nuclear (nDNA) do *T. cruzi* foi identificado com um conjunto de *primers* (TcZ 1/2) que amplificou seqüências microssatélites, altamente repetitivas no genoma do *T. cruzi* (MOSER e cols, 1989; REQUENA e cols, 1992). As ampliações geradas pelos *primers* TcZ 1/2 produziram fragmentos de aproximadamente 188 pb, além de seus catâmeros. A ausência do nDNA foi considerada como indicativo da inexistência da infecção.

Estes conjuntos de *primers* possibilitaram identificar seqüências de kDNA e de nDNA do parasito no embrião inoculado por formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Foram analisados 144 ovos fertilizados e inoculados com o parasito, em três grupos experimentais (A, B e C). Cada grupo foi formado por 36 ovos-teste e 12 ovos–controle. Constatou-se que o grupo B, onde os ovos foram inoculados com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, apresentou maior número de embriões kDNA-positivos. Quando os ovos deste grupo experimental eclodiram, deles nasceram pintos kDNA-positivos. No grupo A, com a inoculação de 10 formas tripomastigotas, verificou-se que, apenas o subgrupo A III

apresentou amplificação de kDNA no genoma de um pinto oriundo de ovo infectado. No entanto, no grupo C, em que os ovos foram inoculados com 1000 formas tripomastigotas houve morte dos embriões (Tabela IV.1).

A obtenção de tecidos dos embriões a cada dois dias do período embrionário, permitiu analisar a presença de kDNA e nDNA (infectados com 100 tripos) no genoma dos embriões em desenvolvimento até a eclosão dos pintos. Os DNAs extraídos dos tecidos embrionários coletados do segundo ao oitavo dia após a infecção, geraram seqüências amplificadas pelos *primers* de kDNA e de nDNA. Contudo, os DNAs oriundos de tecidos de pintos entre o décimo e o vigésimo dia pós-inoculação e incubação, tinham apenas o kDNA (Fig. IV.1). Estes dados indicam que houve eliminação do parasito do tecido dos pintos logo após o oitavo dia de crescimento intra-ovo, pois não foi possível amplificar o nDNA a partir do décimo dia de vida embrionária. Em contraste, o kDNA foi amplificado de DNAs extraídos de embriões e de pintos durante toda a fase de incubação até o vigésimo dia. Este resultado sugeriu que teria havido a integração de seqüências de minicírculos de kDNA no genoma da ave, possivelmente no período em que as formas intracelulares do *T. cruzi* multiplicam-se nas células dos folhetos embrionários, durante a primeira semana da incubação. Em resumo, o nDNA foi detectado somente em embriões de até oito dias de incubação de ovos inoculados com o *T. cruzi*. Não foi possível amplificar o nDNA dos pintos nascidos de ovos inoculados com *T. cruzi* (Tabela IV.1).

TABELA IV.1

Transferência de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para embriões de galinhas

Grupo experimental	Ovos inoculados	Número de <i>T. cruzi</i>	Dia da inoculação*	Morte embrionária	Embriões		Galinhas		
					nDNA ^a	kDNA ^b	nDNA ^a	kDNA ^b	
A	I	12	10 ¹	0	2	0/6	0/6	0/4	0/4
	II	12	10 ¹	2	3	0/5	0/5	0/4	0/4
	III	12	10 ¹	5	3	0/5	0/5	0/4	1/4
	Controle	12	ausente		3	0/6	0/6	0/6	0/6
B	I	12	10 ²	0	2	2/5	2/5	0/5	2/5
	II	12	10 ²	2	1	3/7	3/7	0/4	3/4
	III	12	10 ²	5	4	1/4	1/4	0/4	1/4
	Controle	12	ausente		1	0/7	0/7	0/4	0/4
C	I	12	10 ³	0	5	0/3	0/3	0/3	0/3
	II	12	10 ³	2	7	0/4	0/4	0/0	0/0
	III	12	10 ³	5	7	0/4	0/4	0/0	0/0
	Controle	12	ausente		5	0/3	0/3	0/3	0/3

* Dia do desenvolvimento embrionário em que os tripomastigotas de *T. cruzi* foram inoculados intra-ovo.

a) Resultado da amplificação de DNA nuclear de *T. cruzi* usando os primers TcZ1/2

b) Resultado da amplificação de kDNA de *T. cruzi* usando os primers S34/67 e S35/36

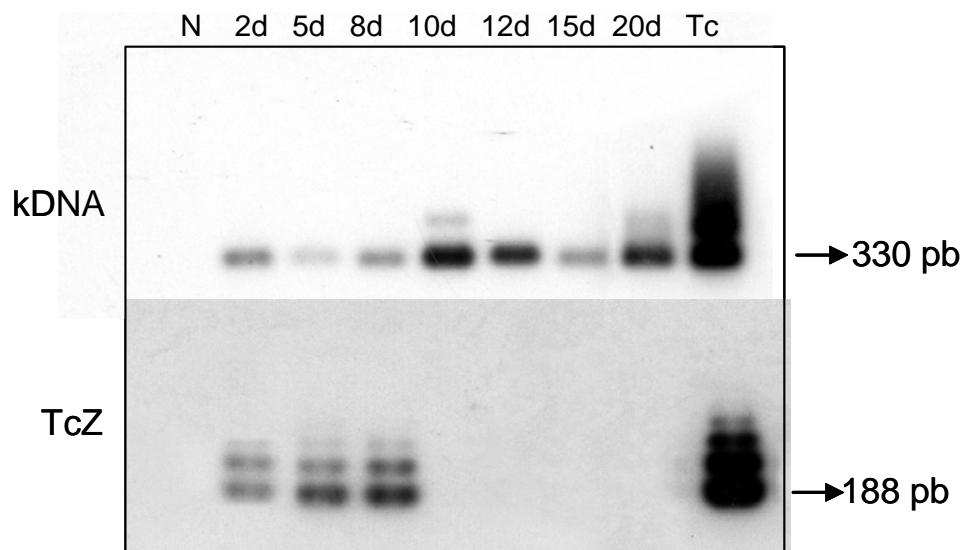


FIGURA IV.1. Hibridização dos produtos de PCR amplificados com os *primers* S35/36 (kDNA) e TcZ1/2 usando tecidos de embriões de aves infectadas com 100 tripomastigotas. N) DNA controle de embrião de pinto nascido de ovo sem a infecção; 2d, 5d, 8d, 10d, 12d, 15d, 20d) dia da colheita do DNA de embriões de ovos inoculados com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi*; Tc) DNA de *T. cruzi*. A sonda específica para kDNA foi obtida de minicírculos de kDNA purificado de formas epimastigotas do *T. cruzi*. A sonda de nDNA foi o produto de amplificação do DNA nuclear de *T. cruzi* com os primers TcZ1/2.

IV.2. Persistência das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma da galinha

As aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* foram avaliadas para documentar a persistência de seqüências de minicírculos de kDNA ou de nDNA do protozoário durante a vida adulta do animal. O DNA genômico foi obtido de alíquotas de sangue ou de tecidos colhidos após a morte natural da ave. Sangue, coração, músculo esquelético, fígado, rim e baço foram os tecidos usados para extração do DNA. Os resultados obtidos de amplificações por PCR de kDNA e nDNA dos tecidos das aves adultas seguiram os mesmos padrões e aspectos descritos para os embriões e pintos. Foi detectada a presença de minicírculos de kDNA no genoma de 46% das aves nascidas de ovos infectados com 100 tripomastigotas do *T. cruzi*. A permanência do kDNA no genoma das aves adultas foi

também demonstrada pelo Southern blot e hibridização com sonda específica. A presença de bandas de aproximadamente 20 kb (Fig IV.2) no DNA de células germinativas digerido com *Eco* R1 sugere que o kDNA estava integrado no genoma das aves. A integração do kDNA persistiu ao longo da vida de cada uma das aves.

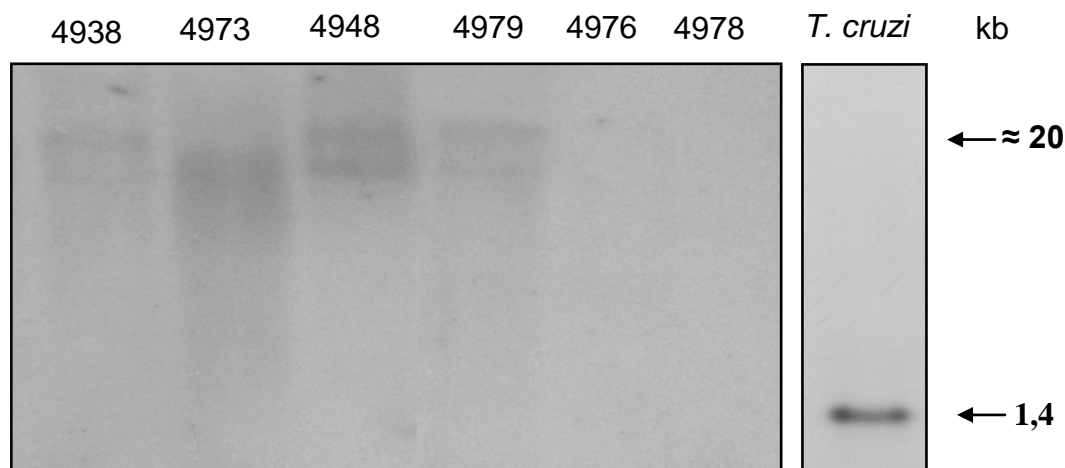


FIGURA IV.2. Identificação de integrações de kDNA no genoma de aves F0. Análise pelo Southern Blot do DNA extraído de esperma e óvulos digerido com *Eco* RI em gel de agarose a 0,8%. As aves 4938, 4973, 4948, 4979 nascidas de ovos inoculados com 100 formas tripomastigotas exibem bandas de alto peso molecular (aproximadamente entre 18 e 20 kb). As aves 4976 e 4978 nascidas de ovos controles, não inoculados com *T. cruzi*, não formaram bandas com a sonda específica de kDNA. O DNA controle do *T. cruzi* formou uma banda de 1.4 kb.

Para determinar se as aves nascidas de ovos infectados com *T. cruzi* possuíam kDNA integrado em suas células germinativas, foi colhido esperma dos galos 4938 e 4965 e óvulos não fertilizados do ovário das galinhas 4973 e 4948, do grupo inoculado com 100 tripes. Após a extração de DNA foi realizada a amplificação das seqüências de kDNA e DNA nuclear. Os produtos de amplificação por PCR com os pares de primers S35/36 e TcZ1/2 foram transferidos para uma membrana de nylon, a qual foi hibridizada com sondas específicas para kDNA ou para nDNA. Como se pode observar na figura (Fig.IV.3), os DNAs extraídos das galinhas nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* hibridizaram apenas

com os produtos amplificados com os primers de kDNA. As células germinativas das galinhas controle (4963 e 4964) não tiveram produtos de amplificação com os primers de kDNA.

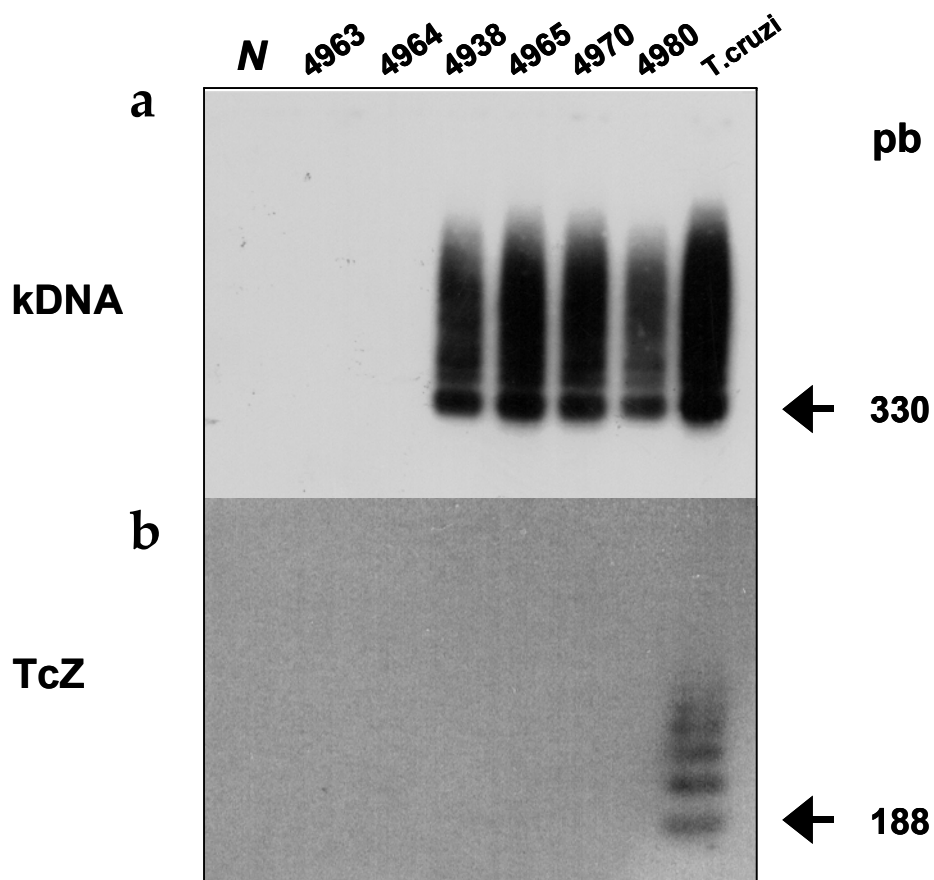


FIGURA IV.3. Amplificação de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas de galinhas. Hibridização das bandas de kDNA (a) e DNA nuclear (b) amplificadas por PCR utilizando como molde o DNA de esperma (4938 e 4965) e óvulos não fertilizados (4970 e 4980) de galos e galinhas infectados experimentalmente. As aves não infectadas 4963 (esperma) e 4964 (óvulo) foram utilizadas como controle. As setas indicam os pesos moleculares das bandas amplificadas por PCR: 330 pb (kDNA) e seus catâmeros, 188 pb (nDNA) e seus catâmeros. Sondas específicas de kDNA e de nDNA foram usadas na identificação dos produtos de amplificação pela PCR com primers específicos para os DNAs (vide Material e métodos).

Os resultados destes experimentos são consistentes com a integração de seqüências de minicírculos de kDNA no genoma de células somáticas e, também, de gametas de machos e fêmeas, na ausência de infecção ativa. Os resultados indicam o sucesso da integração de seqüências de minicírculos de kDNA nas células embrionárias das aves e da persistência desta integração na vida adulta destes vertebrados.

IV.3. Cruzamento das galinhas nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* e positivas para kDNA

A criação de galos e galinhas kDNA-positivos permitiu o cruzamento e a investigação da transferência vertical de minicírculos de kDNA nas progênes. Neste experimento, o galo kDNA-positivo 4938 cruzou com galinhas kDNA-positivas 4973 e 4948, resultando em doze aves que compuseram a geração F1 (Fig IV.4). O DNA molde das células do sangue dessas aves permitiu amplificação de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* com os primers específicos. Os produtos de amplificação foram transferidos para uma membrana de nylon e hibridizados com sonda de minicírculos de kDNA. Todas as aves desta geração tiveram amplificação de seqüências de minicírculos que formaram bandas no Southern blot com sonda apenas de kDNA. O resultado é consistente com a transferência vertical de minicírculos de kDNA da geração parental para a prole (Fig. IV.5a).

O endocruzamento de aves da geração F1 resultou no nascimento de 23 pintos da geração F2. Foi utilizado o mesmo método descrito acima para a verificação da presença de minicírculos de kDNA no genoma das aves desta geração. Como se pode observar pela figura IV.5b todos os animais F2 também tiveram amplificação positiva para kDNA e negativa para nDNA. Resultados idênticos foram observados na prole resultante do cruzamento da geração F2 para obtenção de 13 animais da geração F3 (Fig. IV.5c).

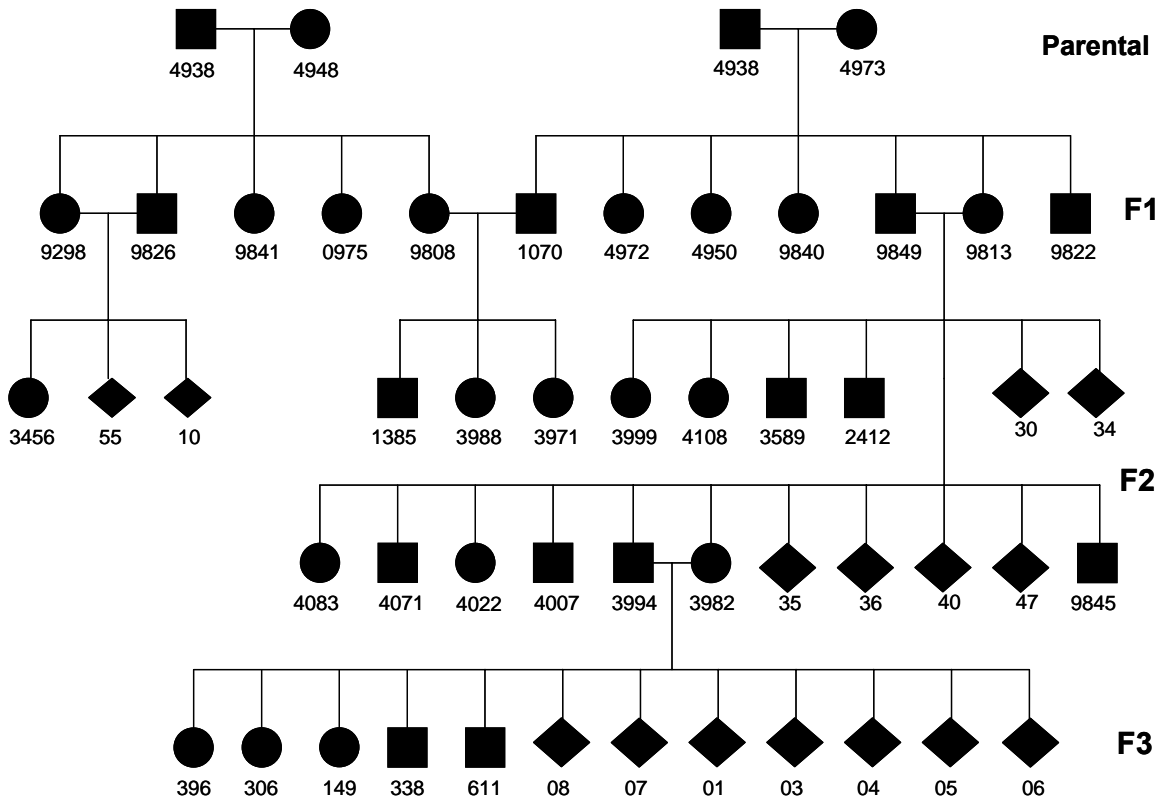


FIGURA IV.4. Heredograma mostrando transferências horizontal e vertical de seqüências de minicírculos de kDNA integrado no genoma de aves. Geração F0 (parental) mostrando crias resultantes do cruzamento do galo parental kDNA-positivo 4938 com a galinha kDNA-positiva 4948 produzindo cinco aves da geração F1 com kDNA integrado. Também o cruzamento do galo 4938 com a galinha kDNA-positiva 4973 deu origem a sete aves kDNA-positivas. Os cruzamentos de aves F1 (9298 e 9826, 9808 e 1070, 9849 e 9813) resultaram em 23 aves kDNA-positivas (geração F2). Similarmente, o cruzamento de aves F2 produziu 12 progênes F3 kDNA-positivas.

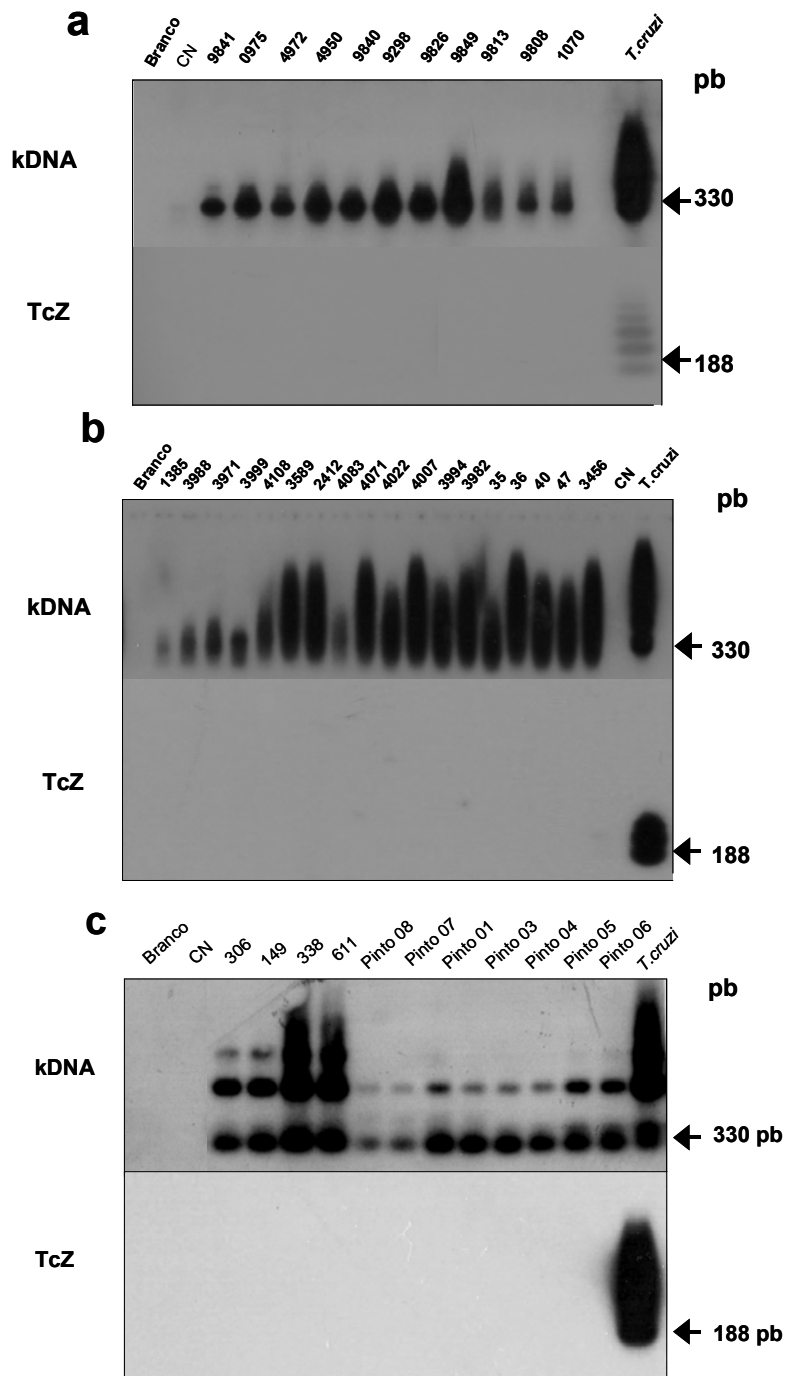


FIGURA IV.5. Demonstração da persistência do kDNA e da ausência de DNA nuclear nos tecidos das progênes de aves nascidas de ovos infectados com *T. cruzi* (a,b,c). Amplificação com *primers* de kDNA e DNA nuclear de seqüências moldes nos tecidos de aves da geração F1(a), F2(b) e F3(c) e hibridização de bandas com a sonda específica. As setas apontam pesos moleculares das bandas amplificadas por PCR. No experimento controle o DNA foi extraído de aves nascidas de ovos não infectados com *T. cruzi*.

Adicionalmente, foi feito o cruzamento do galo kDNA-positivo 4979 com as galinhas controle, kDNA-negativas 4976 e 4978 visando a detectar a frequência da transferência vertical de kDNA, para avaliar a importância da herança paterna da inserção do kDNA integrado. Este cruzamento gerou seis aves kDNA-positivas da geração F1 e quatro da geração F2, indicando assim que o kDNA integrado pode ser herdado de apenas um dos indivíduos parentais (Fig. IV.6).

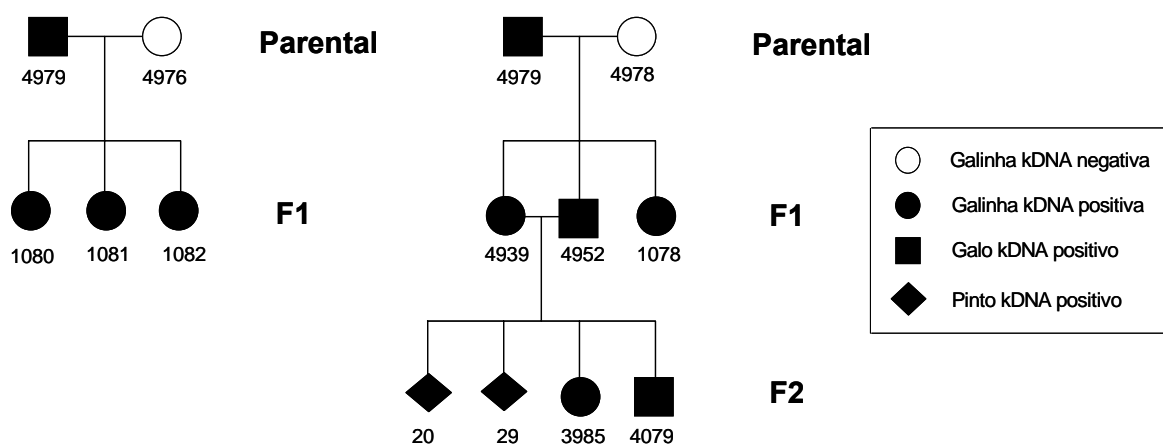


FIGURA IV.6. Heredograma mostrando cruzamento do galo parental kDNA-positivo 4979 com a galinha kDNA-negativa 4976 e geração de três aves kDNA-positivas. Similarmente, o galo 4979 cruzou com a galinha 4978 dando origem a três aves F1 kDNA-positivas. O cruzamento de aves F1 também resultou em prole F2 kDNA-positivas.

Após a morte das galinhas pertencentes às gerações F1, F2 e F3, foram retirados tecidos (coração, músculo, intestino e fígado) para análise do kDNA integrado persistentemente no genoma. Os tecidos analisados de todas as gerações confirmaram amplificação positiva para kDNA e negativa para DNA nuclear, mostrando que apenas o DNA mitocondrial ficou retido no genoma das aves. Estes resultados sugerem a ocorrência de transferência vertical de minicírculos de kDNA para as progênie de três gerações, via células germinativas (Fig. IV.4).

IV.4. Análise da configuração do kDNA integrado nas progênes

Uma averiguação sobre a configuração apresentada pelo kDNA de *T. cruzi* inserido no genoma das aves F1, F2 e F3 foi feita com auxílio do Southern Blot; neste experimento, 50 µg de DNA dos tecidos das galinhas (coração, músculo e sangue) foram digeridos com *Eco* RI e *Mbo*I e em seguida separados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com sonda de kDNA de *T. cruzi* marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (vide materiais e métodos). O mesmo método foi utilizado para o controle negativo (ave kDNA-negativa pela PCR).

A digestão do DNA do *T. cruzi* por *Eco*RI resultou em uma banda de 1,4 kb que corresponde ao tamanho do minicírculo linearizado, pois essa enzima contém somente um sítio de clivagem no kDNA. Este padrão diferiu dos encontrados nas digestões do DNA das aves utilizando a mesma enzima, pois foram encontradas bandas de aproximadamente 20 e 18 kb nas amostras obtidas do coração de galinhas da geração F1, F2 e F3. A digestão com *Mbo*I do DNA dos mesmos tecidos, diferentemente de *Eco* RI, originou bandas menores porque esta enzima produz múltiplas clivagens no DNA da ave. Quando se digeriu *T. cruzi* com *Mbo* I, obteve-se uma banda correspondendo ao minicírculo linearizado de 1,4 kb, visto que esta enzima corta o kDNA em apenas um sítio. A variação do perfil de bandas de acordo com as distintas enzimas usadas para a digestão do DNA sugere a ocorrência de integração em várias cópias do kDNA de *T. cruzi* no genoma das aves. Os resultados de *Southern Blot* como DNA das galinhas estão ilustrados na figura IV.7.

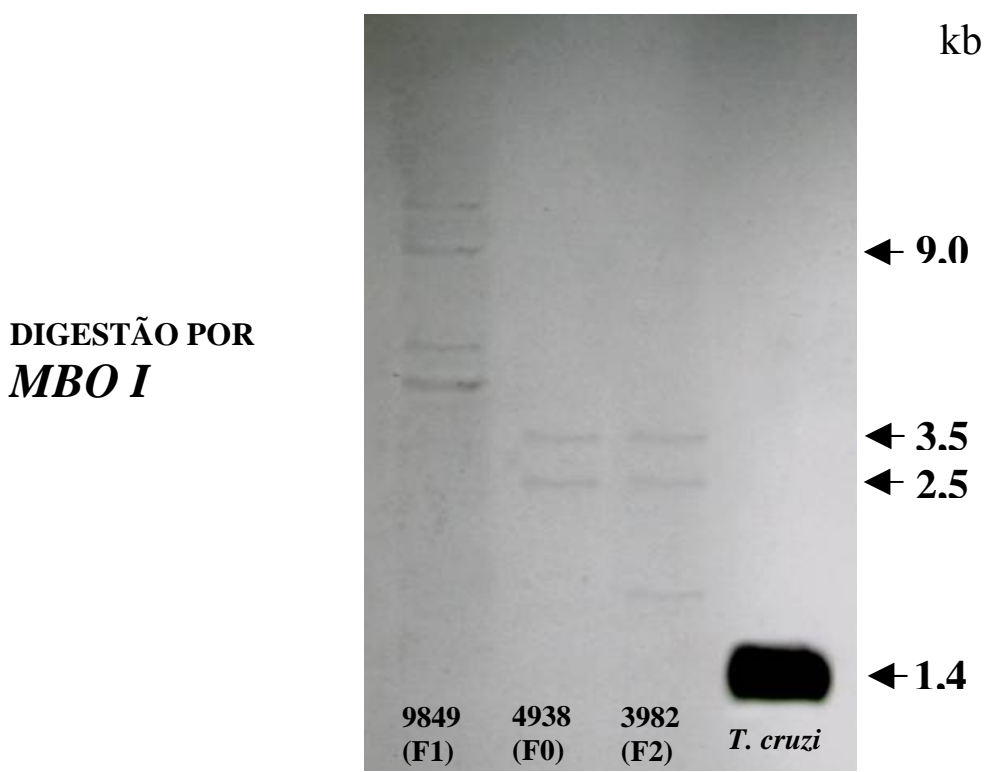
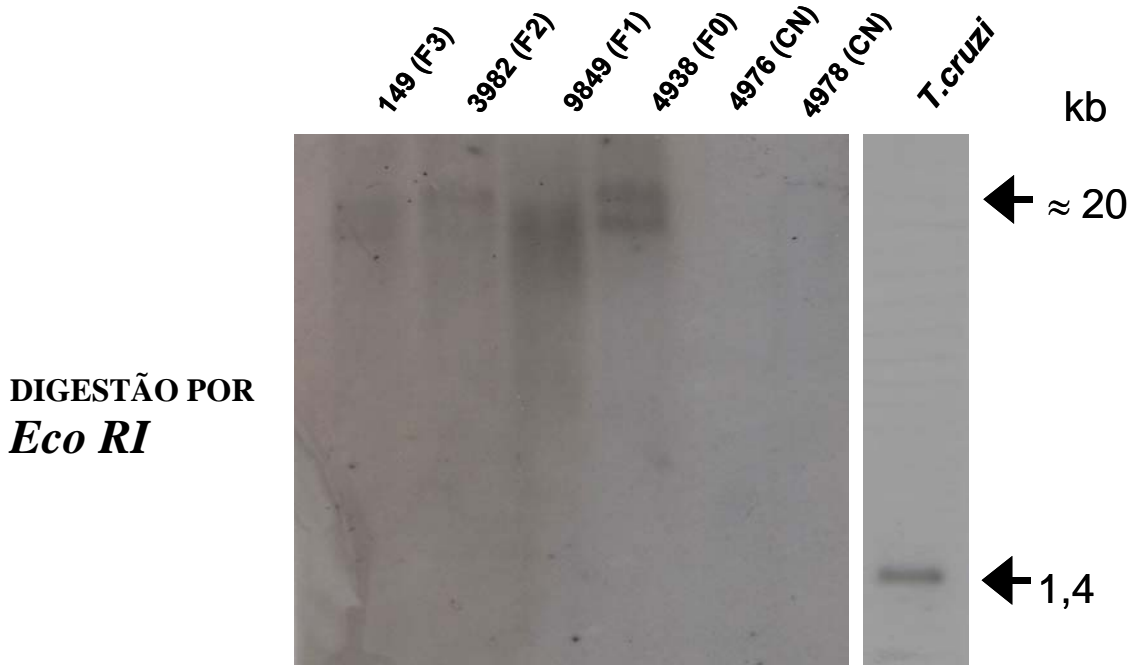


FIGURA IV.7 – Southern blot mostrando integração do kDNA no genoma de aves (a) DNA digerido pela *Eco RI*. (b) DNA digerido pela *Mbo I*. As bandas de kDNA foram reveladas por sonda específica.

IV.5. Obtenção das seqüências flanqueadoras ao kDNA integrado no genoma de aves

A busca das seqüências nas regiões flanqueadoras do kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma das aves foi realizada com uma metodologia baseada na técnica do 5'RACE descrita em materiais e métodos. Com o emprego desta técnica, foi possível analisar os sítios de inserção do kDNA e as seqüências justapostas no genoma das aves.

A partir do DNA do coração e do sangue de aves kDNA-positivas de cada geração (F0, F1, F2 e F3), foram obtidos clones com diversos tamanhos. A análise de homologia das seqüências em banco de dados revelou alta identidade com seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Contudo, em grande parte desses clones foi possível localizar somente os fragmentos de kDNA rearranjados (Tabela IV.2 e Fig IV.8b e c). Ainda que esses clones não tenham a região de justaposição no genoma da ave, pode-se sugerir que a explicação para o encontro do kDNA na ave adulta F0 e na progênie F1, F2 e F3 é dada pela integração.

Foi possível em alguns casos (2,5%), identificar o DNA hospedeiro flanqueando o kDNA (Fig IV.8a). Desafortunadamente, algumas dessas seqüências não apresentaram alinhamento significativo com seqüências de banco de dados. Esta observação levou-nos a suspeitar da ocorrência de rearranjo também no DNA do hospedeiro flanqueando o kDNA, pois a dificuldade no sequenciamento e identificação das homologias das regiões de inserção do kDNA no genoma das aves pode estar relacionada com a presença de elementos repetitivos, diretos e invertidos, que geram alta instabilidade do DNA e que estão presentes nos fragmentos de kDNA e do DNA do hospedeiro na região de justaposição nos sítios de integração no genoma da ave (Tabela VI.2).

Tabela IV.2. Descrição das características dos clones obtidos pela técnica do 5'RACE

Descrição	Número de clones	Porcentagem	Características
Clones somente com kDNA rearranjado	240	66%	Alta identidade para kDNA Exemplo na figura IV8b, c
Clones rearranjados devido a problemas com a amplificação por 5'RACE ou rearranjo nas células competentes	112	31%	Clones com múltiplas caudas poli-c, sem kDNA ou com múltiplos insertos
Clones rearranjados com região flanqueadora não identificada	10	2,5%	Região flanqueadora sem alinhamento significativo Exemplo na figura IV. 8a
Clones com região flanqueadora identificada	2	0,5%	Alta identidade com elementos CR1 de galinha Figs. VI. 9,10 e 11

IV. 8 a, b, c: Seqüências originadas do genoma de aves kDNA-positivas sem região flanqueadora

a) Seqüência P101: 833 bp;

```

1      GGCCACGCGT GCAACTAGTA CGGGGGGGGG GGGGGGAAAA TCCGAAAAGT TGGAGATTCT
61     CACCCCGAAC ATAAAGAAGA GCGTGCAAAC TTCCCCCAGG TACATTATAA TCAGGCGGAA
121    TCATCCCCCC GNTACAATTA TGACAGGGGG CATCTCACCC CGGTACATTA TACAAGGGGC
181    ATTCTCCCCC GGTACAGTTA TACCATGGGC ATTCTCACCC CGTAACAATA TACAAGGGCA
241    TCTCCCCCGT ACATTATACA GTGGGCATCT CCCC CGGTTA CATTATGCAT GGGCATCTCC
301    CCCGTACAGT TATACATAGG GCATCTCACC CGTTACATTA TACAGAGGGC ATCTCACCCC
361    GTACATTATA CATGGGCATC TCACCCCGTA CATTATACAA GGGCATCTCA CCCC GTACAT
421    TATACATGGG CTATCTCACC CGTACATTAT ACATGGCATT CTCCCCCGTA CATATATACA
481    AGGGCATTTC CACCCCGTAC ATTATACATG GGCATCTCCC CCGTACATTA TACATGGGCA
541    TTCCTCACCC GTACATTAAT ACATGGGCAT CCCACCCCGT ACATTATACA TGGGCGTCTC
601    ACCCGTACAT TATACATGGG CATCTCACCC GTACATTATA CATGGGCATC TCACCCGTAC
661    ATTATACATG GGCATCTCAC CCGTACATTA TACATGGGCT ACTCACCCGT ACATTATACA
721    TGGCATCTCC CCCGTACATT ATACATGGGC ATCTCACCCG TACATTATAC ATGGCATCTC
781    CCCC GTACAT TAT

```

FIGURA IV.8a. Exemplos de seqüências oriundas do genoma de aves com kDNA do *Trypanosoma cruzi* integrado. (a) Seqüência rearranjada obtida por 5'RACE sobre o DNA da galinha F0 (4973). Em magenta, a cauda poli C onde ancora o primer AUAP; em verde, segmento de DNA sem homologia em banco de dados; em azul claro, região variável do kDNA; em azul escuro, região conservada.

b) Sequência P59: 363 bp;

```
1      GCATCTCACC AGTGCCATTA TAGGGTTCAA TTTGAGGGGT GCGTTAACC GGGAGCGTGG
61     GGTTCGATCG GGGGTTGGTG TGAGGTATGG TTCGATTGGG GTTGGTGGTT CGAATGAAGG
121    TTGGTGGTTC GGAATTGGGG GTTGGTGGTT TGAATCGGGG TTTGGGGGGT TCGATTGGGG
181    TTTGGTGCAT TCTAAACCCG CGCATTATAT GGTCAATTTA GGGGGTGGCG TTTACCCCGG
241    TAGCGTGTGG TCTCGATTTC GGGTTGGTGG GTCCTGATCC GAAATTGGTG GTTCCGATTT
301    GGGGGTTGTG TGGAAGGCTA TACAAGATCC CCCCCCCCCC CCGTACTAGT CGACGCCGTG
361    GCC
```

c) Sequência 163 - T7b: 530 bp;

```
1      ATAATGTACG GGTGAGATGC CCATGTATAA TGTACGGGGG AGATGCCCAT GTATAATGTA
61     CGGGTGAGAT GCCCTTGTAT AATGTACGGG TGAGATGCCC ATGTATAATG TACGGGTGAG
121    ATGCCAACAT TGCTGATGAG ACGGTCAAGC GATTGTCCCA ACTTCAGTGG GACGAAGCCT
181    CACTCATGAA GGAGGCAGGG TGGTTGTGGA CAAGCCTAGG TGTACCAATC ACCTCCTTCC
241    ACAAGGAGAG GCCCCCCCCC CCGTACTGTC GACGCGTGGC CAGTACTAGT CGACGCGTGG
301    CCA GTACTAGTCG ACGCGTGGCC
```

FIGURA IV.8 b e c. Exemplos de seqüências oriundas do genoma de aves com kDNA do *Trypanosoma cruzi* integrado. (b) Seqüência rearranjada obtida por 5' RACE sobre o DNA da galinha F1 (0975). Em azul escuro, fragmento de região conservada do kDNA; em azul claro, região variável; em magenta, a cauda poli C. (c) Seqüência de kDNA da galinha F1 (4950). A região conservada do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* está identificada em azul escuro; em azul claro, a região variável; em magenta, a cauda poli-C.

A confirmação de que as seqüências de minicírculos do kDNA exibidas na Figura IV.8 acima estão verdadeiramente integradas no genoma das aves foi dada por outros clones analisados a seguir. A Figura IV.9 e IV.10 exhibe seqüências oriundas do genoma de aves kDNA-positivas, onde o sítio da integração foi demonstrado em justaposição ao DNA do hospedeiro. Por exemplo, o clone C43, oriundo do DNA da ave F0 (4938), mostrou uma região de justaposição com alinhamento de 98,70% de identidade com elementos retrotransponíveis CR-1 do cromossomo 4 da galinha (Fig IV.9 a, b).

IV. 9. a, b: Sequência originada do genoma de aves F0 kDNA-positivas com a região flaqueadora

a)

Sequência C43 New: 573 bp;

```

1      ATCATGCATC TCCCCCGTAC ATTATTTACC TGAAAATGGG GTACGTTTGC GGGAGGTGGG
61     GTTCGATTGG GGTGTTGTA ATATAGGGGC AGTAAGATTG TGAGTTTAAAT TATGTAATAA
121    CCTATTAATA AGTTGTGTGA TTATTTGGTA GATTCGTGTT ATCAGTTTGT GTAAGTTGTG
181    TATACTGTGT ATAACCGTTA TTAAAGTTAG TTAAGTGTAT TCATTTGGGG TTTGAGTGTG
241    TAATGGTGTG GAGGTGTAAT GGTGTGTTGG GTTATGTGTG TTATTTGATA ATAAAAATTG
301    GGGTTTGAAA ATCCTGAAGG TTTGGTTTTG GGAGGGGGCT TCTAACAGAG AGGACATCTC
361    ATAGCTGATC CTAAAGGCAG AGCTGAAAAA AAGTTGGATA CACTTACTAA GGTTGCTATT
421    ATGTGATCTC AATTGAAATC TTGATTGTGG AAATTGCACC ATTGAGGAAA GGCTGAAAGC
481    TTCCGAGCCT CTGCTTTGAA AGGAAGCTCC AAACCTGAA AGAAAGTAAA TGAGACTCAG
541    TTCCTGATAC TGACAGTTTA GGACCGCGGA GGGCCCCCCC CCCCCCCCCC GTACTAGTCG
621    ACGCGTGG CC
  
```

b) Homologias do clone C 43 com kDNA do *Trypanosoma cruzi* e com elemnto CR-1 de galinhas

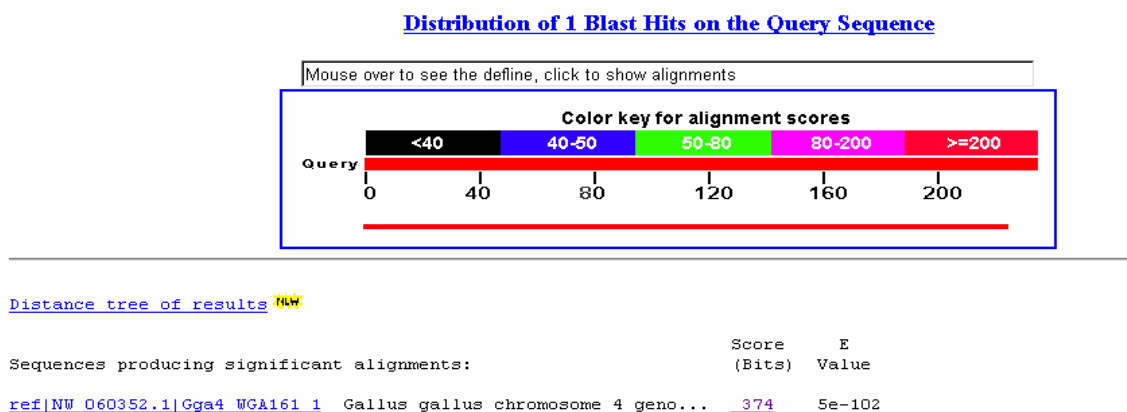


FIGURA IV.9. Identificação de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma* e da região flaqueadora do DNA no cromossomo 4 de *Gallus gallus*. (a) Sequência do clone C43 obtida por 5'RACE a partir de DNA do galo (4938) da geração F0. As regiões conservadas do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* estão identificadas em azul escuro, as regiões variáveis em azul claro. A seqüência verde representa a região flaqueadora ao kDNA no genoma de *Gallus gallus*. (b) Análise BLASTn da região flaqueadora de C43 revelando 98,7 % de identidade (229 bases alinhadas) com CR-1 no cromossomo 4 da galinha.

Outro exemplo interessante é aquele do clone C4 que teve origem no DNA do galo progênie F1 (9849) nascido da ave kDNA-positiva, F0 (4938) (Fig IV.10a). A região flanqueadora do clone C4 apresentou um alinhamento de 96% com aquele mesmo elemento CR1 encontrado no cromossomo 4 da ave 4938, mostrado na Fig IV. 10b. A Figura IV.11a ilustra a estrutura dos clones C43 e C4. A Figura IV.11b ilustra o mapeamento da integração do kDNA (clones C43 e C4) no cromossomo 4 da galinha. Estes resultados indicam que a integração de minicírculos de kDNA foi transferida verticalmente para a progênie, resultante do cruzamento de aves kDNA-positivas.

IV. 10. Sequências originadas do genoma de aves F1 kDNA-positivas com a região flanqueadora

a)

Seqüência 4C - T7: 552 bp;

```

1      CCAAGCTAAC CCCAACCACA TTATATCCCC GTCATTCCAA CACTCAAATT AATACATTAT
61     TGGATAATTA TTCAACACAC TAATAAACCA TCTAAGCACA ATAGTCAAAC ACATTCAACA
121    CATATGACAC ATATTGGCAA TAATTTCAAT CAATTGACAT AAGTAAACCC CAAACTCACA
181    CATTACCACA CCTCCACATT ACCACACAAC CCAATACACA CAATAAACTA TTATTTTAAA
241    CCCCAAACCT TTAGGACTTC CAAACCAAAA CCCTCCCCCN AAAATTGTCT CTCCTGTAAA
301    GTATCGACTA GGATTTCCGT CTCGACTTTT TCTCAACCTA TGTGAATGAT TCCAACGATA
361    ATACACTAGA GTTAACTTTA GAACTAACAC CTTTAACGTG GTAACCTCCTT TCCGACTTTC
421    GAAGGCTCGG AAACGAAACT TTCCTTCGAG GTTTGAAACT TTCTTTCATT TACTCTGAGT
481    CAAGGACTAT GACTGTCGAA TCCTGCGCCT CCCGGGGGGG GGGGGGCATG ATCAGCTGCG
541    CACCGG

```

FIGURA IV.10.a Seqüência do kDNA e da região flanqueadora do DNA hospedeiro no genoma de ave F1. Seqüência do clone C4 oriunda do galo 9849 da geração F1. Fragmentos de regiões conservadas do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* estão identificadas em azul escuro, e as regiões variáveis em azul claro. A seqüência verde representa a região flanqueadora ao kDNA no cromossomo 4 da ave.

b)

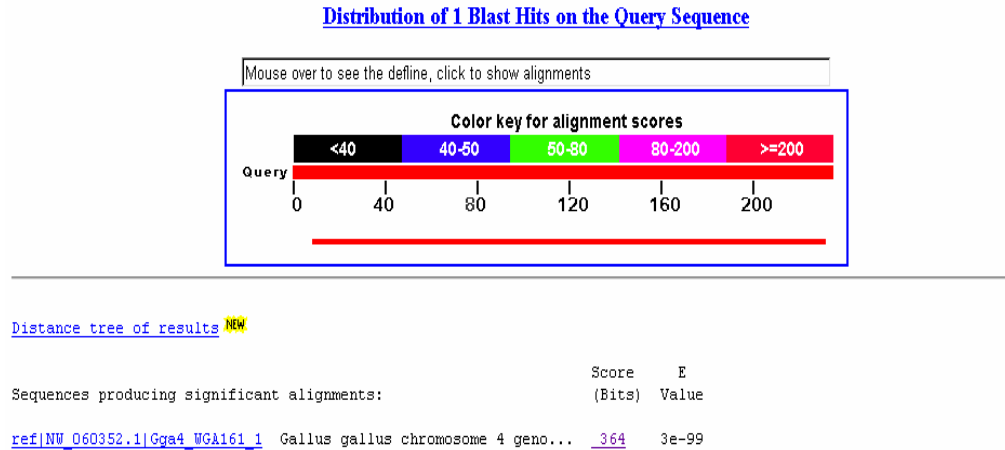


FIGURA IV.10b. Sequência do kDNA e da região flanqueadora do DNA hospedeiro no genoma de ave F1. Análise BLASTn da região flanqueadora do clone C4 apresentando 96% de identidade com elemento CR-1 de *Gallus gallus*.

IV.11. Esquema mostrando a estrutura do kDNA do *Trypanosoma cruzi* integrado no genoma de *Gallus gallus*.

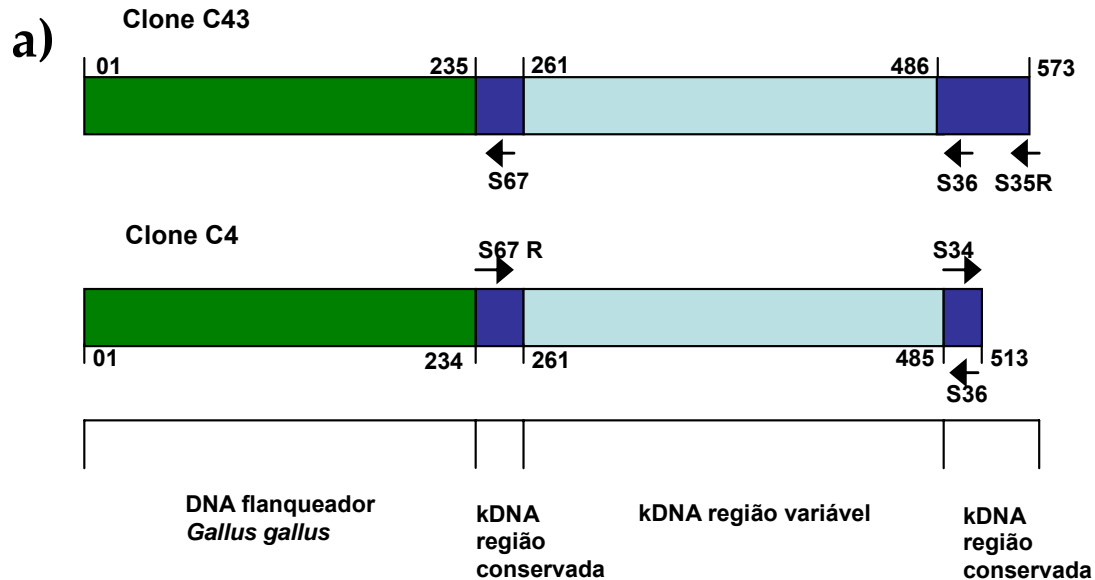
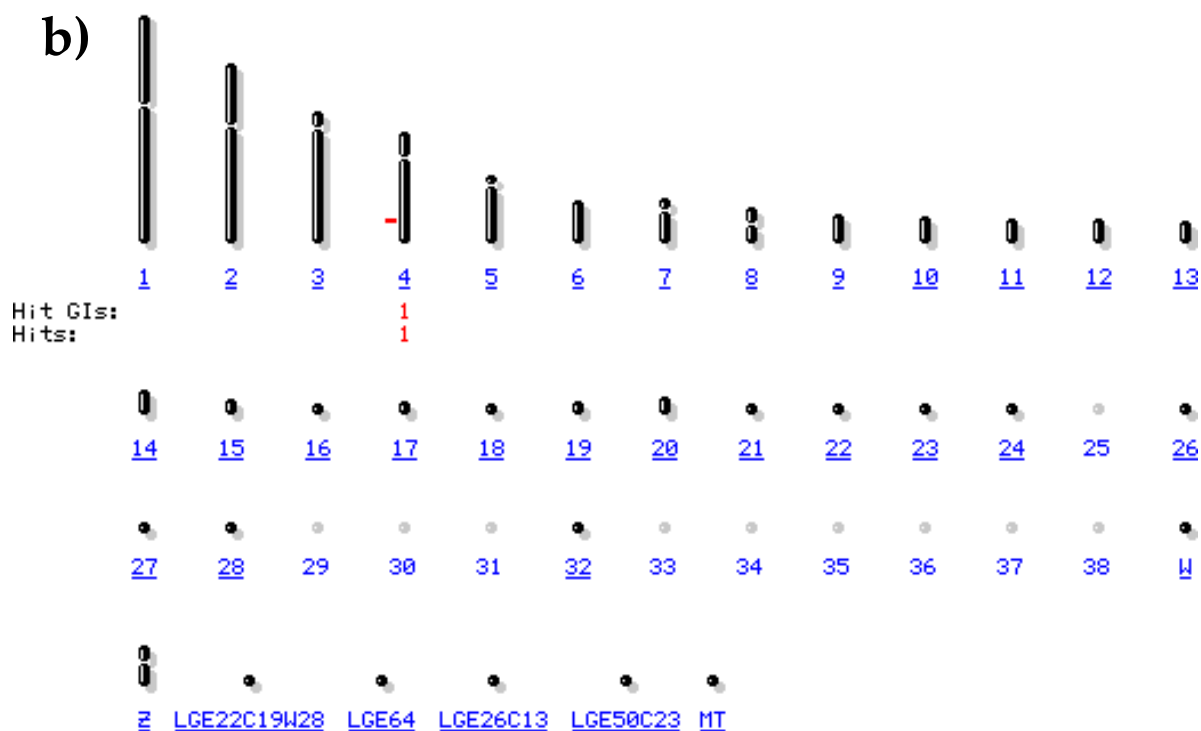


FIGURA IV.11a. Representação esquemática da integração de seqüências de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Gallus gallus*. Em verde, região flanqueadora com alta identidade com elemento retrotransponível CR-1 no genoma da ave. Em azul escuro, região conservada de minicírculo de kDNA; e em azul claro, região variável do minicírculo.



Cores Chaves para os Escores

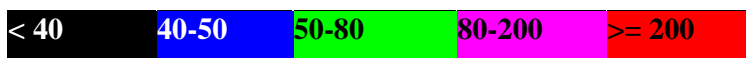


FIGURA IV.11b. Vista genômica da inserção do kDNA no cromossomo 4 de galinha. Mapeamento da integração do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no cromossomo 4 de *Gallus galus*. As integrações do kDNA nas aves F0 (4938) e F1 (9849) inserem exatamente naquela localização mostrada com um traço vermelho no cromossomo 4 do mapa acima.

IV.6. Aparecimento de doença clínica nas aves com kDNA de *Trypanosoma cruzi* integrado em seu genoma

Ao longo dos meses de crescimento foi possível observar algumas alterações na saúde das aves kDNA-Positivas. A primeira delas apareceu na forma de fraqueza muscular que aparecia nos primeiros meses de vida, e era identificada pela dificuldade que as aves

tinham de locomoção e, em seguida, manter-se em pé. Este tipo de alteração só foi observado em pintos nascidos de ovos inoculados com *T. cruzi* (Fig IV.12). Geralmente, antes de completar 6 meses de vida, essas aves com fraqueza muscular faleciam, emagrecidas e anêmicas, visto que não conseguiam alcançar o alimento.



FIGURA IV.12. Fraqueza muscular numa galinha com 6 meses de idade. Nesses casos demonstrou-se o kDNA integrado no genoma da ave.

Outro tipo de manifestação clínica observada nas aves positivas para kDNA surgia tardiamente, geralmente entre 6 e 18 meses de vida, na forma de dificuldade respiratória que evoluía para cianose, evidenciada pela cor roxa que aparecia na crista da ave (Fig IV.13). Com agravamento da dificuldade respiratória notada pelo aparecimento de estertores e secreções que escorriam pelas narinas e pelo bico. A insuficiência cardíaca com retenção do sangue nos pulmões dificultou a oxigenação do sangue apenas das aves kDNA-positiva, as quais faleciam com as características clínicas sugestivas de insuficiência respiratória.



FIGURA IV.13. Sinal clínico de patologia cardíaca evidenciada em *Gallus gallus* kDNA-positivo. Cianose evidenciada pela coloração roxa (sangue não oxigenado nos pulmões) em ave da geração F1. A ave controle, kDNA-negativa da mesma geração, mostra a crista rubra do sangue bem oxigenado.

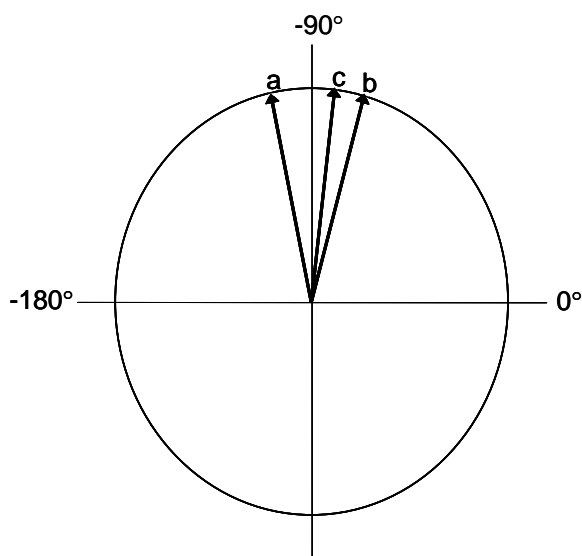


FIGURA IV.14. Variação na posição do eixo elétrico do coração das aves kDNA-positivas. Observe a mudança da posição do eixo elétrico de c) para a) nas galinhas kDNA-positivas.

A partir do quarto mês de vida, as aves kDNA-positivas foram submetidas ao eletrocardiograma (vide materiais e métodos). Foram registradas alterações do tipo arritmias ventriculares e desvio do eixo do coração para a esquerda e para cima. Além disso, foram registrados ECGs alterados (a, n=9) ou sem alterações (b, n=10) em aves kDNA positivas. Nas aves controles, não foram observadas alterações (c, n=30). Os resultados mostram que o número de casos de aves kDNA-positivas com alteração eletrocardiográfica teve significância estatística de ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. O desvio do eixo reflete aumento da área cardíaca (Fig IV.14)

A figura IV.15 sumaria a evolução dos achados eletrocardiográficos alterados oriundos das aves kDNA-positivas. Este resultado é característico de aumento da área cardíaca com kDNA integrado. Ainda que o aumento do coração evidenciado por esse método tenha denotado pequenas diferenças no eixo elétrico, que sugere a posição do coração variando com a área ocupada, a comparação da variação do eixo nos grupos teste e controle revelaram diferenças significativas, resumidas no gráfico abaixo.

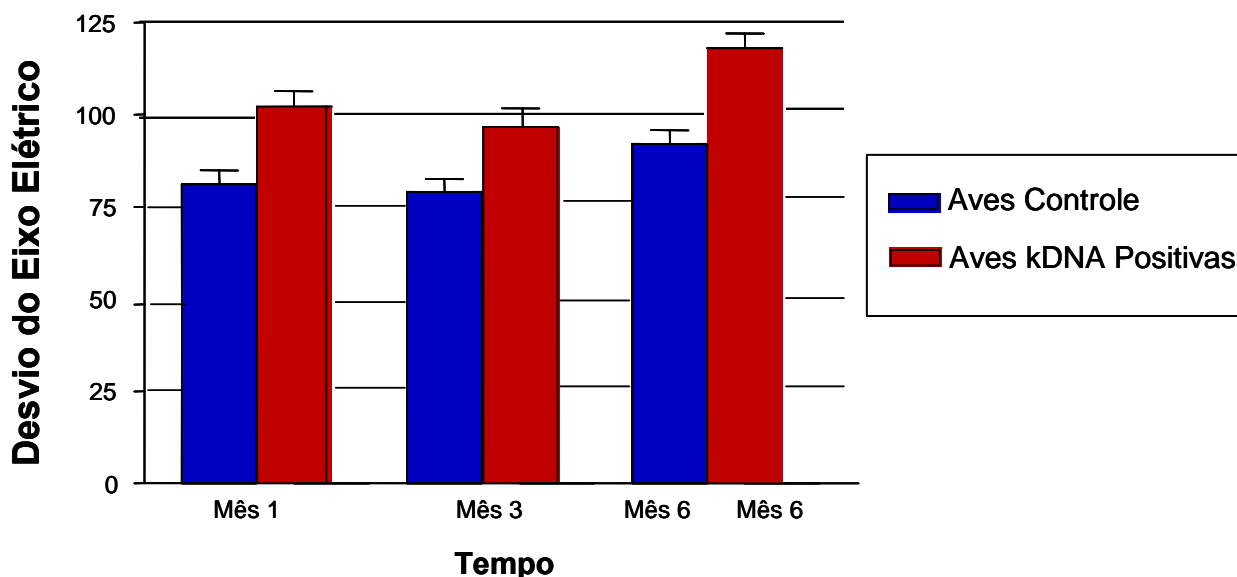


FIGURA IV.15. Aumento do coração evidenciado pelo desvio do eixo traçado pelo eletrocardiograma nas galinhas kDNA-positivas (n=9). As análises estatísticas (teste *t*-Student) mostraram diferenças significativas em relação às aves controles (n=30), quando os registros eletrocardiográficos eram feitos entre três e seis meses de vida.

IV.7. Patologia das aves com kDNA integrado em seu genoma

Os exames patológicos visaram encontrar substratos para as alterações identificadas clinicamente nas aves com kDNA do *T. cruzi* inserido em seu genoma. O exame macroscópico post-mortem revelou apenas emagrecimento e perda de massa muscular nas aves que apresentavam dificuldade de locomoção. Nas aves com integrações, podia-se observar também certa flacidez do coração, discretamente aumentado de volume. De grande interesse, várias aves com sinais de insuficiência cardíaca tinham aumento considerável do tamanho e do peso do coração. Esse achado ficou melhor ilustrado pela relação entre o peso corporal e o peso do coração, como mostra a Fig IV.16.

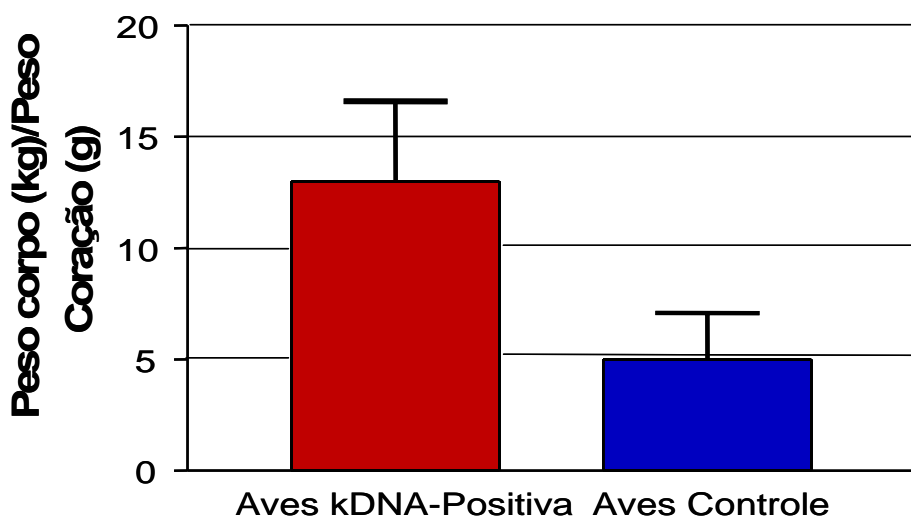


FIGURA IV.16. Relação entre o peso do coração (grama) e o peso corporal (Kg) nas aves kDNA-Positivas (n=15) e nas aves controle (n=10). As diferenças são estatisticamente significantes ($p<0,001$).

As paredes dos ventrículos eram flácidas e as câmaras cardíacas eram dilatadas, evidenciando a insuficiência cardíaca, particularmente, pela dilatação da aurícula direita e do ventrículo direito, como evidenciado nas (Fig IV.17 A, B e C) que mostram *in situ* o coração de uma ave kDNA-positiva e de uma ave controle,. Verifica-se que apenas o coração das aves com integração de kDNA tem aumento significativo da área cardíaca. O aumento desproporcional do tamanho do coração da galinha kDNA-positiva, comparativamente com o tamanho do coração de uma galinha controle, ambas com dez

meses de idade, está ilustrado na Fig IV.18. Neste exemplar o peso do coração foi quatro vezes superior àquele da ave controle. Outros aspectos da insuficiência cardíaca nas aves com o kDNA integrado, estão registrados na congestão passiva dos pulmões e do fígado. Congestão e edema caracterizam o quadro pulmonar, manifesto clinicamente pelo corrimento de secreção espumosa pelo bico e narinas. E, no fígado, a congestão intensa era vista através da cápsula de revestimento, exibindo aspecto de noz-moscada, com áreas claras de hepatócitos circundados por áreas escuras de intensa congestão venosa. Além disso, as aves com kDNA integrado tiveram tempo médio de vida inferior ao das aves controles, particularmente nas gerações F0 e F1. Também houve menor tempo de vida na geração F2 em relação ao controle. Verificou-se sobrevivência mais longa no grupo F3, comparado com os demais grupos analisados (Fig IV.19). A diferença entre o grupo F3 e os grupos F0, F1 e F2, foi estatisticamente significativa, mas não houve diferença entre F3 e o grupo controle. Acreditamos que os efeitos da integração estejam sendo atenuados através das gerações, pois isto explica o maior tempo médio de vida das aves pertencentes à geração F3.

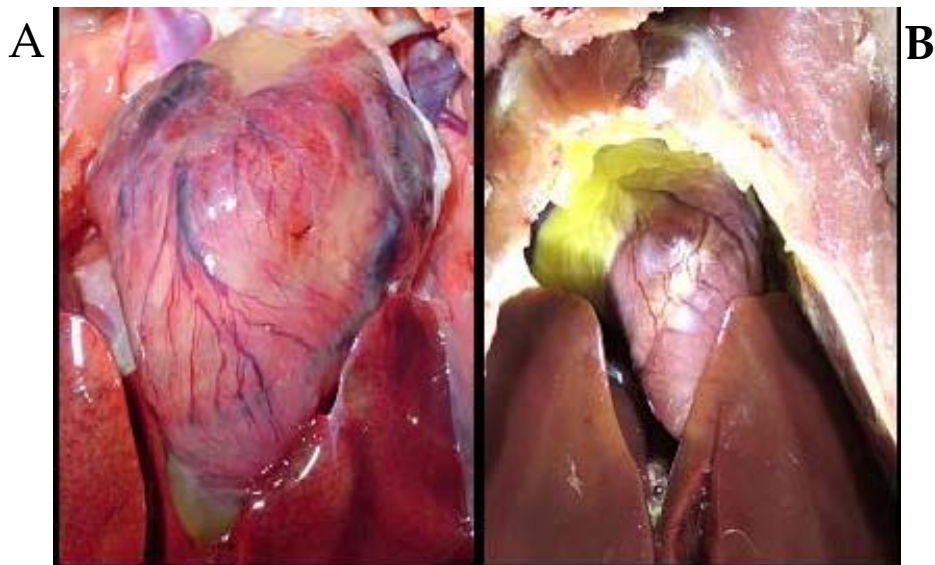


FIGURA IV. 17. Aumento do volume do coração de aves com integração de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma. Em A, coração volumoso mostrando dilatação das câmaras cardíacas e congestão dos vasos epicárdicos. Em B, coração de ave controle, não-mutada, da mesma idade (6 meses) que a ave A da geração F1.



FIGURA IV.18. Cardiomiopatia na galinha kDNA-positiva 4950, pertencente à geração F1, oriunda do cruzamento das aves (4938 e 4948) kDNA-positivas. Esta galinha desenvolveu insuficiência cardíaca congestiva e faleceu aos 10 meses de idade. O seu coração (à esquerda) é cerca de quatro vezes maior que o coração de uma galinha controle, (à direita) com a mesma idade.

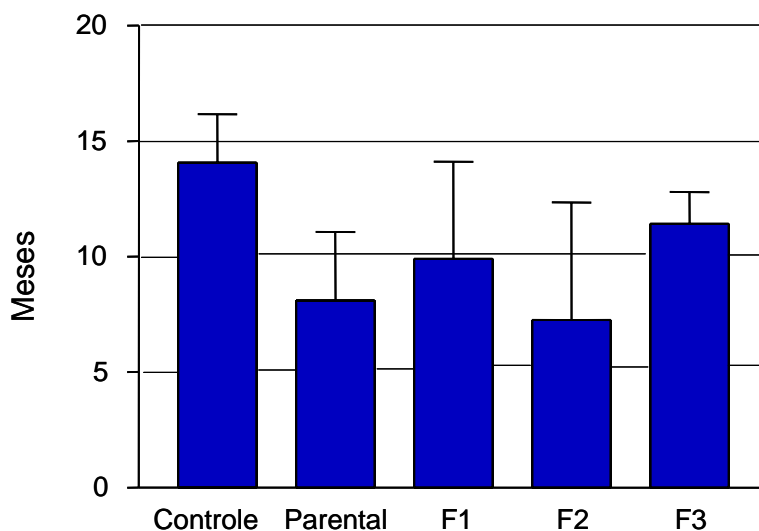


FIGURA IV.19. Tempo médio de sobrevivência de aves kDNA-positivas e de controles sadias. F0, F1 e F2 tiveram sobrevivência menor quando comparado ao grupo controle e esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Entretanto a sobrevivência média entre F3 e controle não tem diferença significativa ($p > 0,05$).

As aves das gerações F0, F1, F2 e F3 tiveram seus tecidos retirados após a morte para análise histopatológica. O exame histopatológico revelou intensa miosite com destruição de fibras musculares esqueléticas e, também, miocardite de intensidade variável (Fig IV.20). De fato, vários graus de intensidade das injúrias foram encontrados no coração, músculos liso e esquelético, nos gânglios parassimpáticos intracardíacos e nas camadas musculares do tubo digestivo de aves com kDNA integrado (Fig IV.21 e Tabelas IV.3, IV.4, IV.5 e IV.6). As lesões histopatológicas nos tecidos musculares e no sistema nervoso simpático e parassimpático das aves kDNA-positivas consistiram de infiltrados de células mononucleares do sistema imune e aderências dessas células efetoras nas células alvo, produzindo lises. Esse quadro histopatológico típico de rejeição do tecido muscular e dos neurônios do sistema nervoso periférico pelas células do sistema de defesa caracterizam uma auto-imunidade. Uma unidade mínima de rejeição é definida aqui como sendo a destruição da célula alvo pelas células efetoras (Fig IV.22). A confluência de múltiplas unidades mínimas de rejeição produz miocardite, miosite ou ganglionite intensa. Em consequência à destruição das células alvo, surgem as lesões macroscópicas patológicas, com as devidas repercussões funcionais traduzidas em manifestações clínicas diversas. O conjunto das alterações descritas nas aves kDNA-positivas é semelhante àquele descrito na doença de Chagas humana e em coelhos chagásicos (Fig IV.23) (TEIXEIRA, 2006). Nenhuma patologia foi encontrada em tecidos das aves controle.

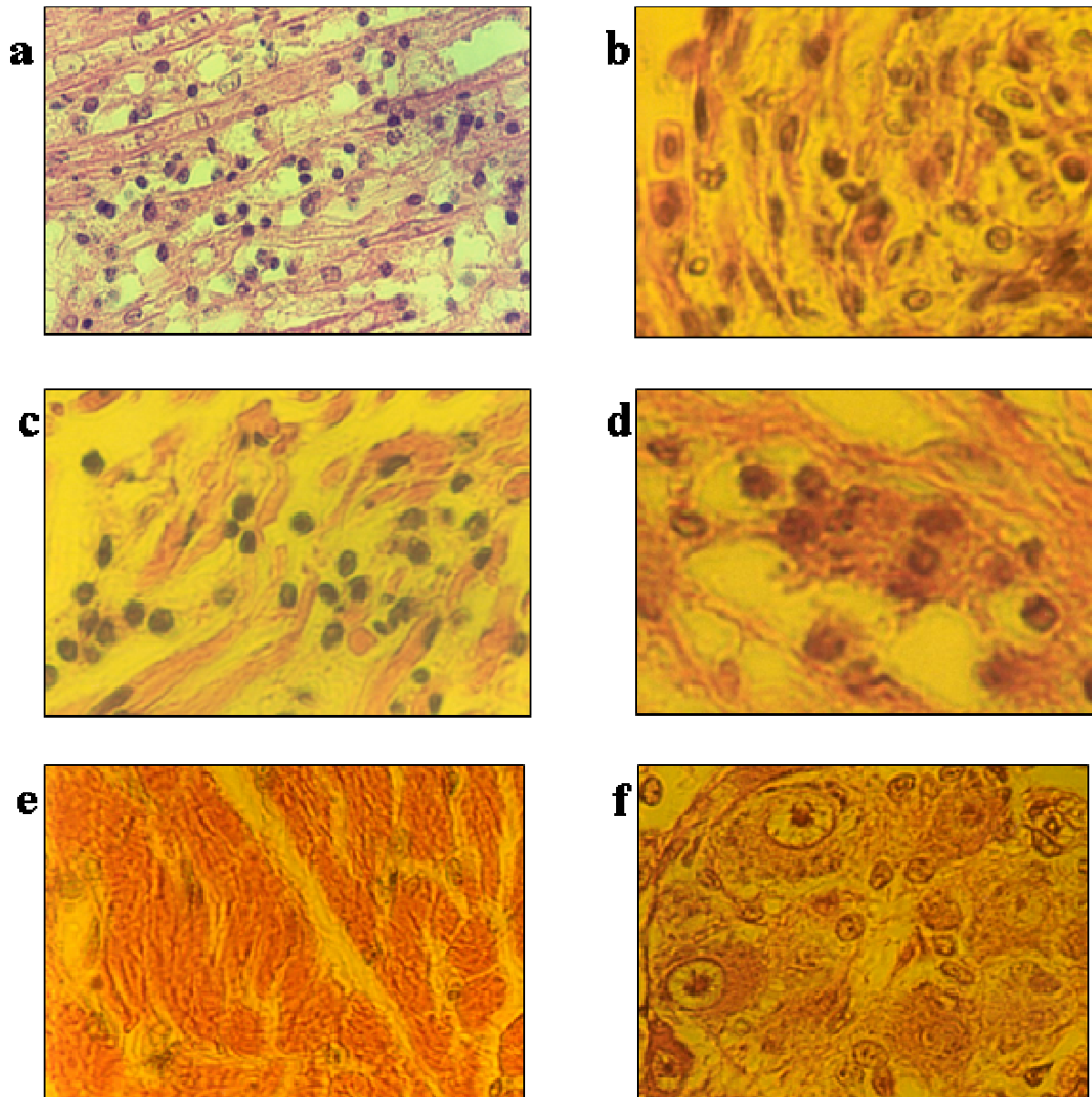


FIGURA IV.20. Lesões inflamatórias em tecidos com infiltrados de células mononucleares e lise das células alvo. (a) Secção histopatológica do tecido cardíaco da ave F1 1072 apresentando infiltração linfocitária e rejeição de miofibras. (b) Músculo liso da parede intestinal mostrando infiltração linfocitária. (c) Músculo esquelético com lesões similares às observadas no miocárdio e músculo liso. (d) Infiltrado de células mononucleares e lise de neurônios parasimpáticos. (e) Tecido cardíaco normal obtido de galinha controle não-infectada. (f) Neurônios parasimpáticos normais oriundos de galinha controle não-infectada.

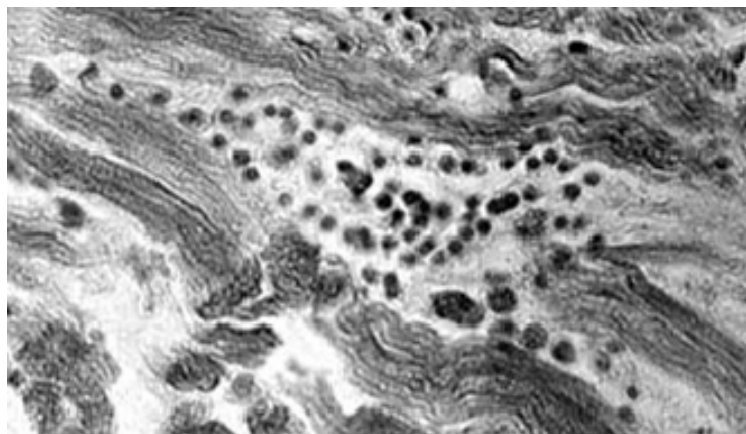


FIGURA IV.21. Infiltrado de células mononucleares e lise de neurônios parassimpáticos do esôfago de uma ave da geração F1 que apresenta kDNA em seu genoma.

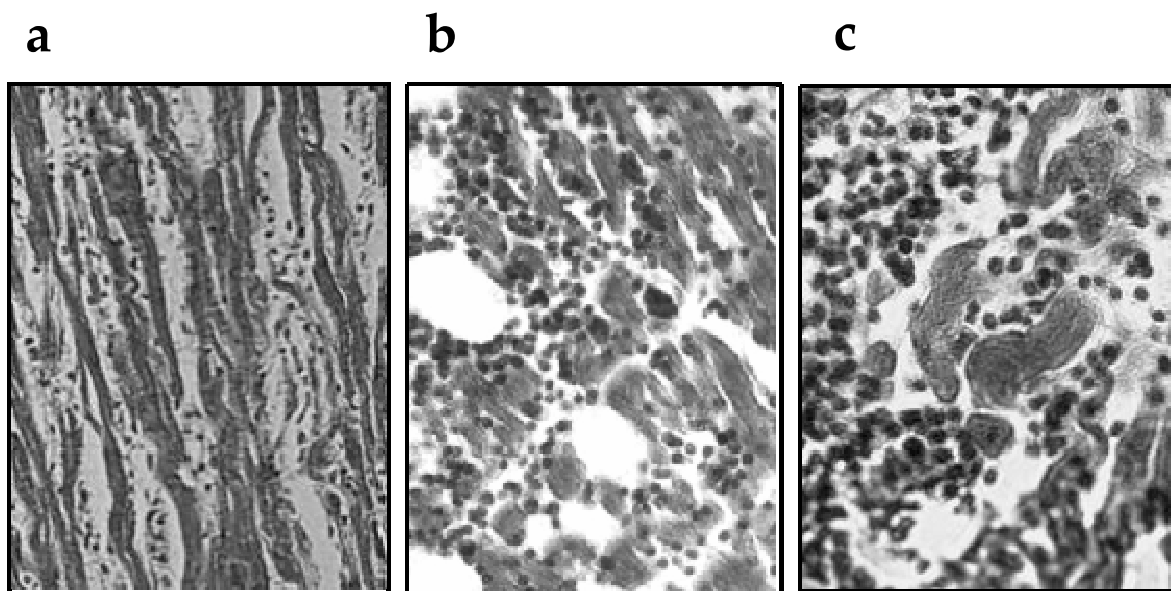


FIGURA IV.22 . Histopatologia do coração de aves apresentando a integração do kDNA no genoma. a) Miocardite difusa com infiltrado de células mononucleares do sistema imune, aderência e lise das fibras alvo, numa ave F0 com 10 meses de idade. b) Miocardite intensa e lise de fibras alvo pelas células efectoras do sistema imune. Note múltiplas unidades mínimas de rejeição onde as células imunes formam paliçadas em torno da fibra apresentando lise parcial. c) Aspecto de múltiplas unidades mínimas de rejeição com destruição das fibras alvo do coração de uma ave F2 com 10 meses de idade. Nenhum desses achados foi observado em aves controles.

TABELA IV.3: Achados histopatológicos e longevidade das galinhas kDNA-positivas F0

Identificação (n = 14)	Sexo		Achados Histológicos			Sobrevida* (meses) (x =5,7)
	M (n = 08)	F (n = 11)	Miocardite	Lise/fibrose	Outros	
4938	x		+++	+		10
4940		x	+++			3
4941	x					4
4942		x	+		Congestão Hepática	5
4954		x	+++		Trombo	2
4957	x		+		Miosite	4
4965	x		++	+		3
4971	x		+		Miosite	8
4973		x				10
4979		x	+			14
4980		x	++++	+		7
4990		x	++			4
4994			++++	+	Miosite	3

(*) Tempo médio de vida em meses das aves adultas

+, infiltrado inflamatório e lise de células alvo (unidade mínima de rejeição); ++, vários sítios contendo infiltrados de células do sistema imune e lises de células alvo (unidades mínimas de rejeição em sítios próximos); +++, confluência de várias unidades mínimas de rejeição e lise de múltiplas fibras do coração; +++++, miocardite intensa e difusa com destruição maciça de áreas extensas do coração.

TABELA IV.4: Achados histopatológicos e longevidade das galinhas kDNA-positivas F1

Identificação (n = 11)	Sexo		Achados Histológicos			Sobrevida* (meses) — (x = 10,7)
	M (n = 08)	F (n = 11)	Miocardite	Lise/fibrose	Outros	
0975		x	+++	+		17
4950		x	++			10
9298	x		+			13
9813		x	+++			10
9814	x		+		Congestão hepática	10
9826	x		+++			13
9838		x	++++			5
9840		x	+			5
9841	x		++++			16
9842	x		++++			9
9849	x		+			10

(*) Tempo médio de vida em meses das aves adultas

+, infiltrado inflamatório e lise de células alvo (unidade mínima de rejeição); ++, vários sítios contendo infiltrados de células do sistema imune e lises de células alvo (unidades mínimas de rejeição em sítios próximos); +++, confluência de várias unidades mínimas de rejeição e lise de múltiplas fibras do coração; +++++, miocardite intensa e difusa com destruição maciça de áreas extensas do coração.

TABELA IV.5: Achados histopatológicos e longevidade das galinhas kDNA-positivas F2.

Identificação (n = 25)	Sexo		Achados Histológicos			Sobrevida* (meses) \bar{x} = 6,4)
	M (n = 08)	F (n = 11)	Miocardite	Lise/fibrose	Outros	
1385	x				miosite neurite	11
2412	x		+++	+		03
3456		x	+++	+		09
3589	x		+++	+		06
3971		x	difusa		hepatite, miosite	03
3982		x	++			10
3985		x	+++	+	discreto infiltrado	06
3988		x	+++	+		09
3993		x				02
3994	x					06
3999		x			fígado e rins congestos	07
4007	x				Coração normal	09
4022		x	+++	+		08
4068	x					08
4071	x		+		hepatite, miosite	03
4079	x				coração normal	02
4083		x	+		miosite	10
4108		x	+		miosite	05
9845			+++		miosite, fígado congesto	06
Pinto 47			++			1 dia
Pinto 36			+			4 dias
Pinto 30			+++			7 dias
Pinto 33			++++		Miosite	3 dias
Pinto 55			+		Fígado congesto	1 dia
Pinto 10			+		Miosite	1 dia

(*) Tempo médio de vida em meses das aves adultas

+, infiltrado inflamatório e lise de células alvo (unidade mínima de rejeição); ++, vários sítios contendo infiltrados de células do sistema imune e lises de células alvo (unidades mínimas de rejeição em sítios próximos); +++, confluência de várias unidades mínimas de rejeição e lise de múltiplas fibras do coração; +++++, miocardite intensa e difusa com destruição maciça de áreas extensas do coração.

TABELA IV.6. Achados histopatológicos e sobrevivência das galinhas kDNA-positivas F3

Identificação (n = 13)	Sexo*		Achados Histológicos			Sobrevivida* (x = 13,6)
	M+F (n=5)	I (n=8)	Miocardite	Lise/fibrose	Outros	
Pinto 07		X	+++			1dia
Pinto 05		X	+	+		4dias
Pinto 03		X	+		hepatite	10 dias
Pinto 01		X	+			1 dia
Pinto 04		X	+			5dias
963	X		++++		Nefrite	11 meses
Pinto 05		X	+++			2dias
Pinto 14		X	+		Neurite	2dias
306	X		+		Miosite	11 meses
149	X		+++			10 meses
Pinto 08		X	+			3dias
338	X		++			18 meses
611	X		++++			18 meses

(*) Sexo: M, masculino; F, feminino; I, indeterminado.

(**) Tempo médio de vida (em meses) das aves adultas

+, infiltrado inflamatório e lise de células alvo (unidade mínima de rejeição); ++, vários sítios contendo infiltrados de células do sistema imune e lises de células alvo (unidades mínimas de rejeição em sítios próximos); +++, confluência de várias unidades mínimas de rejeição e lise de múltiplas fibras do coração; +++++, miocardite intensa e difusa com destruição maciça de áreas extensas do coração.

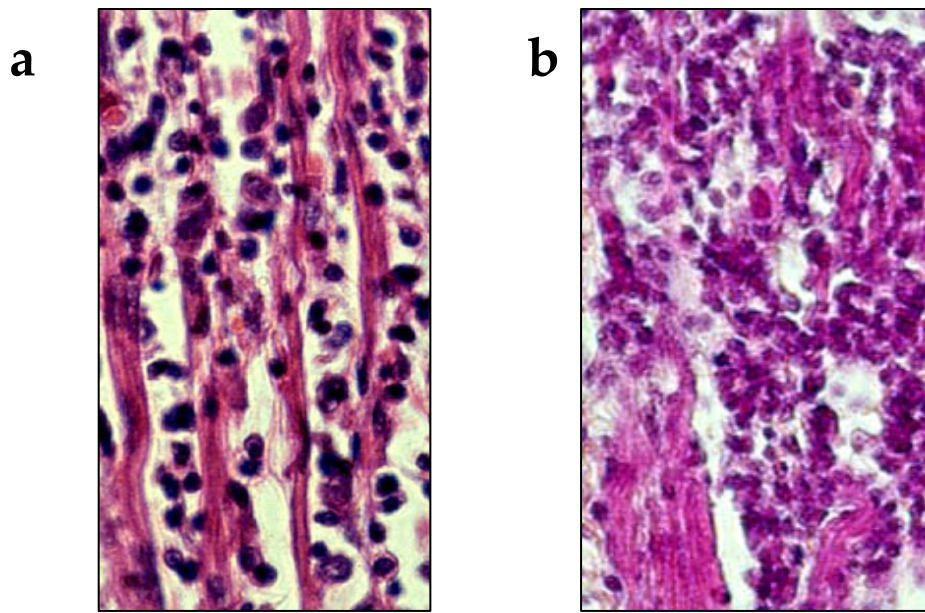


FIGURA VI.23. Similaridade da histopatologia do coração chagásico humano (a) e de uma ave F1 kDNA-positiva (b). Em ambas, a miocardite difusa resulta da confluência de múltiplas unidades mínimas de rejeição.

Em resumo, os resultados produzidos nesta tese mostram que as lesões da doença de Chagas humana e em aves kDNA-positivas têm as mesmas características histopatológicas representadas pelas unidades de rejeição do tecido pelas células efectoras do sistema imune na ausência do parasito. Este substrato histopatológico comum, também sugere que a rejeição dos tecidos do próprio corpo configura o que se conhece com a denominação de auto-imunidade. Tendo apresentado elementos definidores de auto-rejeição resultante das modificações genotípicas nas aves com o kDNA integrado, espera-se que os mecanismos moleculares da patogênese auto-imune da doença de Chagas sejam esclarecidos nos próximos trabalhos

Capítulo V

DISCUSSÃO

V.1. A refratariedade das aves às infecções pelo *Trypanosoma cruzi*

Várias espécies de animais têm sido empregadas no intuito de desvendar diversos aspectos das patologias humanas (LAM-TSE e col, 2002). Neste contexto, o uso de aves como modelo experimental de doenças tem apresentado vantagens já observadas por muitos autores (SCHMUTZ & GRIMWOOD, 2004). Alguns aspectos da biologia das aves podem ser favoráveis à experimentação sobre embriologia e má formação congênita, em decorrência das características da embriogênese e do curto período de incubação até a eclosão do pinto. Nesta espécie, a análise do desenvolvimento do embrião pode ser feita sem interferência dos fatores maternos que dificultam o acesso, podendo ser feita observação ao longo dos dias, ou mesmo horas. O acesso aos tecidos diferenciados em cada estágio torna-se uma vantagem operacional considerável.

No que diz respeito à utilização da galinha como modelo animal para estudo da doença de Chagas, não se esperaria que este fosse um caminho prático, visto que as aves são refratárias à infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, já em 1933, Emanuel Dias tentou produzir infecções pelo *T. cruzi* em pombos domésticos (DIAS, 1933), tendo observado a refratariedade dos pombos à infecção. Dias verificou que o *T. cruzi* virulento inoculado no subcutâneo das aves desaparecia após alguns minutos e que formas tripomastigotas do protozoário não foram recuperadas do sangue mediante hemocultura. Porém, esta foi uma vantagem imediatamente observada em favor da utilização da ave como fonte supridora de sangue para triatomíneos criados em laboratório, que poderiam ser usados no xenodiagnóstico das infecções humanas. Este procedimento conferiu segurança ao xenodiagnóstico, pois os insetos alimentados em aves não corriam riscos de ser infectados durante o repasto de sangue.

A curiosidade a respeito da refratariedade das aves às infecções pelo *T. cruzi* foi novamente abordada por NERY GUIMARÃES e colaboradores em 1972. Estes autores verificaram que a inoculação de formas virulentas de *T. cruzi* intra-ovo produzia uma grande quantidade de abortos. Os embriões geralmente eram encontrados mortos, parcialmente autolisados. O estudo anátomo-patológico desses casos abortados revelou

processo inflamatório associado com destruição do tecido. Em alguns embriões, foram registrados ninhos com as formas amastigotas do *T. cruzi* no tecido. Entretanto, certo número de embriões nascidos de ovos infectados com o *T. cruzi* conseguia sobreviver. Em todos esses casos, não foi possível encontrar as formas amastigotas do *T. cruzi* nos tecidos examinados.

A refratariedade das aves ao *T. cruzi* foi abordada por outros grupos (KIERSZENBAUM e cols, 1981), que analisaram o efeito do complemento das aves na lise das formas do parasito. Esta questão foi abordada por TEIXEIRA (1987a) movido pela curiosidade de encontrar o que existiria nas aves que as fariam refratárias ao *T. cruzi*, pois este fator poderia ser uma pista para produzir uma vacina protetora contra a infecção humana. Conforme está relatado na página 35 do livro “Doença de Chagas e outras doenças por Trypanossomos”, Editora Universidade de Brasília, 1987: “As aves são notoriamente refratárias ao *T. cruzi* e sua resistência natural aparece durante a eclosão. É possível estabelecer a infecção somente durante a vida embrionária de aves. A refratariedade das aves pode estar relacionada aos efeitos da alta temperatura corporal (a temperatura da cloaca da galinha é de 41 – 42 °C). É bem conhecido que o *T. cruzi* requer certa faixa de temperatura para sobreviver e o parasito tende a reduzir sua multiplicação *in vitro* quando é mantido acima de 38 °C. Também é conhecido o efeito da temperatura em culturas parasitadas de músculos estriados. A incubação durante a noite a 41.5°C resultou em morte de todas as formas do parasito (nossas observações não publicadas)”. Ou seja, múltiplos fatores de imunidade inata produzem a refratariedade das aves ao *T. cruzi*.

V.2. Aves como modelos de doenças humanas.

Certas linhagens de galinhas desenvolvem doenças e apresentam sintomas idênticos aos de pacientes humanos com doenças debilitantes, tais como a distrofia muscular, surtos epilépticos, baixa na resposta imunológica e doenças auto-imunes (SCHMUTZ & GRIMWOOD, 2004). Além disso, o sequenciamento dos genomas tem demonstrado uma similaridade de aproximadamente 60% entre genes de galinhas e humanos. Como era esperado, o sequenciamento do genoma da galinha mostrou que os genes envolvidos em estrutura e função básica da célula, assim como aqueles implicados na reprodução, resposta imune e adaptação ao meio ambiente, nas galinhas, têm seqüências similares a genes humanos (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING, 2004). O conjunto

de dados e informação sobre o sistema imune e o genoma das aves, e o fato de serem refratárias às infecções pelo *T. cruzi*, foram elementos importantes para usá-las na investigação sobre a doença de Chagas humana.

Na pesquisa sobre doença de Chagas, os animais mais frequentemente utilizados são mamíferos, todos eles susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Nestes modelos animais pertencentes às Classes Marsupialia, Rodentia, Lagomorpha, Carnívora e Primata, podem ser reproduzidos a maioria dos sintomas e sinais encontrados na doença de Chagas humana. Esses modelos têm permitido a reprodução de achados relacionados às respostas imunes, achados clínicos referentes às lesões do tubo digestivo, do coração e dos sistemas nervosos e, ainda, sobre a patogênese das lesões da doença de Chagas. (CUNHA NETO e cols, 2006). Talvez os fatos citados sobre os animais mamíferos e a reconhecida refratariedade das aves às infecções pelo *T. cruzi* expliquem a opção pelos modelos animais da doença humana, e a exclusão das aves nas pesquisas que visam desvendar vários aspectos da doença de Chagas.

Foi exatamente este aspecto ainda inexplorado na pesquisa sobre doença de Chagas que nos permitiu usar a galinha como um modelo limpo para testar uma hipótese sobre a possível relação de inserções induzidas pelo *T. cruzi* com a patogênese da doença. Isto porque, sendo a ave susceptível à infecção pelo *T. cruzi* apenas nos primeiros dias de vida embrionária, e tendo sido postulado que os pintos nascidos de ovos infectados com o parasito já nascem isentos da infecção, nós poderíamos ter o modelo ideal para o estudo das integrações no genoma e sua associação com a patogênese da doença de Chagas. Esses aspectos da pesquisa experimental são relatados a seguir.

V.3. Transferência horizontal de kDNA do *Trypanosoma cruzi* para o genoma de galinha.

A detecção DNA nuclear (nDNA) nos tecidos do hospedeiro mamífero sugere a persistência do parasito vivo. Porém, a detecção de kDNA do parasito, na ausência do nDNA, pode indicar apenas a retenção do DNA mitocondrial no corpo do hospedeiro. O uso da técnica PCR, com primers de alta especificidade e sensibilidade permitiu a identificação de kDNA e nDNA do parasito nos tecidos de embriões de galinha em ovos inoculados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os primers (S35/36 e S34/67) que

amplificam kDNA (STURM e cols, 1989) e os primers TcZ1/2 (MOSER e cols, 1989) que amplificam nDNA foram empregados para avaliação das infecções intra-ovo. Os primers de kDNA identificam seqüências de minicírculos (existem cerca de 10.000 minicírculos de kDNA aproximadamente 15% de seu DNA total em cada célula de *T. cruzi*). Por outro lado, as seqüências repetitivas de nDNA amplificadas pelos primers TcZ 1/2 correspondem a 9% do genoma total do *T. cruzi*.

Nos nossos experimentos com a inoculação de 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi* em ovos fertilizados, a PCR com os primers de nDNA detectou a presença do parasito somente no início do desenvolvimento embrionário, até o 8º dia de incubação. Certamente, a infecção teria sido erradicada pela imunidade inata do embrião porque após esse período, observou-se amplificação somente do kDNA (ver Fig IV.1). De grande interesse, o kDNA foi encontrado nos tecidos de 46% das galinhas nascidas de ovos infectados. Na ausência do nDNA, a persistência do kDNA significa possibilidade de sua integração no genoma da ave. De fato, o kDNA persistiu ao longo da vida adulta destas aves. O significado deste achado pode ter repercussão mais ampla, pois o *T. cruzi* multiplicou-se nas células tronco até o oitavo dia, período suficiente para a infecção alcançar as células na crista germinativa. Esta hipótese sugeriu a possibilidade de transferência vertical do kDNA de aves adultas para a progênie.

No intuito de desassociar os efeitos resultantes do evento de integração do kDNA da infecção ativa, nós continuamos nosso estudo visando analisar as aves nascidas de ovos férteis inoculados com formas infectantes de *T. cruzi*, visto que galinhas são refratárias ao parasito virulento. Entretanto, o evento de integração de kDNA, ocorrendo no início do desenvolvimento embrionário, resultou na geração de galinhas adultas com kDNA integrado em células germinativas (ver Fig IV.1). Com o kDNA integrado nas células germinativas, foi possível demonstrar a transferência vertical de DNA do *T. cruzi* para a progênie de galinhas livres de infecção (NITZ 2004 e cols; TEIXEIRA 2006 e cols).

Vários eventos de transferência lateral ou horizontal de genes (THG) têm sido descrito na literatura. Durante a evolução dos vertebrados (LANDER e cols, 2001) mais de uma centena de genes de bactérias teriam sido transferidos lateralmente para o genoma humano. O Projeto *International human genome sequencing consortium* (LANDER e cols, 2001) mostrou que genes ortólogos de procariontes podiam ser identificados em eucariontes e que

estes genes teriam sido adquiridos pela THG. O sequenciamento completo dos genomas de diversos organismos tem servido como uma importante ferramenta na análise de transferência de genes.

Fortes evidências sugerem que o DNA pode ser transferido horizontalmente entre eucariontes. STEGHICH & SCHAEFFER (2006) descreveram a transferência do gene descarboxilase do hospedeiro vertebrado para o protozoário *Trypanosoma brucei*. Outros estudos demonstram que seqüências de DNA do hospedeiro mamífero são adquiridas pelo parasito *Schistosoma* após a infecção natural. Essas seqüências integradas nesse platelminto pertencem à região do MHC classe I (IMASE e cols, 2003) e ao gene da albumina (WILLIAMS e cols, 2006), ambos oriundos de camundongos. Além disso, tem se sugerido que uma proteína inibidora do receptor do complemento C2, também de *Schistosoma* tenha se originado através de transferência lateral de genes (INAL, 2005). A transferência de genes da mitocôndria entre plantas (BERGTHORSSON e cols, 2004) e do gene hidrogenase entre protistas *Giardia* e *Entamoeba* (NIXON e cols, 2003), são outros exemplos de troca de material genético entre organismos.

Todavia, a transferência horizontal de seqüências de minicírculos de kDNA para o genoma de hospedeiros vertebrados, constitui no primeiro relato de transmissão de material genético de um parasita eucarionte para seu hospedeiro vertebrado, como consequência natural da infecção pelo *T. cruzi* (TEIXEIRA e cols, 1991; TEIXEIRA e cols, 1994; NITZ e cols, 2004). Em uma perspectiva histórica, essa detecção de fragmentos de kDNA integrado nos genomas de vertebrados é remanescente do processo de assimilação de organelas, como mitocôndria e cloroplastos (THORSNESS & WEBER, 1996; ALLEN e cols, 2005).

A integração de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma de células de mamíferos foi inicialmente observada (TEIXEIRA e cols, 1991; TEIXEIRA e cols, 1994) usando macrófagos peritoniais infectados. Posteriormente, ARGANÑARAZ (1996) e SIMÕES-BARBOSA (2000) demonstraram a inserção do kDNA em elementos LINE-1 da célula hospedeira *in vitro*. Além disso, verificou-se que a integração de kDNA foi mobilizada do cromossomo 4 para o cromossomo 5 via retrotransposon L1, produzindo ruptura da fase aberta de leitura do gene p15, codante de um fator ativador da polimerase II. Uma das cópias do gene foi silenciada. Este achado foi considerado a primeira demonstração de uma patologia molecular resultante de evento de integração do kDNA.

Assim, as integrações produzidas podem gerar novos genes, pseudogenes ou ainda, silenciar outros genes (SIMÕES-BARBOSA e cols, 2006). O estudo da integração do kDNA no genoma de animais foi inicialmente verificado nos coelhos por NITZ (2001), que demonstrou a transferência horizontal de minicírculos do parasito para o DNA de coelhos em decorrência de infecção natural pelo *T.cruzi*. Os coelhos chagásicos apresentaram seqüências quiméricas de DNA, formadas por minicírculos de kDNA de *T.cruzi* covalentemente ligado ao genoma de células de coelhos chagásicos crônicos. Além disso, foram observadas alterações genômicas decorrentes da integração de minicírculos nos elementos SINE (NITZ, 2001). Nitz (2004) também sugeriu que as seqüências de kDNA integradas em coelhos podiam ser herdadas pela prole por transferência vertical. Contudo a dificuldade em se comprovar a transferência de kDNA para a prole de coelhos chagásicos está na possibilidade de infecção dos fetos pelo parasito, via placenta, durante a gestação.

V.4. Transferência vertical de minicírculos de kDNA para a progênie

Nós mostramos transferência vertical do kDNA integrado no genoma pelo cruzamento das aves kDNA positivas. Verificou-se presença do kDNA integrado nas aves das gerações F1, F2 e F3, ou seja na progênie livre de infecção pelo *T. cruzi*. Esta observação sugere que o kDNA integrado em células germinativas (gametas masculino e feminino) pode ser transferido verticalmente para a progênie. Esta hipótese foi demonstrada pelo cruzamento de aves kDNA positivas e a herdabilidade do kDNA foi observado em três gerações sucessivas: FO>F1>F2>F3.

A literatura sugere que a herança de DNA transferido verticalmente entre procariontes pode ter impacto na evolução dos seres vivos. Porém, a transferência vertical de DNA entre eucariontes tem sido documentada ocasionalmente (KEELING e col, 2005). Estes eventos sugerem a ocorrência de herança de DNA adquirido por TGH envolvendo organismos distantemente relacionados na árvore filogenética. A maioria dos exemplos de transferência horizontal envolve genes derivados de bactérias. Nos nossos estudos, documentamos a transferência de seqüências de minicírculos de kDNA, ou seja, do DNA mitocondrial. Acredita-se que o kDNA da mitocôndria tenha origem bacteriana, possivelmente resultante de um processo de simbiose bem sucedida (THORSNESS e cols, 1996; ALLEN e cols, 2005).

V.5. Análise da integração do kDNA no genoma de galinhas.

A confirmação por PCR da presença de kDNA no genoma das aves nos levou a buscar uma técnica que permitisse a amplificação das regiões flaqueadoras ao kDNA visando a clonagem e o sequenciamento dos sítios de integração dos minicírculos no genoma das galinhas. Utilizamos, desta forma, uma adaptação do 5'RACE (RUDI e cols, 1999). Grande parte dos clones obtidos por 5'RACE continham fragmentos rearranjados de kDNA de *T.cruzi*. Além disso, observamos a presença em um mesmo clone, de várias seqüências oriundas da amplificação por 5'RACE. Em alguns clones detectamos inversões entre o kDNA e a cauda poli-C. Em outros, foi possível detectar seqüências flaqueadoras, porem sem nenhuma homologia em banco de dados. Sugerimos que estes rearranjos ocorreram devido a duas causas: problemas na amplificação por 5'RACE e mudança na seqüência do inserto no interior da célula competente em decorrência da instabilidade do kDNA e da região flaqueadora. De fato, regiões contendo múltiplas repetições como as observadas em nossos clones, são frequentemente deletadas em plasmídeos e fagos recombinantes (KURAHASHI e cols, 2000). As seqüências palindromicas características nos DNAs altamente instáveis podem ser encontradas nos nossos clones. O uso de linhagens de bactérias especialmente criadas para clonagem de DNA instável (células SURE STRATAGENE) não evitou a ocorrência de recombinações e deleções. Ressaltamos ainda que existem diferentes níveis de dificuldades encontradas no sequenciamento de um evento de integração de kDNA no genoma do hospedeiro vertebrado. Essas dificuldades são resultantes das características do minicírculo do kDNA com quatro regiões conservadas e quatro regiões variáveis. Em ambas existem elementos repetitivos, diretos e invertidos, com motivos de nucleotídeos A-C⁽ⁿ⁾ ou T-G⁽ⁿ⁾ encontrados nos sítios de justaposição das seqüências do parasito integradas no DNA hospedeiro. Esses elementos geram instabilidade do DNA no sítio da integração (TGH) tornando difícil clonagem e sequenciamento com as abordagens clássicas a partir de banco genômico, PCR inversa, ou com combinação de primers específico-randômico. (NITZ, 2001; NITZ e cols, 2004; SIMÕES-BARBOSA e cols, 2006). O emprego de diferentes células competentes sem recombinases, não produziu clones que pudessem ser seqüenciados. Não obstante, utilizando a técnica 5' RACE, obtivemos dois clones (C43 e C4) com regiões conservadas e variáveis ligadas covalentemente ao DNA da ave na região de justaposição. A análise em banco de dados

revelou homologia significativa com elementos retrotransponíveis CR-1 de galinha e mapeou o evento de integração do kDNA no cromossomo 4.

Como vimos os retrotransposons constituem-se numa significativa porção do genoma da maioria dos organismos. O sequenciamento do genoma da galinha identificou mais de 200 mil cópias de retrotransposons repetitivos CR-1. Além disso, LI & LEUNG, (2006) identificaram elementos repetitivos denominados *Hinfl* localizado na região pericêntrica do cromossomo 4 de galinhas. Em seus resultados, os autores sugerem que a repetição *Hinfl* possa ser originada de uma região contendo elementos retrotransponíveis CR-1. A estrutura dos elementos CR-1 assemelha-se aos elementos LINE-1 de mamíferos possuindo seqüências equivalentes as ORF1 e ORF2 de LINE assim como semelhança nas proteínas codificadas (HASS e cols, 1997; BURCH e cols, 1993).

V.6 Atividade de elementos transponíveis CR-1 de galinha.

Nós identificamos seqüências de minicírculos de kDNA inseridos em regiões ricas em CR-1 de galinha. Essa mesma integração foi passada para a progênie F1 indicando a ocorrência da transferência vertical, via células germinativas causada pela inserção do kDNA. Ou seja, nos experimentos descritos nesta Tese ficou sugerida a herança da inserção do kDNA em elementos transponíveis de galo F0 para o F1. Nós acreditamos que a transferência gênica vertical dos minicírculos de *T. cruzi* para a progênie ocorreu mediante a atividade do elemento retrotransponível CR-1 no genoma da galinha e que uma vez integrado, essa inserção possa ser herdada pela progênie de gerações sucessivas.

V.7. Patologia nas aves com kDNA integrado em seu genoma.

O uso das aves como modelo animal permitiu dissociar claramente o evento da integração de kDNA da infecção ativa persistente. Essa separação foi essencial para estabelecer uma base experimental limpa de integração de kDNA no genoma do hospedeiro vertebrado. A partir de então, foi possível produzir resultados sólidos sobre a base da patologia da doença de Chagas (TEIXEIRA, 2006)

As alterações causadas pela integração de kDNA foram evidenciadas na evolução clínica e na histopatologia do tecido cardíaco dessas aves. Os achados morfológicos ficaram evidentes no aumento do tamanho do coração. Em alguns casos, o coração da ave

kDNA-positiva pesava quatro vezes mais que o coração de uma ave controle (sadia) da mesma idade e sexo. Ao exame microscópico, os músculos esqueléticos, lisos e gânglios parassimpáticos também apresentaram lesões típicas de Chagas, muito semelhantes às observadas em indivíduos mamíferos chagásicos. Nos corações chagásicos livres de parasitas observou-se unidade de rejeição semelhante às encontradas em pacientes chagásicos humanos, caracterizadas por infiltrados mononucleares e lise de células cardíacas (ver Fig IV.10) (NITZ e cols, 2004; TEIXEIRA e cols, 2006). A confluência de múltiplas unidades mínimas de rejeição caracteriza o quando de uma miocardite difusa e destrutiva que leva a insuficiência cardíaca e a morte.

V.8. Patogênese e auto-imunidade

Os achados histopatológicos em aves sugerem que a inserção de kDNA no genoma do hospedeiro vertebrado seja um mecanismo desencadeador de rejeição tecidual auto-imune independente do parasito. A hipótese tem cabimento diante do conhecimento de que uma inserção de seqüência de DNA “estranho” no genoma de um organismo pode levar as diversas alterações na estrutura do genoma celular, que resultam em alterações fenotípicas na célula hospedeira, gerando inclusive mudança na estrutura e expressão de proteína. Desta forma, estas mudanças podem até originar uma proteína quimérica nova, composta pela junção do kDNA com seqüências codantes do genoma, tem o potencial de induzir uma resposta auto-imune do hospedeiro. Esta hipótese representa um denominador comum para explicar a patogênese da doença de Chagas humana. Nesta existe uma longa fase assintomática, antes que a rejeição auto-imune em unidades mínimas de rejeição leve à confluência de lesões, no sistema cardíaco e digestivo, produzindo manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Nós acreditamos que a demonstração de integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* nas aves, resultando em alterações fenotípicas nas células alvo, pode ser a peça chave no entendimento dos mecanismos básicos das lesões descritas nos mamíferos que morrem da doença de Chagas.

V.9. Deriva genética

A herança das integrações de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* pela progênie do animal vertebrado requer o exame da possibilidade de deriva genética das

inserções no genoma das aves, diante da demonstração de patologia reconhecida nos animais kDNA positivos. Existem três tipos de inserções (ou integrações) de DNA: neutras, benéficas e deletérias. Integrações benéficas, responsáveis por um caráter novo, não foram reconhecidas neste estudo. Porém, há certos perfis ainda não determinados de integrações atingindo sítios sensíveis do genoma, que podem ser deletérios. De fato, um tipo de inserção deletéria pode ser correlacionada com os abortos ou com a morte perinatal de pintos kDNA-positivos. É possível ainda que a maioria das integrações de kDNA nas aves sejam neutras, sem efeito reconhecível, por longo tempo. É do conhecimento corrente que as integrações neutras seriam as responsáveis pelo crescimento e evolução do genoma. No nosso estudo as integrações neutras devem ser reconhecidas como aquelas que estavam presentes nas aves que atingiram a idade adulta e se reproduziram. Ainda que essas aves tenham desenvolvido patologia no coração, não se pode olvidar que elas não ameaçaram a continuidade da espécie. Diante do exposto, nós consideramos importante o mapeamento completo dos sítios de inserções do kDNA no genoma das galinhas. O mapeamento permitiria correlacionar os vários perfis de integrações com alterações do fenótipo que se associaram com doença clinicamente manifesta (TEIXEIRA, 2006).

Os estudos em aves mostraram que as lesões patológicas semelhantes às descritas na doença de Chagas humana, afetou um número maior de aves kDNA-positivas na primeira geração F0 do que na F1, F2 e F3. De fato, as aves pertencentes à geração F3 tiveram um tempo médio de vida significativamente mais longa. Além disso, observou-se uma atenuação das manifestações nas aves dessa geração, tais como atenuação dos sinais clínicos de insuficiência cardíaca e do tamanho do coração à necropsia. Acreditamos que essa observação esteja relacionada à deriva genética que se caracteriza pela mudança aleatória na frequência gênica das populações através das gerações. Assim, devido a deriva genética das inserções do kDNA, as lesões tenderam a desaparecer gradualmente na terceira geração. Essa dispersão potencial da integração de kDNA na população representa uma força evolutiva sendo de se esperar que haja alteração na frequência de genes nas próximas gerações de populações com reprodução sexuada. Contudo, para a confirmação dessa hipótese, se faz necessário um estudo com uma maior quantidade de indivíduos distribuídos em um número maior de gerações.

V.10. Modelo de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de galinhas

Sabemos que os retrotransposons CR-1 ainda se encontram ativos no genoma de aves e outros vertebrados. Estes elementos possuem uma maquinaria interna de transposição. Em sua estrutura encontra-se a ORF1 que codifica uma integrase (proteína ligante a ácido nucléico) e a ORF2 que contem domínios de uma endonuclease e uma transcriptase reversa (HASS e cols, 1997; BURCH e cols, 1993). Desta forma sugerimos que o modelo de integração do kDNA na célula hospedeira possui 2 fases, uma nuclear e outra citoplasmática. Na fase nuclear ocorre a transcrição do CR1 no núcleo. Esses RNAs são então transportados para o citoplasma onde ocorre o processo de tradução protéica. Como vimos entre as propriedades apresentadas pelas proteínas de CR-1 está a capacidade de ligação a ácidos nucléicos. Nesta fase, durante a replicação do parasito, se houver algum minicírculo de kDNA livre no citoplasma celular, as proteínas do CR-1 podem se ligar ao minicírculo mobilizando-o para dentro do núcleo celular. No interior do núcleo, as seqüências dos minicírculos podem ser ligadas nos *hot spots* do genoma do hospedeiro, sob a ação das endonucleases da ORF2 e outras (p. exemplo, serina e treonina quinases) que se ligam no sítio produzindo clivagem da dupla fita do DNA genômico. Subseqüentemente, as ligases promovem ligação nos pontos de cortes fita de DNA hospedeiro (NITZ, 2001).

Essa interpretação sugere mais um mecanismo de evolução dos genomas de eucariotos pela transferência horizontal e vertical de DNA, promovendo remodelação continuada do genoma nas áreas de instabilidade. Em resumo, essa atividade de arranjo e rearranjo do DNA é imprescindível para evolução dos seres vivos.

V.11. Parasita é vetor de doença genética.

A transferência horizontal de DNA foi reproduzida em aves não-permissivas à infecção por *T.cruzi*. Além disso, a demonstração da integração de minicírculo de kDNA em células germinativas das galinhas representa um sistema biológico limpo para reproduzir a transferência vertical da integração. No estudo das decorrências da inserção por kDNA nas aves, foi observado que algumas aves kDNA-positivas apresentaram fraqueza muscular generalizada e morte, sinais de insuficiência cardíaca como cianose (deficiência de oxigenação no sangue) e dificuldade respiratória. A histopatologia dos

tecidos retirados após a morte das aves revelou lesões típicas da doença de Chagas nos humanos. Essas alterações decorrentes das integrações de kDNA podem explicar as “unidades de rejeição” confluentes produzindo lesões severas, denominador comum de patologia auto-imune na doença de Chagas. Entre várias possibilidades de explicação sobre a gênese da auto-imunidade, nós acreditamos que tais alterações podem ser devidas, por exemplo, pela geração de proteínas quiméricas decorrentes da integração do kDNA ou, ainda, pela alteração na função e estrutura do DNA, caso o kDNA se integre em introns ou nas regiões promotoras. Essas mudanças são importantes porque têm o potencial de induzir respostas imunes contra o tecido próprio. De fato, as lesões severas da doença de Chagas em aves kDNA-positivas são sugestivas de que o *T. cruzi* é o vetor da doença genética. A associação da integração de kDNA com a patologia se caracteriza como um denominador comum explicando a origem da patogênese da doença de Chagas em mamíferos. Todavia, estudos no nosso Laboratório utilizando aves congênicas com o kDNA inserido em seu genoma poderão esclarecer os mecanismos moleculares da patogênese da doença de Chagas.

V.12. Perspectivas

A comprovação de auto-imunidade pode ser feita pela identificação da integração e sua correlação com a patologia (só existente nas aves com inserção de kDNA), em novos experimentos utilizando aves congênicas provenientes de Praga. Nestas aves poderão ser averiguados alguns aspectos da auto-imunidade mediante: a) Transferência de coração de aves saudáveis para aves kDNA-positivas visando a avaliar a rejeição. b) Transferência de coração de aves kDNA-positivas para saudáveis para avaliação da reação do enxerto contra o hospedeiro; c) Experimento controle com transferência do coração entre aves saudáveis sem que haja rejeição. Tudo isso em duas raças congênicas com MHC histocompatível (SVOBADA e cols, 1992; KAUFMAN, 2000; PLACY & HEJNAR, 2002). d) Transferência passiva de auto-imunidade com os clones de células com kDNA inserido. e) Identificação de fatores que identificam proteínas quimeras nas aves com kDNA integrado, os quais estariam ausentes nas aves controles.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFIA

ALLEN, J.F.; PUTHIYAVEETIL S.; STROM, J. & ALLEN, C.A. Energy transduction anchors genes in organelles. *Bioassays*, 27(4): 426 – 435, 2005.

ALTSCLUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; & LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, 25: 3389 – 3402, 1997.

AMBROISE-THOMAS, P. Parasitic diseases and immunodeficiencies. *Parasitology*, 122(Suppl.): 65 – 71, 2001.

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

BAILEY, J.A.; CARREL, L.; CHAKRAVART A. & EICHLER E.E. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation the Lyon repeat hypothesis. *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, 12288 – 12292, 2000.

BATZER, M.A. & DEININGER, P.L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature* 3: 370 – 380, 2002.

BAUST, C.; BAILLIE, G.J. & MAGER, D.L. Insertion polymorphisms of ETn retrotransposons includes a disruption of the wiz gene in C57BL/6 mice. *Mamm. Genome* 13: 423 – 428, 2002.

BERGTHORSSON, U.; RICHARDSON, A.O.; YOUNG, G.J.; GOERTZEN, L.R., PALMER, J.D. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 17747-17752, 2004.

BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L. & GIBSON, W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Tropica*, 61: 31 – 40, 1996.

BRAGA, M.S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANARAZ, E.R.; NASCIMENTO, R.J. & TEIXEIRA, A.R. Persistent infections in chronic Chagas' disease patient treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo*. 42(3): 157-161, 2000.

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

BRISSE, S.; BARNABE, C. & TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.*, 30: 35 – 44, 2000.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C. & TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 111: 95-105, 2000.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E.J.P. & BERKVEN, D. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.*, 2: 173 – 183, 2003.

BURCH, J.B.; DAVIS, D.L. & HAAS, N.B. Chicken repeat 1 elements contain a pol-like open reading frame and belong to the non-long terminal repeat class of retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8199-8203, 1993.

BURWINKEL, B. & KILIMANN, M.W. Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease. *J. Mol. Biol.*, 277: 513-517, 1998.

BUSHMAN, F. Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences. *Cold Harbor Laboratory Press*, 1ª edição, 2002.

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.

CAMPBELL, D.A.; WESTENBERGER, S.J. & STURM, N.R. The determinants of Chagas disease: Connecting parasite and host genetics. *Curr. Mol. Med.*, 4: 549-562, 2004.

CARRASCO, H.J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A. & MILES, M. A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54: 418 – 424, 1996.

CARROLL, S.B.; GRENIER, J.K. & WEATHERBEE, S.D. From DNA to Diversity. Molecular Genetics and Evolution of Animal Design. *Blackwell Science*, 1ª edição, 2001.

CHAISSON, E.J. Cosmic Evolution: The rise of complexity in nature. *Cambridge University Press*. Cambridge, UK, 2001.

CECH, T.R. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83(12): 4360 – 4363, 1986.

COSSIO, P.M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B.; & ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49(1), 13-21, 1974a

COSSIO, P.M.; LANGUES, R.P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; SEGAL, A. & ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50 (6), 1252-1259, 1974b.

COULLIN, P.; BED-HOM, B.; CANDELIER, J.J.; VETTESE, D.; MAUCOLIN, S.; MOULIN, S.; GALKINA, S.A.; BERNHEIM, A. & VOLOBOUEV, V. Cytogenetic repartition of chicken CR1 sequences evidenced by PRINS in Galliformes and some other birds. *Chromosome Res.* 13(7): 665-673, 2005.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas' disease identification of cardiac myosin – B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.* 98, 1709-1712, 1996.

CUNHA-NETO, E.; BILATE, A.M.; HYLAND, K.V.; FONSECA, S.G.; KALIL, J. & ENGMAN, D.M. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, 39(1): 41-54, 2006.

DANIELS, G.R. & DEININGER, P.L. Integration site preferences of the *Alu* family and similar repetitive DNA sequences. *Nucleic. Acid. Res.* 13(24): 8639-8954, 1985.

DAVIS, P. O quinto milagre. *Companhia das letras*, 1ª edição, São Paulo, 2000.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWEYN, H.; KIDANE, G.; CARDOSO, M.; MUELLER, R.; SIMPON, L & MOREL, C. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 27: 63-70, 1988.

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

DEININGER, P.L. & BATZER, M.A. Mammalian retroelements. *Genome Res.*, 12(10): 455-465, 2002.

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

DEWANNIEUX, M.; ESNAULT, C. & HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.*, 35(1): 41-48, 2003.

DIAS, E. Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le *Trypanosoma cruzi*. *Comp. R. Soc. Biol.* 112, 1474, 1993.

DVORAK, J.A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.*, 24: 357 – 371, 1984.

EL-SAWY, M. & DEININGER, P.L. Tandem insertions of Alu elements. *Cytogenet. Genome Res.*, 108(1-3): 58-62, 2005.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; GAELLE, B.; BERRIMAN, M.; *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409, 2005.

ENDER, A. & SCHIERWATER, B. Placozoa are not derived cnidarians evidence from molecular morphology, *Mol. Biol. Evol.*, 20: 130 – 134, 2003.

ESNAULT, C.; MAESTRE, J. & HEIDMANN, T. Human LINE retrotransposon generate processed pseudogenes. *Nat. Genet.*, 24: 363 – 367, 2000.

FENG, Q.; MORAN, J.V.; KAZAZIAN, H.H. Jr. & BOEKE, J.D. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905-916, 1996.

FOX, S.W.; HARADA, K. & VEGOTSKY, A. Thermal polymerization of amino acids and a theory of biochemical origins. *Experientia*, 15(2): 81 – 84, 1959.

GAUNT, M. W & MILES, M. A. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 557 – 565, 2000.

GAUNT, M. W.; YEO, M. FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R. & CARRASCO, H. J. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 421: 936 – 939, 2003.

GREGOW, D.; MISELIS, N.; & LIBER, H.L. Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: Effects of p53 status, microhomology and repetitive DNA length and orientation. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 4028-4035, 2000.

GONÇALVES, T.; DURET, L. & MOUCHIROUD, D. Nature and structure of human genes that generates retropseudogenes. *Genome Res.*, 10: 672 – 678, 2000.

GOODIER, J.L.; OSTERTAG, E.M. & KAZAZIAN, H.H. Transduction of 3' flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 653-657, 2000.

GRINDLEY, N.D.; WHITESON, K.L. & RICE P.A. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, 75: 567-605, 2006.

HAAS, N.B.; GRABOWSKI, J.M.; SIVITZ, A.B. & BURCH, J.B. Chicken repeat 1 (CR1) elements, which define an ancient family of vertebrate non-LTR retrotransposons, contain two closely spaced open reading frames. *Gene* 197: 305-309, 1997.

HASS, N.B.; GRABOWSKI, J.M.; NORTH, J.; MORAN, J.V. KAZAZIAN, H.H. Jr.& BURCH, J.B.E. Subfamilies of CR1 non-LTR retrotransposons have different 5'UTR sequences but are otherwise conserved. *Gene*, 265: 175-183, 2001.

- HALLIDAY, N.A. In the beginning. *Nature*, 409: 144 -145, 2001.
- HAN, K.; SEN, B.K.; WANG, J.; CALLINAN, P.A.; LEE, J.; CORDAUX, R.; LIANG, P. & BATZER M.A. Genomic rearrangements by LINE-1 insertion-mediated deletion in the human and chimpanzee lineages. *Nucleic Acids. Res.*, 33(13): 4040-4052, 2005.
- HOFFMEISTER, M. & MARTIN, W. Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environ. Microbiol.*, 5(8): 641-649, 2003.
- HORVÁTH, A; BERRY, E. A. & MASLOV D. A. Translation of the Edited mRNA for Cytochrome b in Trypanosome Mitochondria. *Science*, 287: 1639-1640, 2000.
- IMASE, A.; MATSUDA, H.; IRIE, Y.; IWAMURA, Y. Evidence of host DNA sequences in schistosomes-horizontal and vertical transmission. *Parasitol. Int.*, 52: 369-373, 2003.
- INAL, J.M. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: from man to schistosome. *Springer Semin. Immunopathol.*, 27: 320–331, 2005.
- INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432: 695 -777, 2005.
- JOYCE, G.F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 418: 214 – 221, 2002.
- JURKA, J. RepBase redate: A database and an electronic journal of repetitive elements. *Trens Genet.* 16: 418-420, 2000.
- KAPITONOV, V.V & JURKA, J. - Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Science*, 98 (15): 8714 – 8719, 2001.

KAPITONOV, V.V. & JURKA, J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(12): 4540-4545, 2006.

KAUFMAN, J. The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 1077 – 1084, 2000.

KAZAZIAN, H. H. Jr. L1 Retrotransposons Shape the Mammalian Genome *Science* 289: 1152 – 1153, 2000.

KAZAZIAN, H.H. Jr. & MORAN, J.V. The impact of L1 retrotransposons on human genome. *Nature Genet.*, 19: 19-24, 1998.

KAZAZIAN, H.H. Jr. L1 Retrotransposons shape the mammalian genome. *Science*, 289: 1152 – 1153, 2000.

KEELING, P.J.; BURGER, G.; DURNFORD, D.G.; FRANZ LANG, B.; LEE, R.W.; PEARLMAN, R.E.; ROGER, A.J. & GRAY, M.W. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecol. And Evol.*, 20: 670-676, 2005.

KIDWELL, M.G. Horizontal transfer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 868 – 873, 1992.

KIERSZEMBAUM, F.; GOTTLIEB, C.A. & BUDZKO, D.B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol.*, 67: 656, 1981.

KIERSZEMBAUM, F. Autoimmunity in Chagas disease. *J. Parasitol.*, 72: 201-211, 1986.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas's disease? *Trends Parasitol.*, 21(11): 513-516, 2005.

KLINGBIL, M.M. & ENGLUND, P.T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 30: 43333-43334, 2004.

KRISHNAPILLAI, V. Horizontal gene transfer. *J. Genet.*, 75: 219-232, 1996.

KURAHASHI, H.; SHAIKH, T.H.; ROE, B.A.; EMANUEL, B.S. & BURDORF, M.L. Regions of genomic instability on 22q11 and 22q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum. Mol. Genet.* 9(11): 1665-1670, 2000.

KURLAND, C.G. Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution. *EMBRO Reports*, 1(2): 92-95, 2000.

KUTSCHERA, U. & NIKLAS, K.J. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften*, 91: 255 – 276, 2004.

LAGUENS, R.P.; CARBEZA MECKERT, P.M & VIGLIANO, C.A. Patogenia de la miocarditis chagastica crônica humana. *Medicina, Buenos Aires*, 59(II): 63-68, 1999.

LAMPE, D.J.; WALDEN, K.K. & ROBERTSON, H.M. Loss of transposase-DNA interaction may underlie the divergence of *mariner* family transposable elements and the ability of more than one mariner to occupy the same genome. *Mol. Biol. Evol.* 18: 954 – 961, 2001.

LAM-TSE, W.K.; LERNMARK, A. & DREXHAGE, H.A. Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity? *Semin. Immunopathol.*, 24: 297-321, 2002.

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

LARANJA, F.S.; NOBREGO, G. & MARINDA, A. Chagas disease a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14, 1035-1060, 1956.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L. & TEIXEIRA, A.R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Am. J. Trop. Med. Hyd.*, 63 (3-4): 111-118, 2000.

LEON, J.S. & ENGMAN, D.M. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front. Biosci.*, 8: 315-322, 2003.

LI, J.; LEUNG, F.C. A CR1 element is embedded in a novel tandem repeat (*Hinfl* repeat) within the chicken. *Genome*, 49(2): 97 – 103. 2006.

LI, X.; SCARINGE, W. A.; HILL, K. A.; ROBERT, S.; MENGOS A.; CARERI, D.; PINTOS, M.T.; KASPER, C.K. & SOMMER, S.S. Frequency of recent retrotransposition events in the human factor IX gene. *Human Mutant* 17: 511 – 519, 2001.

LOHE, A.R.; MORIYAMA E.N.; LIDHOLM, D.A. & HARTL, D.L. Horizontal transmission, vertical inactivation and stochastic loss of *mariner*-like transposable elements. *Mol. Biol. Evol.* 12: 62 – 72, 1995.

LUAN, D.D.; KORMAN, M.H.; JAKUBCZAK, J.L. & EICKBUSH, T.H. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72: 595 – 605, 1993.

MACEDO, A.M. & PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol. Today*, 14: 119-124, 1998.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P. & PENA, S.D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 1-16, 2002.

MACHADO, C. A. & AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 7896 – 7401, 2001.

MACHADO, C. A. & AYALA, F. J. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 121: 33-47, 2002.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; & HAJDUK, S. L. Editing Machines: The Complexities of Trypanosome RNA editing – *Cell*, 108: 43-438, 2002.

MAKALOWSKI, W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. *Gene*, 259: 61-67, 2000.

MARGULIS, L. & CHAPMAN, M.J. Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends in Microbiology*, 6(9): 342 – 345, 1998.

MARGULIS, L. & SAGAN, D. Acquiring Genomes: The Theory of the origins of the species. Basic Book, 1ª edição, 2002.

MARGULIS, L. & SAGAN, D. What is Life? *Univ. of California Press*, 1ª edição, 2000.

MARTIN, W. & EMBLEY, M.T. Early evolution comes full circle. *Nature*, 431: 134 – 137, 2004.

MEDSTRAND, P. & MAGER, D.L. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J.Virol.* 72: 9782 – 9787, 1998.

MIKI, Y. Retrotransposal integration of mobile genetic elements in human diseases. *J. Hum. Genet.*, 43(2): 77 – 84, 1998.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J. & LAINSON, R. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272: 819 – 821, 1978.

MILLER, S.L. A production of amino acids under possible earth conditions. *Science*, 15: 117 (3046): 528 – 529, 1953.

MIZROKHI, K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 1011 – 1051, 1992.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. 1), 401-404 1999.

MONCAYO A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 577-591, 2003.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J. & SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77(11): 6810-6814, 1980.

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

NERY-GUIMARÃES, F. & LAGE, H.H. A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (S.) cruzi*. Refratariedade das galinhas desde o nascimento, persistência da refratariedade após bursectomia, infecções em ovos embrionados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, 70: 97, 1972.

NITZ, N. Evidência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de coelhos chagásicos. *Tese, Universidade de Brasília, 2001*

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A.C.; D'SOUZA-AULT, M.R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.J.; TEIXEIRA, A.R.L. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into avian genome: Insight into human Chagas Disease. *Cell, 118: 175-186, 2004.*

NIXON, J.E.; FIELD, J.; McARTHUR, A.G.; *et al.* Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol. Bull., 204: 1-9, 2003.*

OCHS, D. E.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S.M.R.; MOSER, D. R. & KIRCHHOFF, L. V. Maxicircle genomic organization and editing of na ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitolol. 76: 267-278, 1996.*

OLIVEIRA, R. P. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 3776 – 3780, 1998.*

OSTERTAG, E.M. & KAZAZIAN H.H. JR. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet. 35: 501 – 538, 2001.*

OSTERTAG, E.M. & KAZAZIAN, H.H., Jr. Biology of L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet., 35: 501-538, 2001.*

OSTERTAG, E.M.; GOODIER, J.L.; ZHANG, Y. & KAZAZIAN H.H.Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am. J. Hum. Genet., 73: 1444 – 1451, 2003.*

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

PICKERAL, O.K.; MAKALOWSKI, W.; BOGUSKI, M.S. & BOEKE, J.D. Frequent human genomic transduction driven by LINE-1 retrotransposition. *Genome Research*, 10: 411-415, 2000.

PLACY, J. & HEJNAR, J. Chicken cells – Oncogene transformation, immortalization and more. *Folia Biologica (Praha)* 48: 126-138, 2002.

PLASTERK, R.H.; IZSVAK, Z. & IVICS, Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* 15: 326 – 332, 1999.

PRESGRAVES, C.D. Evolutionary Genomics: New genes for New Jobs. *Current Biology*, 15(2): 52 -53, 2004.

PONNAMPERUMA, C.; SAGAN, C. & MARINER, R. Synthesis of adenosine triphosphate under possible primitive earth conditions. *Nature*, 20; 199: 222 – 226, 1963.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; PRIMEZ, C. & SAVINO, W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res Immunol.* 142: 134-137, 1991.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MONGEL, J.O.; POSTOL. E.; SOARES, R.A.; FERREIRA-FERNANDES, E.; SOARES, M.B. & PONTES-DE-CARVALHO, L.C. A heart-specific CD4⁺T-cell line obtained from a chronic chagas mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi* parasite. *Immunol.*, 23(2) 93-101, 2001.

RIZZO, L.V.; CUNHA-NETO, E. & TEIXEIRA, A.R. Autoimmunity in Chagas' disease: Specific inhibition of reactivity of CD4⁺T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 57: 2640-2644, 1989.

ROWOLD, D.J. & HERRERA, R.J. Alu elements and the human genome. *Genetica* 108: 57-72, 2000.

RUBIN-DE-CELIS, S.S.C. Da trans-sialidade e dos minicírculos de *Trypanosoma cruzi* à doença de Chagas. *Tese Universidade Federal de São Paulo, 2006.*

RUDI, K.; FOSSHEIM, T. & JAKOBSEN, K.S. Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences. *Biotechniques, 27: 1170-1177, 1999.*

RUGIER, N.S.; GREGERSEN, N. & KILLAND-BRANDT, M.C. One short well-conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res. 23(2): 256-260, 1995.*

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª Edição, 1989.*

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edition, 2001.*

SANTOS-BUCH, C.A. & TEIXEIRA, A.R. The immunology of experimental Chagas' disease. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J. Exp. Med., 140 (1), 38-53, 1974.*

SANZO, M., STEVENS, B., TSAI, M.J., O'MALLEY, B.W. Isolation of a protein fraction that binds preferentially to chicken middle repetitive DNA. *Biochemistry 18, 23(26): 6491 – 6498, 1984.*

SCHMUTZ, J. & GRIMWOOD, J. Fowl sequence. *Nature, 432: 679-680, 2004.*

SHAPIRO, J.A. Transposable elements as the key to a 21st century view of evolution. *Genetica, 107 (1-3): 171-179, 1999.*

SHEEN, F.; SHERRY, S.T.; RISCH, G.M.; ROBICHAUX, M.; NASIDZEE, I.; STONEKING, M.; BATZER, M.A. & SWERGOLD, G.D. Reading between the LINEs Human Genomic Variation Infused by LINE-1 Retroposition. *Genome Research*, 10: 1496-1508, 2000.

SILVA, R. & BURCH, J.B. Evidence that chicken CR1 elements represent a novel family of retroposons. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3563-3566, 1989.

SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A.M.; NITZ, N.; ARGANARAZ, E.R. & TEIXEIRA, A.R. Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1: 249-252, 1999.

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

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

SMIT, A.F. & RIGGS, A.D. Interspersed repeats and other moments of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9: 657 – 653, 1999.

SMIT, A.F. & RIGGS, A.D. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93: 1443 – 1448, 1996.

SOARES, M.B.P. & RIBEIRO DOS SANTOS, R. Immunopathology of cardiomyopathy in experimental Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94(1): 257-262, 1999.

SOUTO, R. P., & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62: 45 – 52, 1993.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 83: 141-152, 1996.

STEGLICH, C. & SCHAEFFER, S.W. The ornithine decarboxylase gene of *Trypanosoma brucei*: evidence for horizontal gene transfer from a vertebrate source. *Infect. Genet. Evol.* 6: 205-219, 2006.

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

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B., & CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 33: 269 – 279, 2003.

SVOBOBA, J.; PLACHY, J.; HEJANR, J.; KARAKOZ, I.; GUNTAKA, R.V., GERYK. Tumor induction by the LTR, v-src, LTR DNA in four B (MHC) congenic lines of chickens. *Immunogenetics*, 35: 309-315, 1992.

SYVANEN, M. Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.*, 28: 237-261, 1994.

TAIBI, A.; GUEVARA-ESPINOLA, A.; SCHONECK, B. YAHIAQUI, B. & QUAISSI, A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of Tc24 protein. *Parasitology*, 111: 581-590, 1995.

TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity. *Trends Parasitol.* 19(10): 447-451, 2003.

TEIXEIRA, A.R.; CUNHA-NETO, E. & RIZZO, L.V. Autoimmunity is not an impediment for vaccination against Chagas's disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 20(2): 123-127, 1987.

TEIXEIRA, A.R.L. Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos. *Editora Universidade de Brasília*, 161p, 1987.

TEIXEIRA, A.R.L.; CUNHA-NETO, E.; RIZZO, L.V. & SILVA, R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. *J. Infec. Dis.*, 162: 1420, 1990.

TEIXEIRA, A.R.L.; LACAVA, Z.G.M.; SANTANA, J.M. & LUNA, H. Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24(1): 55-58, 1991.

TEIXEIRA, A.R.L.; ARGANÂRAZ, E.R.; FREITAS, JR.; LACAVA, Z.G.M.; SANTANA, J.M. & LUNA, H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mut. Res.*, 305: 197-209, 1994.

TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J. & STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(5): 463-491, 2006.

TEIXEIRA A.R.L. Doença de Chagas e Evolução. *Editora Universidade de Brasília*, 2006 (em impressão).

TEKIEL, V.S.; MIRKIN, G.A. & GONZALEZ CAPPA, S.M. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 115: 495-502, 1997.

TEMPLETON, A.R. Out of Africa again and again. *Nature* 416: 45-51, 2002.

THORSNESS, P.E & WEBER, E.R. Escape and migration of nuclei acids between chloroplast, mitochondria and the nucleus. *Int. Rev. Cytol.*, 165: 207 – 234, 1996.

TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, 42: 277 – 292, 1988.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology*, 36: 47 – 115, 1995.

TISHKOFF, S.A.; PAKSTIS, A.J.; STONEKING, M.; KIDD, J.R.; DESTRO-BISOL, G.; SANJANTILA, A.; LU, R.B.; DEINARD, A.A.; SIRUGO, G. JENKINS, T.; KIDD, K.K. & CLARK, A.G. Short tandem-repeat polymorphism/alu haplotype variation at PLAT locus: implications for modern human origins. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 901 – 925, 2001.

TREVORS, J.T. Early assembly of cellular life. *Biophysics & Molecular Biology*, 81: 201 – 217, 2003.

ULLU E. & TSCHUDI, C. *Alu* sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* 312: 171-172, 1984.

VAGO, A.R.L.; ANDRADE, O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D. & MACEDO, A.M. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas Disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, 156: 1805-1809, 2000.

VANDERGON, T.L. & REITMAN, M. Evolution of chicken repeat 1 (CR1) elements: evidence for ancient subfamilies and multiple progenitors. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 886-898, 1994.

WATERSTON, R.H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J.F.; AGARWAL, P.; AGARWALA, R.; AINSCOUGH, R.; ALEXANDERSSON, M.; *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520 – 562, 2002.

WEINER, A.M. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feed you. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14(3): 343-350, 2002.

WHITCOMB, J.M. & HUGHES, S.H. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 275 – 306, 1992.

WICKER, T.; ROBERTSON, J.S.; SCHELZE, 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 Res.*, 15(1): 126-136, 2005.

WILLIAMS, D.L.; SAYED, A.A.; RAY, D.; McARTHUR, A.G. *Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *in press*, 2006.

WOLF, Y.I.; KONDRASKOV, A.S. & KOONIN, E.V. Interkingdom gene fusions. *Genome Biology*, 1(6): 1-13, 2001.

WOOD, J.N.; HUDSON, L.; JESSELL, T.M. & YAMAMOTO, M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature* 296: 34-38, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO weekly Epidemiol. Record.*, 1:1-2/1, 1997.

XIONG, Y. & EICKBUSH, T.H. Origin and evolution of retroelement based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBRO J.*, 9: 3353-3362, 1990.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SANCHES, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.; LOPES, E.; GONZALES, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W. DE ARIAS, A.R. & MILES, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos host of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.*, 35(2): 225-233, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)