

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

TATIANA SHIROMA BORGES FERREIRA

**USO DE METODOLOGIA CRISPR/dCas9 PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
TRANSFERÊNCIA GÊNICA HORIZONTAL ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO –  
APLICAÇÃO NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

BRASÍLIA

2023

TATIANA SHIROMA BORGES FERREIRA

**USO DE METODOLOGIA CRISPR/dCas9 PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
TRANSFERÊNCIA GÊNICA HORIZONTAL ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO –  
APLICAÇÃO NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Machado Hecht

Coorientadora: Prof. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau

BRASÍLIA

2023

*Aos meus pais. As vozes que me incentivam na caminhada. Os abraços que me acolhem nos obstáculos. As mãos que me aplaudem nas conquistas. Amo vocês imensamente.*

## AGRADECIMENTOS

Este foi, sem dúvidas, o maior desafio vivido por mim até o momento. Aprendi a ter muita resiliência e persistência para superar todas as adversidades. Certamente, saio desta etapa muito melhor do que entrei, com o coração carregado de gratidão por tê-la concluído. Ainda que fazer um mestrado seja um esforço solitário, não foi sozinha que cheguei até aqui. Na verdade, este trabalho só foi possível porque tive muito apoio!

Agradeço, primeiramente, à Deus, por sempre ter me abençoado com muita saúde, luz e sabedoria para que eu pudesse trilhar este caminho da melhor maneira possível.

Agradeço imensamente aos meus pais. Busquei honrar todo o esforço incondicional que fizeram pela minha educação. Não haveria nenhuma conquista se vocês não tivessem aberto o caminho para mim. O suporte, afeto e amor de vocês torna tudo mais fácil.

Ao Dimitri, meu companheiro, melhor amigo e parceiro de todas as horas. Você trouxe leveza e alegria nesses últimos anos. Seu apoio emocional e incentivo fizeram toda a diferença nessa jornada. E agradeço à minha sogra Silvia, pelas orações, torcida e carinho de sempre.

À minha querida orientadora, Mariana Hecht, por ter me recebido no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LIB), sem nem me conhecer, quando eu ainda estava na graduação. Todas as experiências, práticas e conhecimentos que me trouxeram até aqui foram sob sua orientação. Agradeço por toda paciência, carinho, confiança, oportunidades, e também por me dar autonomia para caminhar sozinha. Você é uma orientadora extraordinária e exemplar!

À minha coorientadora, Izabela Bastos, por ter sido tão receptiva desde o início, e por ter aberto as portas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) para mim. Muito obrigada por todas as orientações, ensinamentos e auxílio ao longo desses últimos anos.

Às queridas professoras Nadjar, Luciana e Juliana, que sempre se mostraram solícitas e disponíveis para qualquer ajuda. As sugestões, trocas de ideias e ensinamentos de vocês contribuíram para a minha formação. Agradeço também ao Bruno Dallago, pela disponibilidade e auxílio nas análises estatísticas. A competência e generosidade de vocês tornam o ambiente do LIB extremamente enriquecedor!

À Aline Moraes, grande amiga e braço direito. Você me auxiliou, desde o início, em inúmeros momentos e ocasiões. Agradeço imensamente toda a ajuda, ensinamento, conversas e companhia diária. Você é uma pessoa ímpar, de coração enorme!

À Alexandra Carvalho, por ter sido a primeira a me receber e ambientar ao LIPH. Obrigada pela ajuda, parceria, ideias e conversas.

Às minhas companheiras de LIB, Carol, Manu, Marina, Mavi, Nayra, Stefhani, Tamyres e Vitória. A amizade, parceria e conversas foram essenciais nesse período.

À Danielle Marques, por sempre oferecer o suporte necessário na secretaria, colaborando para o bom andamento das pesquisas. Agradeço também à Isabella Teotônio, por garantir que não nos faltasse material e por auxiliar no bom funcionamento do laboratório.

Aos professores do LIPH, Carla, Flávia e Jaime, pela receptividade e ajuda quando precisei.

Aos amigos do LIPH, Beatriz, Dani, Gabriel, Giulia, Kaio, Karen, Nath, Renan, Tarcila, Verônica. Obrigada pela amizade e conversas na copa. Vocês trouxeram muita alegria durante esses anos!

Às minhas irmãs da vida, Ila e Isadora, por todo o companheirismo, carinho, torcida e união. A amizade de vocês vale ouro. Obrigada pelas conversas, desabafos, incentivo e apoio. É ótimo saber que tenho vocês como amigas!

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À FAPDF, CNPQ e FAHUB pelo financiamento da pesquisa.

## RESUMO

A transferência gênica horizontal (TGH) tem um papel importante na plasticidade evolutiva dos organismos para novos ambientes e condições, podendo ser favorecida por diversas relações ecológicas, como o parasitismo. Exemplos convincentes de TGH têm sido demonstrados em diferentes parasitos e hospedeiros, como é o caso da transferência de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma hospedeiro, preferencialmente em regiões de retroelementos LINE-1. Nesse sentido, várias metodologias são utilizadas para inferir a presença de TGH entre organismos não relacionados, cada uma com seu próprio conjunto de características e limitações. Recentemente, técnicas de marcação fluorescente passaram a ser empregadas para verificar a integração e localização de genes candidatos a TGH no genoma do hospedeiro. Assim, vários estudos já utilizaram o sistema CRISPR/dCas9 (Cas9 desativada), ligado a proteína verde fluorescente (GFP – *Green Fluorescent Protein*), para investigar a organização e dinâmica cromossômica e visualizar *loci* genômicos. Embora nenhum estudo ainda tenha utilizado a técnica para detectar eventos TGH, o sistema mostra-se promissor para tal, uma vez que possibilita avaliar a organização espaço-temporal dessas sequências no genoma. Neste trabalho, demonstramos a TGH na relação parasito-hospedeiro por metodologia CRISPR/dCas9, utilizando como modelo células infectadas pelo *T. cruzi*. Inicialmente, a técnica foi validada com diversos controles, o que mostrou especificidade de marcação e ausência de alvos inespecíficos. Nos grupos experimentais, células HEK-293 infectadas pelo parasito apresentaram pontos fluorescentes no núcleo, em diferentes períodos analisados, quando transfectadas com RNA guia (gRNA) para sequência de kDNA (gkDNA). Ainda, demonstramos que a transferência de kDNA independe da presença do parasito, uma vez que a transfecção com gkDNA detectou alvos no genoma de células tratadas com benznidazol e de células cocultivadas com o parasito em sistema *transwell*. Além disso, nossos dados mostram que a infecção pelo *T. cruzi* aumenta a expressão de retroelementos LINE-1. Em contraste, células transfectadas com gRNA para LINE-1 e posteriormente infectadas tiveram a expressão desses retroelementos reprimida em quase 80%. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o sistema CRISPR/dCas9 foi capaz de identificar sequência de DNA proveniente de evento TGH no modelo de estudo. Os achados dão suporte ao uso da técnica como metodologia complementar na identificação e estudo de sequências transferidas horizontalmente entre diferentes organismos.

**Palavras-chave:** Transferência gênica horizontal; CRISPR/dCas9; *Trypanosoma cruzi*; minicírculos de kDNA.

## ABSTRACT

Horizontal gene transfer (HGT) plays an important role in the evolutionary plasticity of organisms to new environments and conditions, and may be favored by several ecological relationships, such as parasitism. Convincing examples of HGT have been demonstrated in different parasites and hosts, as is the case of the transfer of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles to the host genome, preferentially in regions of LINE-1 retroelements. In this sense, several methodologies are used to infer the presence of HGT among unrelated organisms, each with its own set of characteristics and limitations. Recently, fluorescent labeling techniques have been used to verify the integration and localization of HGT candidate genes in the host genome. Thus, several studies have already used the CRISPR/dCas9 system (Cas9 deactivated), linked to GFP, to investigate chromosomal organization and dynamics and visualize genomic loci. Although no study has yet used the technique to detect HGT events, the system shows promise for this, since it makes it possible to evaluate the space-time organization of these sequences in the genome. In this work, we demonstrate lateral gene transfer in the host-parasite relationship using the CRISPR/dCas9 methodology, using *T. cruzi*-infected cells as a model. Initially, the technique was validated with several controls, which showed labeling specificity and absence of nonspecific targets. In the experimental groups, HEK-293 cells infected by the parasite showed fluorescent spots in the nucleus, at different periods analyzed, when transfected with guide RNA (gRNA) for the kDNA sequence (gkDNA). Furthermore, we demonstrate that kDNA transfer does not depend on the presence of the parasite, since gkDNA transfection detected targets in the genome of cells treated with benznidazole and cells co-cultured with the parasite in the transwell system. Furthermore, our data show that *T. cruzi* infection increases the expression of LINE-1 retroelements. In contrast, cells transfected with LINE-1 gRNA and later infected had the expression of these retroelements repressed by almost 80%. The results obtained in this work demonstrated that the CRISPR/dCas9 system was able to identify the DNA sequence from the HGT event in the study model. The findings support the use of the technique as a complementary methodology in the identification and study of horizontally transferred sequences between different organisms.

**Keywords:** Horizontal gene transfer; CRISPR/dCas9; *Trypanosoma cruzi*; kDNA minicircles.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura de LINE-1.	15
<b>Figura 2:</b> Principais metodologias utilizadas para identificar eventos de transferência gênica horizontal.	17
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do funcionamento do complexo Cas9/gRNA.	20
<b>Figura 4:</b> O sistema <i>SunTag</i> permite a amplificação de sinal para geração de imagens no genoma.	21
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	23
<b>Figura 6:</b> Curso clínico da doença de Chagas.	24
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática das formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	26
<b>Figura 8:</b> DNA do cinetoplasto de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	27
<b>Figura 9:</b> Esquema representando os grupos experimentais e os respectivos tempos de coleta.	36
<b>Figura 10:</b> Preparo do vetor gRNA_Cloning Vector para clonagem do gRNA.	42
<b>Figura 11:</b> Confirmação da clonagem dos RNAs guia por PCR.	43
<b>Figura 12:</b> Formação de complexos RNP com dCas9/gRNA ao redor do núcleo celular.	44
<b>Figura 13:</b> Validação do sistema dCas9- <i>SunTag</i> em células HEK-293 não infectadas.	45
<b>Figura 14:</b> Identificação de sequências de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma celular após diferentes tempos pós-infecção.	47
<b>Figura 15:</b> Curva de <i>melting</i> das amostras de células HEK-293 infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> .	48
<b>Figura 16:</b> Sequências de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> são transferidas para o genoma celular na ausência do parasito.	49
<b>Figura 17:</b> Transferência de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o genoma hospedeiro ocorre mesmo após tratamento.	50
<b>Figura 18:</b> Curva de <i>melting</i> das amostras de células HEK-293 cocultivadas com o parasito e das tratadas com benznidazol.	51
<b>Figura 19:</b> Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> modula a expressão de retroelementos LINE-1.	52
<b>Figura 20:</b> Ligação do sistema CRISPR/dCas9 impacta a transcrição gênica.	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Ferramenta básica de alinhamento ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
Cas9	Endonuclease associada à CRISPR ( <i>CRISPR-associated endonuclease</i> )
cDNA	DNA complementar
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
CRISPRa	CRISPR de ativação ( <i>CRISPR activation</i> )
CRISPRi	CRISPR de interferência ( <i>CRISPR interference</i> )
DC	Doença de Chagas
dCas9	Cas9 desativada ( <i>deactivated Cas9</i> )
dpi	Dias pós-infecção
EV	Vesículas extracelulares ( <i>Extracellular vesicles</i> )
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> )
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
gRNA	RNA guia
HDR	Reparo dirigido por homologia ( <i>Homology-Directed Repair</i> )
kDNA	DNA do cinetoplasto
LB	Meio Luria-Bertani
LINE	Longos elementos nucleares intercalados ( <i>Long Interspaced Nuclear Element</i> )
LTR	Repetições terminais longas ( <i>Long Terminal Repeat</i> )
MASP	Proteína de superfície associada à mucina
nDNA	DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração ( <i>Next-generation Sequencing</i> )
NHEJ	Junção de extremidade não homóloga ( <i>Non-homologous End Joining</i> )
NLS	Sinal de localizador nuclear ( <i>Nuclear Localization Signal</i> )
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador ( <i>Protospacer Adjacent Motif</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNP	Ribonucleoproteína
RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativa ( <i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i> )

scFv	Fragmento de anticorpo de cadeia única ( <i>Single-chain Variable Fragment</i> )
SINE	Curtos elementos nucleares intercalados ( <i>Short Interspaced Nuclear Element</i> )
TE	Elemento transponível ( <i>Transposable Element</i> )
TGH	Transferência gênica horizontal
UTR	Região não traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
1.1	Transferência gênica horizontal	12
1.2	Transferência gênica horizontal entre parasitos e hospedeiros	13
1.3	Transferência gênica horizontal e elementos transponíveis	14
1.4	Deteção e avaliação de eventos de transferência gênica horizontal	16
1.5	CRISPR/Cas9 como metodologia complementar para identificação de eventos de transferência gênica horizontal	19
1.6	Modelo de estudo: transferência gênica lateral em infecções por <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.6.1	<u><i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas</u>	21
1.6.2	<u>Aspectos genéticos de <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	25
1.6.3	<u>Transferência horizontal de kDNA para o genoma hospedeiro</u>	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31
	Objetivo geral	31
	Objetivos específicos	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	32
4.1	Desenho dos RNAs guia	32
4.2	Plasmídeos e clonagem dos gRNAs	32
4.3	Transformação bacteriana e PCR de colônia	33
4.4	Cultura de células	33
4.5	Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.6	Infecção das células por <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.7	Tratamento da cultura com benznidazol	34
4.8	Uso de sistemas <i>transwell</i>	34
4.9	Grupos experimentais	35
4.10	Extração de DNA	36
4.11	Análise qualitativa por PCR em tempo real (qPCR)	37
4.12	Extração de RNA e síntese de cDNA	37
4.13	Avaliação da expressão gênica de LINE-1	38
4.14	Transfecção das células e montagem das lâminas	39
4.15	Análise por microscópio de fluorescência	39

4.16	Análise estatística	39
5	<b>RESULTADOS</b>	41
5.1	Clonagem dos RNAs guia	41
5.2	Validação do sistema CRISPR/dCas9	43
5.3	Marcação de sequência de minicírculo de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma hospedeiro por CRISPR/dCas9	45
5.4	A transferência de minicírculo de kDNA para o genoma hospedeiro ocorre independentemente da presença do parasito	48
5.5	O sistema CRISPR/dCas9 bloqueia a expressão de retroelementos LINE-1	51
6	<b>DISCUSSÃO</b>	53
6.1	Validação de sistema CRISPR/dCas9 para identificação de transferência gênica lateral	53
6.2	CRISPR/dCas9 é capaz de detectar sequências de kDNA de <i>T. cruzi</i> transferidas lateralmente ao genoma hospedeiro	55
6.3	Transferência de kDNA de <i>T. cruzi</i> ocorre mesmo na ausência do parasito	56
6.4	Expressão de retroelementos LINE-1 é modulada por infecção de <i>T. cruzi</i> e transfecção por CRISPR/dCas9	57
7	<b>CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS</b>	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transferência gênica horizontal

Evolutivamente, a árvore da vida se origina a partir da “descendência com modificação”, onde o genoma da progênie pode diferir do da linhagem parental por meio de genes que são frequentemente perdidos, duplicados ou adquiridos de fontes externas por transferência gênica horizontal (TGH) (HUSNIK; MCCUTCHEON, 2018). A esse respeito, a TGH, processo pelo qual o DNA de um organismo é transferido para outro organismo de espécie não relacionada, foi inicialmente descrita como um importante mecanismo evolutivo em bactérias e arqueas (GOGARTEN; TOWNSEND, 2005; KOONIN, 2016), mas logo se verificou que essa troca de informações genéticas entre espécies diferentes também tinha um papel importante na evolução de numerosos organismos, sendo cada vez mais reconhecida como um canal genômico entre eucariotos (ANDERSSON, 2005; KEELING; PALMER, 2008).

A TGH bem-sucedida envolve várias etapas, que vão desde a introdução do DNA externo na célula receptora até a sua incorporação no genoma, seja acidentalmente por reparo do DNA do hospedeiro ou por um mecanismo de integração ativo (SIBBALD *et al.*, 2020). Entre organismos intimamente relacionados, a similaridade composicional entre os genomas do doador e do receptor promove a recombinação homóloga, levando a uma integração simplificada do material importado (SKIPPINGTON; RAGAN, 2011; SOUCY; HUANG; GOGARTEN, 2015). Além disso, para que o gene transferido horizontalmente sobreviva na linhagem do receptor, deve fornecer alguma vantagem adaptativa; caso contrário, seu destino estará sujeito a processos genéticos populacionais, incluindo seleção natural e deriva genética (ANDERSSON, 2005).

Em bactérias, o DNA é transferido horizontalmente por três mecanismos: transformação, transdução e conjugação. A transformação é a absorção direta de DNA exógeno do ambiente por uma célula. A transdução é uma transferência de DNA mediada por vírus através de fagos. A conjugação requer um contato célula-célula, onde o material genético é transferido por meio de um pilus de conjugação (SOUCY; HUANG; GOGARTEN, 2015). Todos esses processos são responsáveis pela variação do conteúdo gênico entre as espécies procarióticas. Já em organismos nucleados, a TGH pode ocorrer de duas formas: transferência de genes das organelas com origem endossimbiótica (mitocôndria e plastídio) para o núcleo da célula eucariótica (SYVANEN, 1994) e transferência entre espécies não relacionadas

(ANDERSSON, 2005). No último caso, a transferência pode ser explicada a partir de eventos patogênicos, como infecção viral, fagocitose e parasitismo (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY, 2013).

## 1.2 Transferência gênica horizontal entre parasitos e hospedeiros

Parasitos e hospedeiros têm, geralmente, uma associação física íntima e de longo prazo, frequentemente caracterizada por fortes pressões recíprocas exercidas um sobre o outro (VAN VALEN, 1973). Neste caso, a diversidade genética pode ser seletivamente favorecida em ambos os organismos, uma vez que há amplas oportunidades para a troca de material genético (AGEITOS; VIÑAS; VILLA, 2019). Assim, os genes adquiridos horizontalmente dos hospedeiros podem, por exemplo, fornecer aos parasitos a capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro, e os genes transferidos dos parasitos podem melhorar a resistência do hospedeiro (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY, 2013).

Diversos exemplos de trocas genéticas têm sido demonstrados desde a primeira evidência de transferência de elementos transponíveis (TE – *Transposable Element*) entre espécies de *Drosophila* (DANIELS *et al.*, 1990). A estreita associação entre plantas parasitárias e seus hospedeiros os torna excelentes modelos para o estudo de TGH (PETERSEN *et al.*, 2020). É o caso da angiosperma holoparasita *Lophophytum mirabile*, cujo genoma mitocondrial possui 35 dos 44 genes adquiridos de vários hospedeiros leguminosos. Curiosamente, a maioria dos genes exógenos são altamente transcritos e editados com eficiência por RNA (SANCHEZ-PUERTA *et al.*, 2017, 2019). Da mesma forma, 1,2% do genoma do parasito endofítico *Sapria himalayana*, incluindo genes e conteúdo intergênico, é derivado de transferências horizontais de seus hospedeiros e contém genes potencialmente adaptativos para o parasitismo, como defensina e quitinase, que codificam proteínas relacionadas à defesa ou resposta ao estresse (CAI *et al.*, 2021).

Vários casos de TGH entre parasitos unicelulares e seus hospedeiros também já foram relatados (EME *et al.*, 2017; HERRERA *et al.*, 2021; KISHORE; STILLER; DEITSCH, 2013; MOREIRA *et al.*, 2017). Parasitos protozoários vivem sobre ou dentro de outros organismos, o que aumenta a possibilidade de genes serem adquiridos horizontalmente e, posteriormente, repassados verticalmente. Essa via evolutiva é potencialmente vantajosa para esses parasitos, fornecendo novas funções biológicas e capacidade de se adaptarem rapidamente a novos ambientes e condições (RICHARDS *et al.*, 2003). Por exemplo, um estudo documentou que *Blastocystis* spp., um protozoário entérico dos seres humanos que está relacionado a episódios

diarreicos, adquiriu aproximadamente 2,5% de seus genes de organismos procariotos e eucariotos através de TGH. Esses genes adquiridos forneceram adaptação ao ambiente intestinal, como homeostase do pH e resistência ao estresse oxidativo. Vários dos genes transferidos lateralmente parecem ter vindo de hospedeiros animais, e outros parecem ter sido provenientes de trocas com outros protistas da mucosa, como *Trichomonas*, *Giardia* e *Entamoeba* (EME *et al.*, 2017).

Ainda, *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, parece ter adquirido genes funcionais da maquinaria epigenética de hospedeiro animal. O gene transferido coordena a expressão de outros genes envolvidos na evasão do sistema imune em apicomplexas modernos (KISHORE; STILLER; DEITSCH, 2013). O agente causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, também teve eventos de TGH descritos, com vários estudos identificando o DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito no genoma da célula hospedeira (GUIMARO *et al.*, 2014; TEIXEIRA, A. R. L. *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 1994, 2011b) e em diferentes tecidos de camundongos infectados (WESLEY *et al.*, 2019), sugerindo integração após infecção. Além disso, o kDNA do *T. cruzi* parece ser transmitido verticalmente em humanos, uma vez que foi detectado em células germinativas de indivíduos infectados e seus descendentes (HECHT *et al.*, 2010). A TGH na doença de Chagas será mais bem explorada adiante.

### 1.3 Transferência gênica horizontal e elementos transponíveis

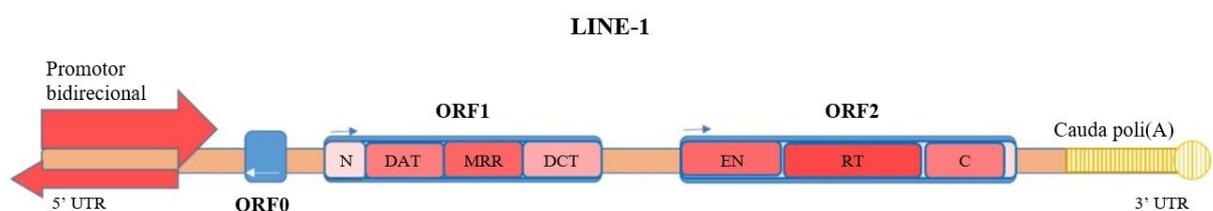
Em teoria, o DNA exógeno pode ser incorporado em qualquer lugar do genoma receptor, desde que não comprometa o funcionamento de um elemento genômico existente. No entanto, observa-se uma preferência de sequências transferidas horizontalmente por regiões enriquecidas em transposons e retrotransposons, segmentos de DNA capazes de se moverem de um *locus* para o outro, muitas vezes se duplicando (SIEBER; BROMLEY; DUNNING HOTOPP, 2017). Digno de nota, os TEs têm a capacidade de se mobilizar entre genomas de espécies filogeneticamente distantes através de vetores móveis, como vírus e parasitos (GILBERT *et al.*, 2010; GILBERT; FESCHOTTE, 2018).

Os TEs são classificados em duas classes principais, dependendo do seu mecanismo de transposição. A classe I contém os chamados retroelementos ou retrotransposons, que se movem por meio de transcritos reversos que se reintegram no genoma. Os elementos desta classe foram ainda divididos em retrotransposons com longas repetições terminais (LTR – *Long Terminal Repeat*) e em retrotransposons não-LTR, com base na sua estrutura organizacional

(WICKER *et al.*, 2007). Os elementos de classe II, ou DNA transposons, se mobilizam por meio de um DNA intermediário, seja por um mecanismo “recorta e cola”, catalisado por enzimas transposases, ou por replicação de DNA em círculos rolantes (helitrons) (THOMAS; PRITHAM, 2015).

Cada classe de TEs contém elementos autônomos e não-autônomos. Elementos autônomos codificam todas as proteínas necessárias para sua mobilização. Eles utilizam uma enzima transcriptase reversa que usa o transcrito como modelo para produzir uma sequência de DNA complementar (cDNA) que se reinsere aleatoriamente em um novo sítio genômico. Este é o chamado mecanismo de “copia e cola”. Por outro lado, elementos não-autônomos dependem da atividade retrotransposon provida por elementos autônomos para mobilidade. Retrotransposons não-LTR são divididos em elementos autônomos LINEs (*Long Interspersed Elements*) e não-autônomos SINEs (*Short Interspersed Elements*) (COLONNA ROMANO; FANTI, 2022; WICKER *et al.*, 2007).

Os genomas de vertebrados são amplamente compostos por TEs, cujas sequências têm sido usadas para decifrar a evolução da arquitetura do genoma ao longo de milhões de anos (ALMEIDA *et al.*, 2022; COLONNA ROMANO; FANTI, 2022; ZATTERA; BRUSCHI, 2022). De fato, aproximadamente 50% do genoma humano consiste em elementos transponíveis (SCHAACK; GILBERT; FESCHOTTE, 2010), dos quais os retroelementos LINE-1 (L1) são os únicos retrotransposons conhecidamente ativos e representam cerca de 17% do nosso genoma (LANDER *et al.*, 2001). Possuem aproximadamente 6 kb de comprimento, um promotor bidirecional na região 5’ não traduzida (UTR – *Untranslated Region*), duas fases de leitura abertas (ORF – *Open Reading Frame*) e uma região 3’ UTR pontuada por uma cauda poli(A) (**Figura 1** *Error! Reference source not found.*) (PROTASOVA; ANDREEVA; ROGAEV, 2021; SCOTT *et al.*, 1987). O L1 5’ UTR abriga um promotor interno de RNA polimerase II que direciona a transcrição a partir da extremidade 5’ do elemento (SWERGOLD, 1990); também contém sítios de ligação de ação *cis* para múltiplos fatores de transcrição (BECK *et al.*, 2011).



**Figura 1: Estrutura de LINE-1.** Esquema representativo demonstrando os componentes da estrutura de LINE-1. Abreviações: UTR, região não traduzida; N, domínio N-terminal; DAT, domínio amino-terminal; MRR, motivo

de reconhecimento de RNA; DCT, domínio carboxil-terminal; EN, endonuclease; RT, transcriptase reversa; C, domínio rico em cisteína. Adaptado de (PROTASOVA; ANDREEVA; ROGAEV, 2021).

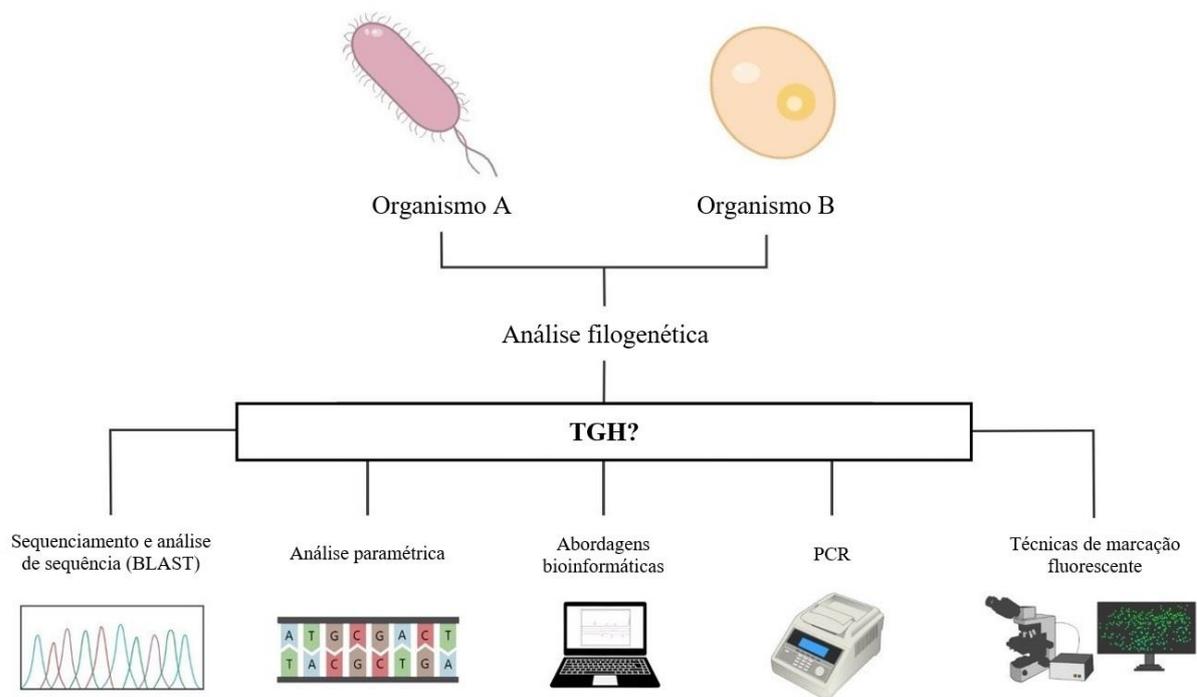
A ORF1 humana codifica a ORF1p, uma proteína com atividade de chaperona de ácido nucleico que parece ser necessária para a integração de L1 (MARTIN; BUSHMAN, 2001). ORF1p tem um domínio amino-terminal, um motivo de reconhecimento de RNA localizado centralmente e um domínio carboxil-terminal básico (HOLMES; SINGER; SWERGOLD, 1992; KHAZINA; WEICHENRIEDER, 2009; MORAN *et al.*, 1996). Já a ORF2 codifica a proteína ORF2p, que possui atividades de endonuclease e transcriptase reversa que são críticas para a retrotransposição de L1. ORF2p contém um domínio rico em cisteína de função desconhecida próximo ao seu terminal carboxila, que é necessário para a retrotransposição (BECK *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 1996; MATHIAS *et al.*, 1991; MORAN *et al.*, 1996). Na direção oposta, a recém descoberta ORF0 e dois promotores antisense estão localizados na região 5' UTR. A função de ORF0 ainda é pouco compreendida. No entanto, ela parece estar envolvida no aumento da mobilidade de L1 (DENLI *et al.*, 2015; MÄTLIK; REDIK; SPEEK, 2006).

#### 1.4 Detecção e avaliação de eventos de transferência gênica horizontal

O estudo de TGH é fundamental por vários motivos. Primeiro, do ponto de vista médico, a TGH desempenha um papel significativo no surgimento de novas doenças humanas, como infecções bacterianas, cânceres e várias doenças genéticas (BABAIAN *et al.*, 2016; BORGEAUD *et al.*, 2015; EMAMALIPOUR *et al.*, 2020; JANG *et al.*, 2019; PATERSON *et al.*, 2016; PAYER; BURNS, 2019). De uma perspectiva evolutiva, a TGH mudou os conceitos pré-existent sobre o genoma, as espécies e como elas são distribuídas e interconectadas na árvore da vida. Geneticamente, a TGH é uma importante fonte de aquisição de genes por organismos e muitas vezes resulta em adaptações a novos ambientes e condições (AGEITOS; VIÑAS; VILLA, 2019). Vale notar que a transferência de material genético entre parasitos e seus hospedeiros parece ter auxiliado na evolução do parasitismo; previamente revisado e discutido (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY, 2013). Devido à importância desses eventos, um número crescente de novos estudos estão sendo realizados para elucidar os processos e implicações da TGH.

Diversas metodologias utilizadas para inferir a presença de TGH em procariotos foram aplicadas a eucariotos (**Figura 2**), cada uma com seu próprio conjunto de características e limitações. O padrão-ouro para identificar eventos TGH é a análise filogenética, que mostra

diferentes padrões de ramificação entre duas árvores gênicas, uma das quais vem da espécie de referência. Em estudos filogenéticos, diferentes abordagens são empregadas para construir árvores filogenéticas e comparar topologias, como máxima verossimilhança, máxima parcimônia, junção de vizinhos e inferência bayesiana. No entanto, o número limitado de sítios no alinhamento pode causar erros estocásticos (ou erros aleatórios), notadamente em sequências altamente repetitivas (PHILIPPE; TELFORD, 2006). Ainda que os erros aleatórios na análise filogenética tenham sido significativamente reduzidos como resultado da recente explosão de sequenciamentos de genomas, observou-se que os erros sistemáticos aumentaram com alinhamentos mais longos (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020). Desta forma, é crucial reconhecer que os métodos de reconstrução filogenética não são perfeitos, e desvios no padrão de ramificação da árvore de referência podem até ser indicativos de TGH, mas requerem uma investigação mais aprofundada.



**Figura 2: Principais metodologias utilizadas para identificar eventos de transferência gênica horizontal.** Cada abordagem possui particularidades que devem ser combinadas adequadamente para identificar corretamente esses eventos. Elaborado pela própria autora.

Métodos de sequenciamento de alto rendimento permitem investigações genômicas de espécies candidatas a TGH. Essas tecnologias mais recentes abrangem uma variedade de estratégias que dependem de uma combinação de preparação de modelo, sequenciamento e imagem, bem como alinhamento do genoma e métodos de montagem (METZKER, 2010). Ferramentas avançadas de bioinformática foram desenvolvidas recentemente para auxiliar nas

análises (MCINNES *et al.*, 2020). Por exemplo, o MetaCHIP permite que os pesquisadores investiguem TGHs entre membros de uma comunidade microbiana usando uma combinação de abordagens filogenéticas e de melhor correspondência (SONG *et al.*, 2019). Uma técnica de *binning* desenvolvida recentemente faz uso de assinaturas de metilação de DNA detectadas por sequenciamento de molécula única em tempo real. Esse método aproveita esse mecanismo epigenético para melhorar a segregação do genoma e vincular elementos genéticos móveis aos seus cromossomos hospedeiros (BEAULAURIER *et al.*, 2018). No entanto, abordagens puramente bioinformáticas ainda são limitadas em sua capacidade de identificar com precisão todos os eventos TGH e, embora esses métodos possam filtrar contaminações após o sequenciamento, eles também podem remover verdadeiros positivos (SCHÖNKNECHT; WEBER; LERCHER, 2014).

Depois que as leituras dos sequenciamentos de nova geração (NGS – *Next-generation Sequencing*) são geradas, elas são alinhadas a uma sequência de referência conhecida. A ferramenta básica de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018) é amplamente usada para pesquisa e comparação de sequência inicial. Os candidatos a TGH podem compartilhar mais semelhanças com parentes distantes do que com parentes próximos, ou podem ter uma distribuição irregular de uma família de proteínas (SCHÖNKNECHT; WEBER; LERCHER, 2014). Na maioria dos casos, as sequências das abordagens BLAST são usadas para amplificação direta de genes de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou estudos de expressão gênica por PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) (AGEITOS; VIÑAS; VILLA, 2019). A presença de um gene estranho nesses casos pode ser consistente com o conceito de TGH. No entanto, a duplicação de genes seguida de perda diferencial de genes é uma alternativa à TGH (GOGARTEN; TOWNSEND, 2005).

Os genes transferidos lateralmente podem exibir uma composição de base que difere do restante do genoma, refletindo a composição de base do genoma do doador. A análise paramétrica usa desvios no conteúdo de guanina/citosina (GC), frequências de oligonucleotídeos ou padrão de códons (AZAD; LAWRENCE, 2011; BECQ; CHURLAUD; DESCHAVANNE, 2010) para identificar candidatos a TGH. Assim, espera-se que esses genes exibam o viés de códon de organismos “doadores”. Por outro lado, a perda de genes ou a divergência rápida de sequência pode resultar em padrões de distribuição desiguais (EISEN, 2000). Além disso, os métodos paramétricos são mais sensíveis para detectar TGHs recentes porque, ao longo do tempo, a composição das bases exógenas tende a se homogeneizar com o

DNA receptor por um processo chamado de melhoramento (DREZEN *et al.*, 2017). Portanto, esses métodos são de valor limitado para identificar esses eventos.

Técnicas de marcação fluorescente foram recentemente empregadas para verificar a integração e localização de genes candidatos a TGH no genoma do hospedeiro. Por exemplo, a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi usada para confirmar as inserções de DNA da bactéria *Wolbachia* spp. em vários cromossomos de artrópodes (BRELSFOARD *et al.*, 2014; FUNKHOUSER-JONES *et al.*, 2015).

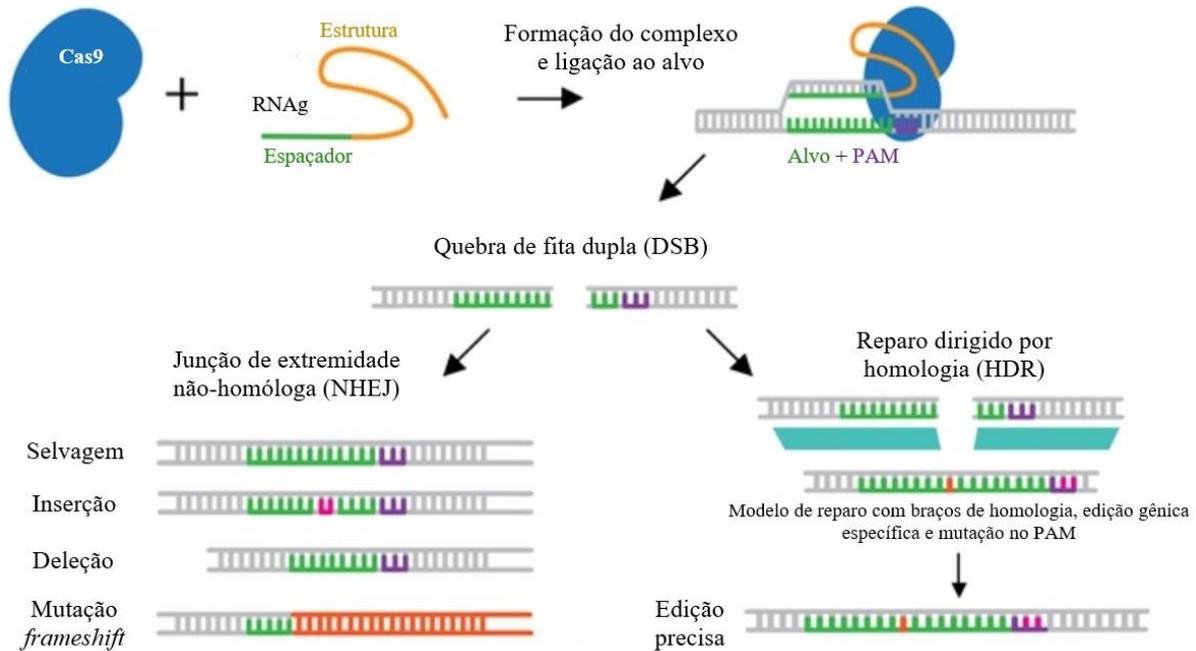
Outra técnica desenvolvida recentemente mostra-se promissora para detectar eventos TGH. É possível visualizar sequências específicas de DNA endógeno em células vivas desativando a Cas9 (dCas9), uma proteína associada ao sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (CHEN; GUAN; HUANG, 2016). Vários estudos já utilizaram o sistema CRISPR/dCas9, que está ligado a proteína verde fluorescente (GFP – *Green Fluorescent Protein*), para investigar a organização e dinâmica cromossômica, bem como visualizar diferentes *loci* genômicos (GUO *et al.*, 2019; KHOSRAVI *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). Assim, o sistema tem um enorme potencial para identificar a integração e localização de sequências candidatas a TGH, embora nenhum estudo ainda tenha utilizado a técnica para este fim.

### **1.5 CRISPR/Cas9 como metodologia complementar para identificação de eventos de transferência gênica horizontal**

O sistema CRISPR tipo II, derivado de *Streptococcus pyogenes*, utiliza uma proteína Cas9 para reconhecer sequências de DNA, com especificidade de alvo determinada apenas por um pequeno RNA guia (gRNA) e um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), uma sequência NGG, onde N é qualquer nucleotídeo. Após a ligação ao DNA alvo, o complexo Cas9-gRNA gera uma quebra de fita dupla do DNA (**Figura 3**) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012). Ao aproveitar essa atividade de nuclease guiada por RNA, o CRISPR pode ser reajustado para editar os genomas de uma ampla variedade de organismos (WANG; DOUDNA, 2023).

Além disso, a proteína Cas9 pode ter a função nuclease desativada (“*dead*” Cas9 - dCas9) para que se ligue à sequência alvo sem causar quebra na fita de DNA, o que permitiria outras aplicações. Por exemplo, através da fusão de domínios reguladores com a dCas9, a CRISPR de interferência (CRISPRi) e a CRISPR de ativação (CRISPRa) têm sido usadas para regular a expressão de genes endógenos (DOMINGUEZ; LIM; QI, 2016; WANG; LA RUSSA;

QI, 2016). Ainda, a capacidade de ligação programável da dCas9 também foi adaptada para geração de imagens de sequências específicas de DNA endógeno de células vivas. Em sua primeira versão, a dCas9 foi fundida diretamente com proteínas fluorescentes, como a GFP, e um gRNA estruturalmente otimizado que melhorasse a interação com a proteína dCas9 (CHEN *et al.*, 2013).

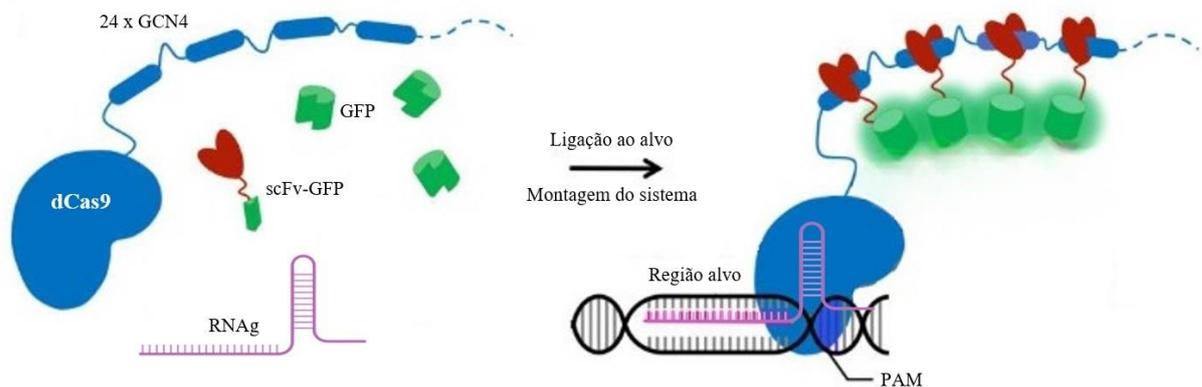


**Figura 3: Representação esquemática do funcionamento do complexo Cas9/gRNA.** A enzima Cas9 é combinada ao RNA guia (gRNA), que inclui uma sequência de RNA de 20 nucleotídeos complementar à sequência alvo (espaçador), e uma sequência que irá se ligar e estabilizar a proteína Cas9 (estrutura). Após a formação do complexo, o sistema CRISPR irá se ligar à região de DNA e produzir uma quebra de fita dupla (DSB) no local definido pela sequência de gRNA. Quebras de fita dupla são reparadas preferencialmente por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), um mecanismo que frequentemente causa inserções, deleções ou mudança na matriz de leitura (*frameshift*) no DNA. Inserções e deleções (*indels*) geralmente levam a mudanças de estrutura, criando perda de função em alelos. Quando um modelo de reparo está presente, a célula pode reparar a fita dupla usando reparo direcionado por homologia (HDR). Adaptado de (ADDGENE, 2023).

O recrutamento de várias cópias de uma proteína para um substrato alvo (por exemplo, DNA, RNA ou proteína) auxilia, consideravelmente, na amplificação de sinal em sistemas biológicos. Por exemplo, a ligação de várias cópias de um fator de transcrição a um único promotor aumentou drasticamente a ativação transcricional do gene alvo (CHEN; AZIZKHAN; LEE, 1992). O princípio da amplificação de sinal via multimerização de proteínas também tem sido amplamente utilizado na geração de imagens. Inicialmente, buscou-se desenvolver um sistema no qual domínios de proteínas se ligassem com alta afinidade a uma sequência de ácidos nucleicos relativamente curta. Dessa forma, anticorpos passaram a ser utilizados, uma vez que possuem alta afinidade e especificidade e, o que é mais importante, podem ser projetados

epítomos peptídicos que diferem das sequências que ocorrem naturalmente no genoma (COLBY *et al.*, 2004).

Para aumentar os sinais emitidos, um estudo desenvolveu um sistema denominado *SunTag* que contém várias cópias (até 24 cópias) de epítomos peptídicos GCN4 adicionadas a dCas9. Alguns pares anticorpo-peptídeo já haviam sido testados previamente, porém apenas o par GCN4 apresentou ligação robusta e específica sem danificar a morfologia da estrutura alvo (TANENBAUM *et al.*, 2014). A fusão da GFP com um fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv – *single-chain variable fragment*) contra o peptídeo GCN4 permite que mais cópias de proteínas fluorescentes sejam recrutadas para um único complexo dCas9/gRNA (**Figura 4**). Posteriormente, é possível analisar se as proteínas de fusão anticorpo-GFP foram recrutadas para o sítio alvo por microscopia de fluorescência, o que indicaria ligação entre anticorpo e peptídeo (HONG *et al.*, 2018).



**Figura 4: O sistema *SunTag* permite a amplificação de sinal para geração de imagens no genoma.** Representação esquemática mostrando o sistema *SunTag*. Neste caso, o complexo CRISPR/dCas9 é fundido com uma matriz contendo 24 cópias de peptídeos GCN4. Essa matriz é capaz de recrutar múltiplas cópias de scFv-GFP, permitindo a marcação de *loci* genômicos em células vivas. Adaptado de (CHAUDHARY *et al.*, 2020).

Assim, o sistema CRISPR oferece uma abordagem complementar ao FISH ou ao uso de proteínas de ligação ao DNA para geração de imagens. A capacidade de amplificar sinais biológicos através da multimerização controlada de proteínas permite aplicações adicionais em pesquisa biológica e biotecnológica. Desse modo, a utilização dessa metodologia em estudos com *T. cruzi* pode contribuir para a comprovação de transferência e integração de kDNA do parasito em células hospedeiras. De forma geral, a técnica pode representar uma estratégia complementar para visualizar a organização e a dinâmica de sequências transferidas em eventos TGH.

### 1.6 Modelo de estudo: transferência gênica lateral em infecções por *Trypanosoma cruzi*

### 1.6.1 Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas

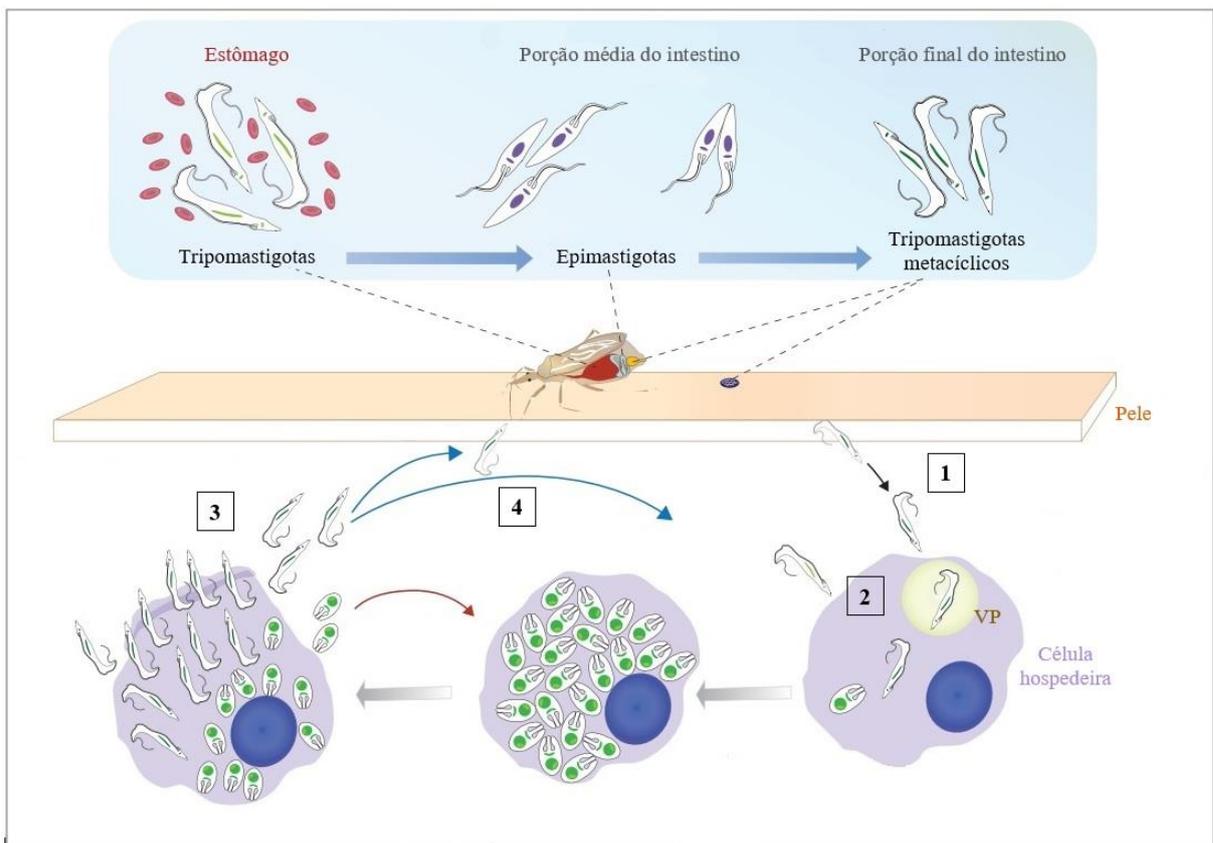
*Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae; um antigo grupo monofilético eucariótico que inclui espécies monoxênicas e heteroxênicas (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2020). Agente etiológico da doença de Chagas (DC), foi descrito pela primeira vez pelo médico Carlos Chagas em 1909, juntamente com seu ciclo de vida, vetor e sintomas da doença (CHAGAS, 1909). Desde então, milhões de pessoas já foram infectadas por *T. cruzi*, sendo atualmente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo todo (WHO, 2022). Além disso, estima-se que mais de 75 milhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção, o que torna o parasito uma preocupação de saúde global (DNDI, 2022; WHO, 2022).

Em áreas endêmicas, a transmissão do parasito ocorre principalmente pela via vetorial, especialmente por meio de três espécies de insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* e *Panstrongylus megistus* (BERN *et al.*, 2019; WHO, 2022). Outras vias de transmissão não vetoriais, como transfusão de sangue e transmissão congênita, constituem as principais formas de infecção em humanos em áreas urbanas e países não endêmicos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2022). Ainda, o parasito pode ser disseminado pela via sexual (ARAUJO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2016) ou por meio de alimentos ou bebidas; via de transmissão geralmente responsável por surtos regionais de infecção aguda, resultando em manifestações clínicas mais severas e alta taxa de mortalidade (PEREIRA *et al.*, 2009).

*T. cruzi* possui um ciclo de vida heteroxênico (**Figura 5**), alternando em diferentes formas evolutivas nos insetos vetores e hospedeiros mamíferos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Os insetos se infectam por meio de repasto sanguíneo em animais ou seres humanos que possuem formas tripomastigotas circulantes. No trato digestivo do vetor, tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, principal estágio de replicação no hospedeiro invertebrado. Os epimastigotas migram para a porção final do intestino e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são excretados com as fezes do vetor. A infecção ocorre quando estas formas invadem o organismo hospedeiro através da mucosa ou por lesão, preexistente ou decorrente da picada do inseto (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem vários tipos de células através de um mecanismo mediado por lisossomos (BURLEIGH; ANDREWS,

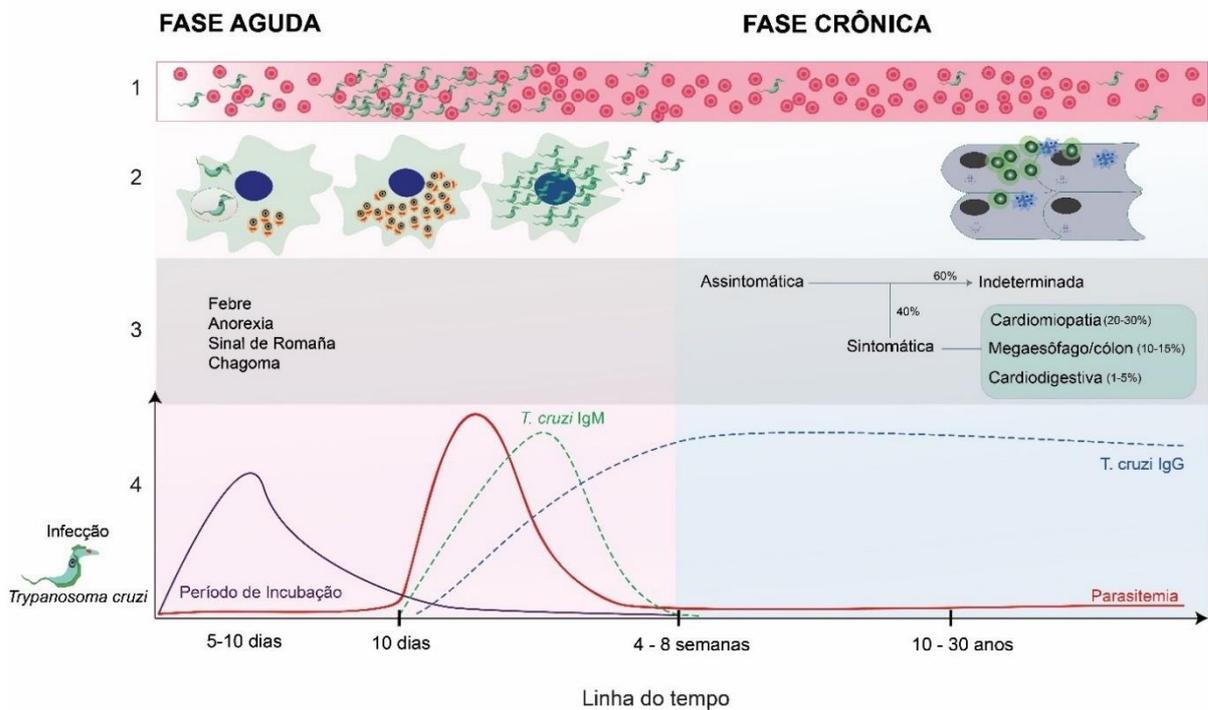
1995). No citoplasma, o parasito se diferencia na forma amastigota e começa a se replicar por fissão binária. Quando a célula está repleta por amastigotas, elas se transformam novamente em tripomastigotas pelo crescimento de flagelos. Estes lisam as células, invadem os tecidos adjacentes e se espalham pelos vasos linfáticos e sanguíneos para sítios distantes, principalmente células musculares (cardíacas, lisas e esqueléticas), onde passam por novos ciclos de multiplicação intracelular. O ciclo é completado quando os tripomastigotas circulantes são captados em repastos sanguíneos por insetos vetores (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).



**Figura 5: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** O parasito é transmitido principalmente por insetos vetores em países endêmicos. 1) Tripomastigotas metacíclicos liberados nas fezes do triatomíneo durante o repasto sanguíneo entram no hospedeiro mamífero através de membranas mucosas ou lesões na pele e invadem células locais. 2) Após a invasão celular, o parasito fica retido dentro de um vacúolo parasitóforo (VP), de onde escapa, transforma-se em amastigota e se multiplica no citosol. 3) Após a divisão binária, as formas amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas altamente móveis que são liberados pela lise celular. 4) Estes conseguem infectar células vizinhas, migrar para diferentes tecidos ou ser ingeridos por um inseto vetor. Adaptado de (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020).

Após a primeira infecção, inicia-se a fase aguda da DC, quase sempre assintomática, mas caracterizada por alta parasitemia (**Figura 6**). Na transmissão vetorial, a presença de nódulo cutâneo (chagoma) ou edema palpebral unilateral (sinal de Romaña) pode indicar o sítio de inoculação (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; RASSI; RASSI; MARCONDES DE

REZENDE, 2012). A infecção persiste com baixa parasitemia e a doença progride para uma fase crônica imprevisível. Aproximadamente 30% dos pacientes infectados evoluem com manifestações clínicas severas que incluem danos ao coração e ao trato gastrointestinal, popularmente conhecidos como megacárdio, megaesôfago e megacólon (PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015). O tratamento da DC se baseia em dois fármacos licenciados há mais de 50 anos: nifurtimox e benznidazol. Ambos os compostos apresentam baixa eficácia na fase crônica da infecção e significativas reações adversas, ressaltando a importância do diagnóstico e intervenção precoces (COURA; CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).



**Figura 6: Curso clínico da doença de Chagas.** O período de incubação de *T. cruzi* dura de 5 a 10 dias, sendo seguido pela fase aguda da infecção. Podendo ser oligossintomático, esse estágio é caracterizado por alta parasitemia e elevada produção de anticorpos IgM, que começam a diminuir após 4 semanas. Durante a fase crônica, a parasitemia permanece quase indetectável no sangue periférico e há aumento na produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Cerca de 30 a 40% dos pacientes infectados podem desenvolver manifestações clínicas crônicas, como cardiomiopatia, megaesôfago/cólon ou cardiodigestiva. 1: Parasitemia no sangue periférico; 2: Parasitemia nas células/tecido; 3: Manifestações clínicas na infecção por *T. cruzi*; 4: Gráfico representando período de incubação do parasito (linha roxa), parasitemia (linha vermelha), curva de produção de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* (linha verde tracejada) e IgG anti-*T. cruzi* (linha azul tracejada). Fonte: (MORAES, 2022).

Duas teorias são propostas para explicar a patogênese da DC: 1) Persistência parasitária com ruptura das células infectadas e liberação de antígenos do parasito que estimula processo inflamatório (GUTIERREZ *et al.*, 2009; ZHANG; TARLETON, 1999); e 2) Rejeição autoimune de células-alvo pelas células efectoras inflamatórias do sistema imunológico (BONNEY; ENGMAN, 2008; SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Apesar de distintas, essas teorias não são excludentes. Wesley *et al.* (2019) sugeriram uma

teoria integrativa ao demonstrar que carga parasitária, integração de kDNA e reação inflamatória estão associadas. Análises de correlação em camundongos infectados revelaram que altas taxas de integração de kDNA no coração e na medula óssea estavam associadas ao aumento de anticorpos IgG contra *T. cruzi* e proteínas cardíacas. Do mesmo modo, alta carga parasitária no coração estava relacionada com aumento de citocinas pró-inflamatórias e produção de autoanticorpos contra proteínas do coração e do intestino, representando uma ligação direta entre persistência parasitária e autoimunidade (WESLEY *et al.*, 2019).

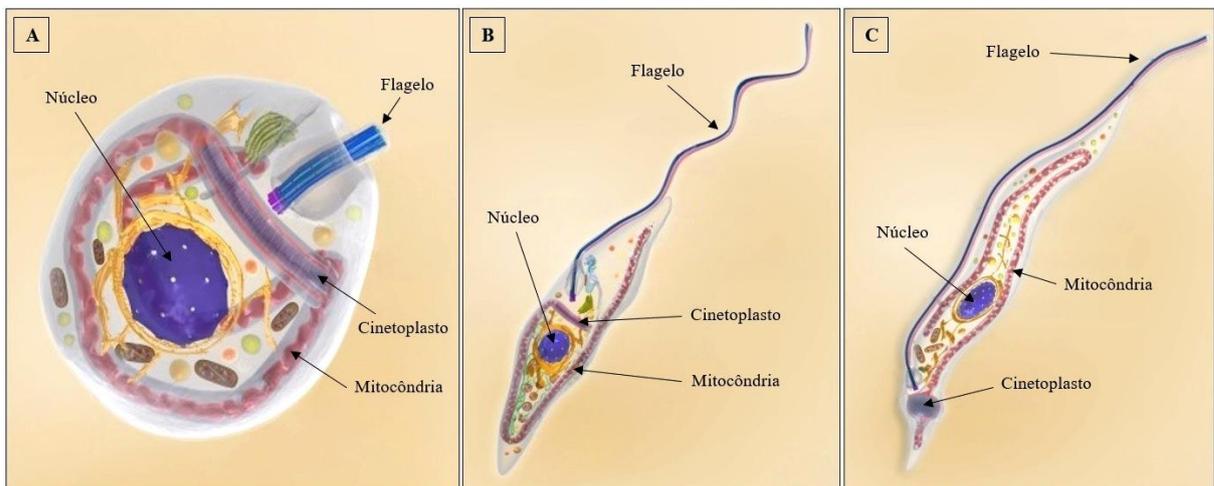
### 1.6.2 Aspectos genéticos de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* armazena DNA genômico (DNA nuclear, nDNA) em um núcleo envolto por membranas contendo poros típicos de eucariotos. O genoma contém 60,3 Mpb, e a quantidade de DNA total varia de 125 a 280 fg/célula (LEWIS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2011a). Essas diferenças são explicadas pelo número e tamanho relativo de cromossomos devido a inserções, duplicações e deleções, ou pelo conteúdo relativo de células haplóides, diplóides ou aneuplóides, durante o processo de crescimento (CAMPBELL; STURM, 2012). O sequenciamento completo do genoma de *T. cruzi* revelou que o parasito codifica cerca de 22.570 proteínas distintas, das quais 12.570 representam pares alélicos. Mais de 50% do genoma consiste em sequências repetidas, como retrotransposons e genes de grandes famílias de moléculas de superfície, incluindo trans-sialidasas, mucinas e proteína de superfície associada à mucina (MASP) (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Além disso, *T. cruzi* se caracteriza por possuir uma mitocôndria única, onde se encontra o cinetoplasto, cuja posição em relação ao núcleo muda durante o ciclo de vida (**Figura 7**). Essa estrutura discóide é formada por um conjunto de filamentos semelhante a uma rede composta por uma grande quantidade de DNA extranuclear denominado DNA do cinetoplasto (kDNA) (RIOU; DELAIN, 1969). A rede de kDNA compreende 15 a 30% do DNA celular total e é constituída por dois tipos de anéis de DNA: dezenas de maxicírculos (20 a 40 kb) e milhares de minicírculos (1,4 kb) que estão entrelaçados entre si (**Figura 8**). Os maxicírculos são estrutural e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial em eucariotos superiores, codificando RNAs ribossômicos e subunidades de complexos respiratórios (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; THOMAS *et al.*, 2007).

O minicírculo de *T. cruzi* possui quatro regiões conservadas (122 pb) intercaladas por regiões hipervariáveis (~240 pb). A região conservada é composta por um bloco de sequência rico em adenina/citosina, que pode ser a origem da replicação, transcrição, recombinação e um

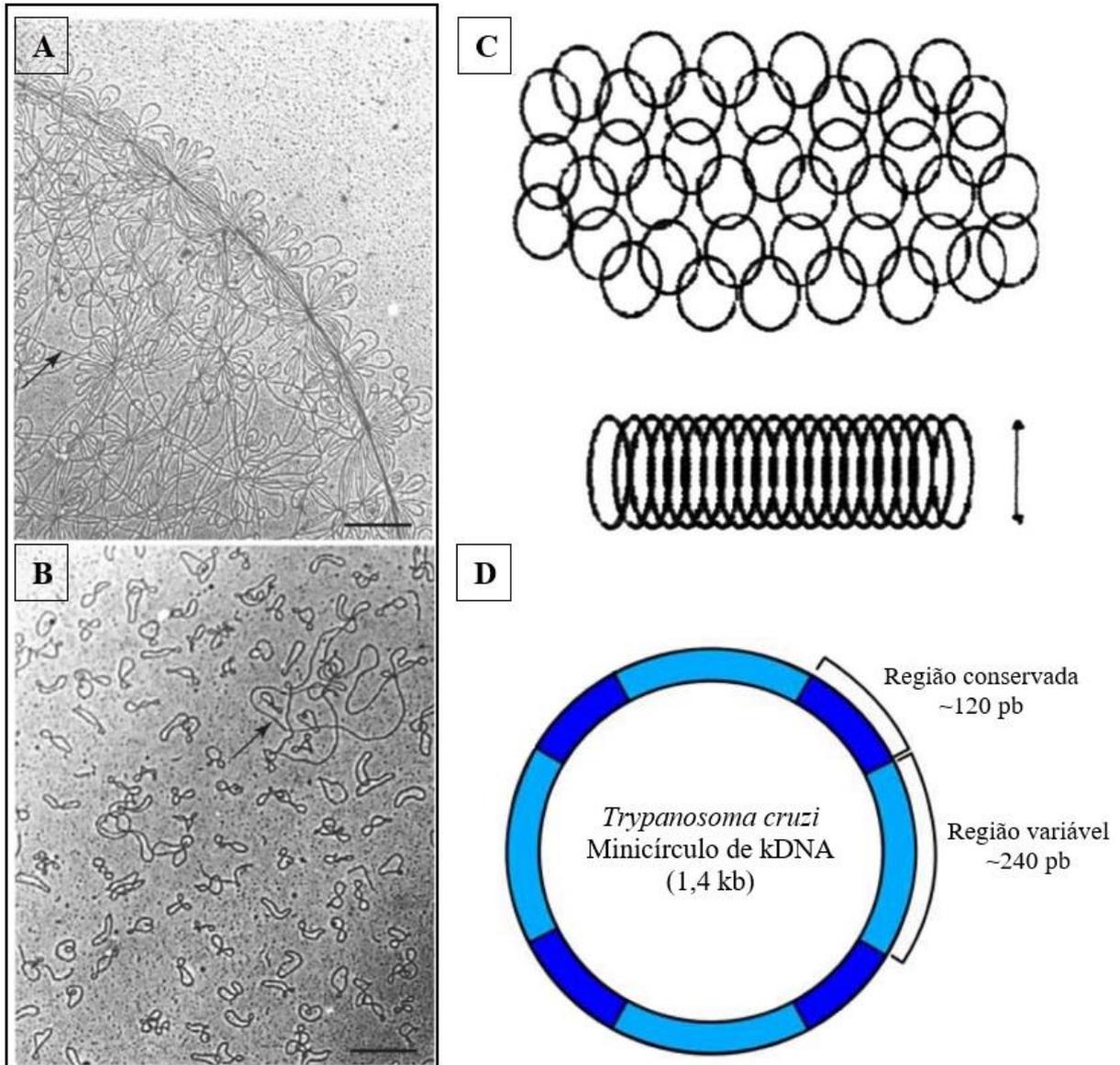
local específico para mediar a transferência de kDNA para o hospedeiro (HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011a). Sua principal função é codificar gRNAs, que modificam os transcritos do maxicírculo por extensa inserção ou deleção de uridina, em um processo conhecido como edição de RNA, que resultará na produção de RNAs mensageiro (RNAm) funcional (MADISON-ANTENUCCI; GRAMS; HAJDUK, 2002). As informações para esse processo são fornecidas por pequenas moléculas de RNA codificadas principalmente nos minicírculos. A heterogeneidade da sequência de milhares de minicírculos representa um enorme potencial para esse componente do kDNA gerar diversidade genética adicional (TEIXEIRA *et al.*, 2011a).



**Figura 7: Representação esquemática das formas de *Trypanosoma cruzi*.** O parasito transita durante o seu ciclo por diferentes formas, que são identificadas pela posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela emergência do flagelo. A) A forma amastigota possui estrutura arredondada exibindo um flagelo curto e imperceptível; sendo capaz de se replicar no interior de diferentes células de hospedeiros mamíferos. B) No estágio epimastigota, o cinetoplasto e a bolsa flagelar encontram-se em posição anterior ao núcleo. C) Já na forma tripomastigota, o parasito se caracteriza por apresentar uma estrutura alongada com o flagelo emergindo da bolsa flagelar, localizada próxima ao cinetoplasto, e se estendendo ao longo da borda externa de sua membrana. O cinetoplasto, por sua vez, está na extremidade posterior do parasito e, portanto, do núcleo. Adaptado de (TEIXEIRA, D. E. *et al.*, 2012).

A manutenção da integridade do kDNA parece ser essencial para a viabilidade de tripanossomatídeos em alguns estágios de seus ciclos de vida (DEY *et al.*, 2010; PASSOS-SILVA *et al.*, 2010; SCHNAUFER; DOMINGO; STUART, 2002). De fato, formas "discinetoplásticas" de *T. brucei* (estágios de desenvolvimento sem o cinetoplasto) são incapazes de completar seu ciclo normal de desenvolvimento no inseto vetor devido à sua incapacidade de realizar fosforilação oxidativa (SCHNAUFER; DOMINGO; STUART, 2002). Do mesmo modo, formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com compostos que atuam contra o kDNA apresentaram redução no crescimento, maior produção de espécies reativas de

oxigênio, ligeira diminuição no consumo de oxigênio, e redução do índice de infecção e liberação de formas tripomastigotas de células hospedeiras infectadas (GIRARD *et al.*, 2016; ZUMA *et al.*, 2015).



**Figura 8: DNA do cinetoplasto de tripanossomatídeos.** A) Rede de kDNA intacta de *Crithidia fasciculata*. Loops pequenos são minicírculos e fios mais longos (seta) são partes de maxicírculos. B) Rede de kDNA decatenada pela topoisomerase II mostrando minicírculos individuais e um único maxicírculo (seta). C) Diagramas mostrando a organização dos minicírculos. Acima, segmento de uma rede isolada mostrando minicírculos interligados entre si. Abaixo, seção através de um disco de cinetoplasto, *in vivo*, mostrando minicírculos esticados. D) Representação esquemática da estrutura do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*. Adaptado de (GUIMARO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2005; LUKEŠ *et al.*, 2002).

### 1.6.3 Transferência horizontal de kDNA para o genoma hospedeiro

Diversos estudos já evidenciaram a transferência horizontal de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma hospedeiro (SIMÕES-BARBOSA *et al.*,

1999, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 1991, 1994). A primeira evidência foi demonstrada por Teixeira *et al.* (1991) ao visualizarem inserção de DNA do parasito em cromossomos de macrófagos de camundongos infectados, confirmada por teste imunocitogenético e FISH. Em seguida, foi provado que tais integrações eram sequências de minicírculos de kDNA (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Além disso, estudos mostraram que macrófagos contendo kDNA integrado eram reconhecidos por anticorpos autoimunes (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999), e que o DNA proveniente do parasito estava associado a retrotransposons de sequências repetitivas longas do tipo L1 (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006).

Os achados *in vitro* foram posteriormente corroborados por trabalhos envolvendo humanos, camundongos e galinhas (GUIMARO *et al.*, 2014; HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA, A. R. L. *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2011b; WESLEY *et al.*, 2019). Assim, sugeriu-se que a integração de kDNA no genoma hospedeiro poderia contribuir para o surgimento das manifestações clínicas, uma vez que galinhas refratárias ao parasito, nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, retiveram minicírculos de kDNA no genoma e desenvolveram cardiomegalia similar à DC humana (GUIMARO *et al.*, 2014; TEIXEIRA, A. R. L. *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Ainda, o transplante de medula óssea em galinhas que tinham kDNA integrado em seus genomas inibiu a resposta autoimune ao coração (GUIMARO *et al.*, 2014).

Adicionalmente, um estudo recente com camundongos infectados com o parasito demonstrou que uma quantidade maior de animais teve integração de kDNA na fase aguda do que na fase crônica e que, curiosamente, a porcentagem total de animais kDNA positivos na fase crônica diminuiu para uma taxa semelhante à de indivíduos que desenvolvem a DC crônica sintomática. Assim, é possível que a transferência de kDNA do parasito para o genoma da célula-alvo seja um mecanismo adaptativo à invasão e sobrevivência nas células hospedeiras, bem como um indicador de que a integração em um ou mais tecidos possa favorecer o surgimento de manifestações clínicas (WESLEY *et al.*, 2019).

De interesse, os minicírculos de kDNA foram também localizados no genoma de humanos infectados naturalmente pelo *T. cruzi*, cuja integração ocorreu principalmente em regiões L1 de vários cromossomos. Além disso, o DNA mitocondrial do parasito parece ser transmitido verticalmente, uma vez que foi detectado nas células germinativas dos indivíduos infectados e em seus descendentes (HECHT *et al.*, 2010). A associação do kDNA a esses retroelementos autônomos permite a sua mobilização do sítio de integração original para outros locais do genoma. A esse respeito, em um evento rastreado de transferência lateral de kDNA, o fragmento de minicírculo integrado ao L1 foi posteriormente realocado para outro cromossomo (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006). Ademais, o kDNA e o DNA do hospedeiro

compartilham sequências ricas em adenina/citosina no local da integração, sugerindo que a integração dos minicírculos do *T. cruzi* pode ser mediada por microhomologias (HECHT *et al.*, 2010).

A inserção de kDNA no genoma do hospedeiro pode gerar ORFs quimeras, ou seja, ORFs que contêm uma região de DNA do hospedeiro ligada ao DNA do minicírculo de kDNA. Estas ORFs teriam o potencial de codificar proteínas quiméricas que podem ter importância na patogênese da DC. Algumas proteínas putativas traduzidas de ORFs quiméricas já foram descritas no genoma humano e de galinhas (HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011b). Além disso, a inserção de kDNA no genoma do hospedeiro também poderia ocasionar alterações funcionais em proteínas já existentes, devido à ruptura de genes. Já foram detectadas inserções em genes do receptor olfatório de humanos (HECHT *et al.*, 2010) e da distrofina de galinhas (TEIXEIRA *et al.*, 2011b).

## 2 JUSTIFICATIVA

A TGH é um processo de troca de material genético entre organismos não relacionados que ajuda a impulsionar a evolução genômica, além de desempenhar papel relevante em doenças graves. Diversos exemplos de TGH bidirecional entre o parasito e seu hospedeiro têm sido relatados nos últimos anos, fato relacionado ao aprimoramento de diferentes técnicas de identificação. Considerada uma tecnologia de ponta, o sistema CRISPR/dCas9 pode ser utilizado para complementar a comprovação de transferência gênica horizontal através da visualização direta de sequências específicas de DNA em células hospedeiras. Esse método de marcação de DNA possibilita rastrear o número de cópias, a localização e o movimento dos elementos genômicos. Além disso, a possibilidade do uso de CRISPR em células vivas permitiria acompanhamento em tempo real, bem como noção da organização espaço-temporal de sequências transferidas horizontalmente entre diferentes organismos.

Ademais, considerando que o modelo a ser utilizado é o de células infectadas com o *T. cruzi*, os dados produzidos contribuirão para uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro na DC, importante problema de saúde pública do Brasil. A transferência lateral de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma hospedeiro é um fenômeno que pode estar envolvido na biologia adaptativa do parasito à célula hospedeira, trazendo informações importantes sobre os aspectos iniciais da infecção, bem como na patogênese da DC. Conhecer tais fatores pode auxiliar no processo de elaboração de novas estratégias para impedir o avanço da doença.

Desta forma, os resultados deste projeto possibilitarão o uso de técnica inovadora para identificação de eventos de TGH entre parasitos e hospedeiros, cuja aplicabilidade poderá ser extrapolada para estudos de diferentes áreas, auxiliando na compreensão de eventos dessa natureza.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Demonstrar a transferência gênica lateral na relação parasito-hospedeiro por metodologia CRISPR/dCas9, utilizando como modelo células infectadas pelo *T. cruzi*.

#### Objetivos específicos

- Identificar a transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para a célula hospedeira;
- Quantificar a população de células que contém as integrações de kDNA no genoma ao longo de diferentes períodos;
- Determinar se a presença do parasito é necessária para a ocorrência das integrações;
- Avaliar se a transfecção pelo sistema CRISPR/dCas9 impacta a expressão de retroelementos LINE-1.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho dos RNAs guia

Um gRNA para a ORF2 de LINE-1, baseado no clone RP13-444K19 (HECHT *et al.*, 2010), foi selecionado utilizando a ferramenta L1Xplorer da base de dados L1base 2 (PENZKOFER *et al.*, 2017a). A fim de evitar ligações fora do alvo, foi escolhido aquele que apresentou menor quantidade de alvos no genoma humano. Além disso, a partir do clone ‘*Trypanosoma cruzi* Y kinetoplast minicircle sequence, clone M835’ GenBank: U07845.1, foi gerado um gRNA para as sequências conservadas de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, utilizando o programa EuPaGDT. Por fim, uma sequência não direcionada ao genoma humano (GAL4) foi selecionada para servir como controle negativo dos experimentos. A sequência, que tem alvo em genomas bacterianos, foi previamente utilizada por CHEN e colaboradores (2013).

Todas as sequências selecionadas deveriam possuir entre 40 e 60% de GC e não apresentar formação de estrutura secundária (*hairpin*). Os gRNAs foram sintetizados como oligos dupla fita (**Tabela 1**), onde 20 pbs eram correspondentes às respectivas sequências de interesse (em negrito) e 16 pbs, em ambas as extremidades, eram homólogos ao plasmídeo vetor (Addgene #41824).

**Tabela 1:** Sequência dos oligos dupla fita contendo os gRNAs.

Oligos duplex	Sequência 5' – 3'
gLINE1	CTTATTTTAACTTAAGAACCAAAAAAGAGCCCACATTAAGATATATAAAG CTTTATATATCTTAATGTGGGCTCTTTTTGGTTCTTAAGTAAAATAAG
gkDNA	CTTATTTTAACTTAAGGGGGAGGTGGGGTTTCGATTGCTTAAGATATATAAAG CTTTATATATCTTAAGCAATCGAACCCACCTCCCCCTTAAGTAAAATAAG
gGAL4	CTTATTTTAACTTAAGGAACGACTAGTTAGGCGTGTACTTAAGATATATAAAG CTTTATATATCTTAAGTACACGCCTAACTAGTCGTTCTTAAGTAAAATAAG

### 4.2 Plasmídeos e clonagem dos gRNAs

Os plasmídeos referentes ao sistema *SunTag*, pHRdSV40-NLS-dCas9-24xGCN4\_v4-NLS-P2A-BFP-dWPRE (Addgene #60910) e pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-dWPRE (Addgene #60907), e gRNA\_Cloning Vector (Addgene #41824) foram obtidos em Addgene, Cambridge, MA, EUA. O plasmídeo pHRdSV40-NLS-dCas9-24xGCN4\_v4-NLS-P2A-BFP-dWPRE codifica a enzima dCas9 fundida a 24 cópias de peptídeos GCN4. Ainda, o complexo possui um sinal de localizador nuclear (NLS – *Nuclear Localization Signal*), uma sequência de aminoácidos conservada que transporta ativamente proteínas exógenas para o núcleo (ZANTA;

BELGUISE-VALLADIER; BEHR, 1999). O plasmídeo pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-dWPRE codifica os fragmentos de anticorpos de cadeia única anti-GCN4 ligados a GFP. Finalmente, o plasmídeo vetor de gRNA foi clonado com cada um dos oligos mencionados anteriormente.

A extração e purificação dos mesmos foram feitas de acordo com o protocolo de midiprep do kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit Invitrogen™ (catálogo K210004). O plasmídeo gRNA\_Cloning Vector (Addgene #41824) foi linearizado usando a enzima *AflIII* e, em seguida, os oligos foram inseridos no vetor digerido na proporção molar 10:1 (oligo:vetor), utilizando o kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs), seguindo as orientações do fabricante.

### 4.3 Transformação bacteriana e PCR de colônia

Após a clonagem do oligo no plasmídeo, 2 uL da reação foram utilizados para transformação em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimicamente competentes. As bactérias foram permeabilizadas por choque térmico a 42°C por 45s, seguido de incubação no gelo por 2min. Em seguida, as células foram recuperadas em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C sob agitação por 1h. Finalmente, as bactérias foram plaqueadas em ágar LB contendo 50  $\mu$ g/ml de canamicina e incubadas a 37°C por 16h.

Visualizado o crescimento de colônias, foi realizada PCR para confirmar aquelas que eram positivas para a inserção do oligo. Com esse fim, cada colônia crescida foi adicionada diretamente em 10  $\mu$ L de água ultrapura juntamente com PCR Master Mix 2X (Promega) e 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, em um volume final de 25 uL. Para cada reação, foi utilizado um *primer* antisense universal (M13) que se anela no plasmídeo em uma região próxima ao sítio de clonagem, e um *primer* senso complementar ao oligo. Assim, é possível verificar se a sequência foi clonada no sítio e na orientação esperados. As condições utilizadas foram as seguintes: 95°C por 3min; 95°C por 45s, 45°C por 45s, 72°C por 45s, repetindo 35 vezes a partir do passo 2; 72°C por 5min. O produto gerado de 226 pb foi posteriormente visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

### 4.4 Cultura de células

Células de rim embrionário humano 293 (HEK-293) foram cultivadas em Dulbecco Meio Mínimo Essencial (DMEM), suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1%

de Penicilina/Streptomicina. A cultura foi acondicionada em pH 7.2, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e o repique das células, uma vez por semana. O acompanhamento da cultura foi realizado em microscópio óptico invertido.

#### **4.5 Cultura de *Trypanosoma cruzi***

Formas epimastigotas de *T. cruzi* da linhagem Y foram mantidas em meio LIT 10% de SFB, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, a 25°C. Os repiques foram realizados a cada 15 dias. Para obtenção das formas tripomastigotas, foi inoculado 1 ml da cultura de epimastigota em cultura de células HEK-293, previamente crescidas. Após 72 h de infecção, todo o sobrenadante foi retirado e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X, pH 7.4, duas vezes, para a retirada das formas epimastigotas presentes no sobrenadante. Após aproximadamente sete dias de infecção, foi obtida a forma tripomastigota.

#### **4.6 Infecção das células por *Trypanosoma cruzi***

A infecção das células foi realizada inoculando-se formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em cada poço contendo células HEK-293 previamente aderidas. As formas tripomastigotas foram contadas em câmara de Neubauer imediatamente antes da infecção, e foi inoculado o mesmo número de parasitos em relação ao número de células (proporção 1:1). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, seguindo a manutenção mencionada no item 4.4.

#### **4.7 Tratamento da cultura com benznidazol**

Inicialmente na concentração 100 mg, os comprimidos foram diluídos em 10 mL de PBS 1X. O benznidazol foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL e estocado a -20°C até o início dos experimentos. As células foram tratadas com 50 µg/mL no 5º dia pós-infecção (dpi), e mais uma vez a cada semana, totalizando quatro semanas.

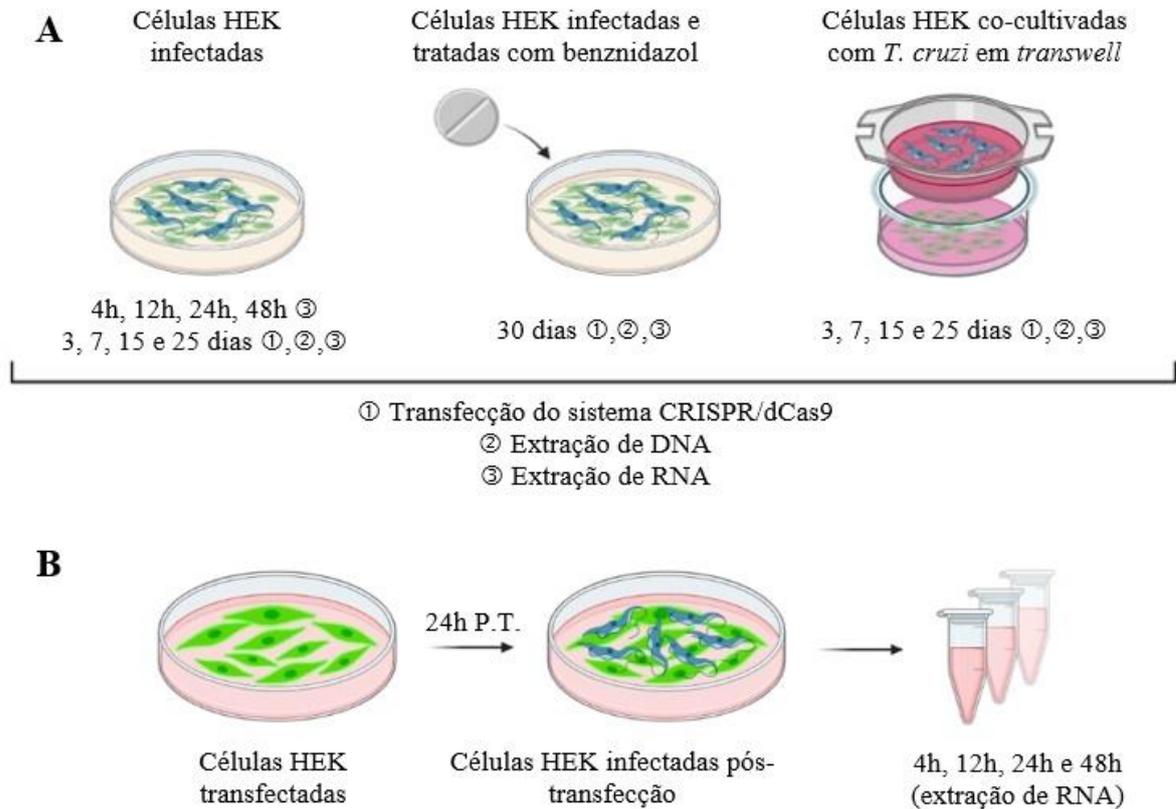
#### **4.8 Uso de sistemas *transwell***

Para avaliar a transferência de kDNA de *T. cruzi* através de seu secretoma, foram realizadas coculturas em sistema *transwell* de 6 poços. Para tanto, a cultura de *T. cruzi* foi cocultivada com células HEK-293. Assim,  $1 \times 10^5$  células foram semeadas no compartimento inferior da *transwell*. Após o semeio, a placa foi incubada por 24h em estufa para adesão celular. Em seguida, foram adicionadas duas vezes mais formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y ( $2 \times 10^5$ ) no compartimento superior das placas. Os parasitos foram renovados a cada 2 dias, até totalizar 15 dias de cocultivo. Após esse período, as células foram expandidas para garrafas T-75 e mantidas por mais 15 dias adicionais.

#### 4.9 Grupos experimentais

Para este trabalho, considerou-se 3 grupos experimentais (**Figura 9A**), sendo estes: células infectadas, células infectadas e tratadas com benznidazol, e células cocultivadas com *T. cruzi* em sistemas *transwell*. As células infectadas foram coletadas após 4h, 12h, 24h, 48h, 3, 7, 15 e 25 dpi por *T. cruzi*. Já as células infectadas e tratadas com benznidazol foram analisadas apenas no 30º dia pós-infecção. Finalmente, as células cocultivadas com *T. cruzi* em sistemas *transwell* foram coletadas 3, 7, 15 e 25 dias após a adição de *T. cruzi* no compartimento superior da *transwell*.

Ainda, para verificar se a transfecção pelo sistema CRISPR/dCas9 impede a expressão de LINE-1, células transfectadas foram infectadas 24h pós-transfecção (**Figura 9B**). As amostras foram coletadas 4h, 12h, 24h e 48h pós-infecção. Após cada tempo descrito, as amostras foram transfectadas e/ou armazenadas em 5 V de solução RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen™) até o momento da extração de DNA e RNA.



**Figura 9:** Esquema representando os grupos experimentais e os respectivos tempos de coleta. A: Células HEK293 infectadas com *T. cruzi*, infectadas e tratadas com benznidazol, e cocultivadas com o parasito em sistema transwell, foram coletadas e analisadas em diferentes períodos de tempo. As numerações indicam a finalidade de cada coleta. B: Células HEK293 foram infectadas em 24h pós-transfecção. Após diferentes tempos, as amostras foram coletadas para extração de RNA e posterior análise de expressão gênica de LINE-1.

#### 4.10 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método convencional com fenol-clorofórmio descrito por (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Inicialmente, a amostra foi centrifugada a 1500 x g por 10 minutos para total remoção da solução *RNAlater*<sup>TM</sup>. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 200 µL de PBS 1X e foi adicionado de tampão de extração (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, contendo 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.04% proteinase K, and 1% DTT) em quantidade suficiente para 1 mL e 100 µg/mL de proteinase K. A solução foi gentilmente homogeneizada e incubada *overnight* em banho maria a 37°C. No dia seguinte, foram realizadas duas extrações com solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e uma com solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Logo após, o DNA foi precipitado com 0,5 V de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 V de etanol 100%, a -20°C *overnight*. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. Após seco, o pellet foi ressuspenso em 100 uL de água Milli-Q. O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE)

com 3  $\mu$ L da amostra. Considerou-se a extração como adequada quando a razão 260/280 variou de 1,8 a 2,0. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.11 Análise qualitativa por PCR em tempo real

A análise qualitativa da presença de sequências de minicírculo de kDNA de *T. cruzi* nas amostras analisadas se deu a partir de amplificação utilizando os *primers* S36 e S67R. Os iniciadores se anelam nas regiões constantes dos minicírculos de kDNA e amplificam região conservada e variável dos mesmos (HECHT *et al.*, 2010). Para análise do nDNA, foram utilizados os *primers* TCZ 3 e 4. A região amplificada corresponde à DNA satélite, que representa aproximadamente 9% do DNA nuclear, e é um relevante marcador genético para diferenciar as espécies do gênero *Trypanosoma* e distinguir cepas e clones de *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 1999). As sequências dos primers e suas respectivas temperaturas de anelamento estão descritas na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Sequências de *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real para avaliar presença de minicírculo de kDNA e DNA nuclear de *Trypanosoma cruzi*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Alvo	Temperatura de anelamento (T.A.)
S36	GGTTCGATTGGGGTTGGTG	Minicírculo de kDNA	57 °C
S67R	GA(A/C)(G/C)CCCCTCCCAAACC	Minicírculo de kDNA	57 °C
TCZ 3	TGCACTCGGCTGATCGTTT	DNA nuclear	60 °C
TCZ 4	ATTCCTCCAAGCAGCGGATA	DNA nuclear	60 °C

Como molde para ambas as reações, foi usado 100 ng de DNA, 0,4  $\mu$ m de cada primer, 10  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20  $\mu$ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®) no termociclador QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific). A condição de amplificação da reação foi a seguinte: 50°C por 2'; 95°C por 10'; 95°C por 15'', T.A. por 60'', 72°C por 10'', repetindo por 40 vezes a partir da terceira etapa. Finalizados os ciclos de amplificação da qPCR, é formada a curva de dissociação ou curva de *melting*, utilizada para verificar a especificidade dos *primers*.

#### 4.12 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi feita utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen™), seguindo protocolo do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por meio do espectrofotômetro

NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific) e o RNA foi armazenado a -80°C para posterior aplicação. Para a síntese de cDNA, padronizou-se a quantidade de RNA a ser utilizada na reação de RT-PCR com base na amostra de menor concentração. O protocolo e as condições da reação foram realizados obedecendo as orientações do manual do kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™). A síntese do cDNA foi realizada em termociclador T100™ (Bio Rad) e, em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização de qPCR para avaliação de expressão gênica.

#### 4.13 Avaliação da expressão gênica de LINE-1

Para avaliar a expressão do gene LINE-1, foi realizada qPCR utilizando o gene constitutivo TBP como referência. O gene codifica a proteína de ligação ao TATA (TBP – *TATA-Binding Protein*), fator importante para a transcrição de diversos genes (RAVARANI *et al.*, 2016). Os *primers* utilizados para LINE-1 amplificam a região ORF2 do retroelemento. A relação das sequências utilizadas, bem como suas respectivas temperaturas de anelamento, está apresentada na **Tabela 3**. A análise de *Blastn* mostrou não haver reconhecimento cruzado entre as sequências dos *primers* selecionados para o hospedeiro e o parasito.

**Tabela 3:** Sequências de *primers* utilizados na reação de qPCR para avaliação da expressão gênica e respectivas temperaturas de anelamento (T.A.).

Gene		Sequência 5' – 3'	Alvo	Temperatura de anelamento (T.A.)
TBP	<i>Forward</i>	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	Gene TBP	50 °C
	<i>Reverse</i>	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG		
LINE-1	<i>Forward</i>	ACACCTATTCCAAAATTGACCAC	ORF2 de LINE-1	60 °C
	<i>Reverse</i>	TTCCTCTACACTGCTTTGA		

Para cada reação, usou-se 2 µL de cDNA, 0,5 µM de cada iniciador e 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®) no termociclador QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific). A condição de amplificação consistiu em: 50°C por 2'; 95°C por 10'; 95°C por 15'', T.A. por 30'' e 72°C por 10'', repetindo por 40 vezes a partir da terceira etapa.

O cálculo para normalização e quantificação relativa foi feito segundo o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os resultados da expressão dos genes foram representados em gráficos no formato  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.14 Transfecção das células e montagem das lâminas

Um dia antes da transfecção,  $4 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placa de 24 poços sobre lamínulas de 12 mm, para adesão celular. Os dois plasmídeos que formam o sistema *SunTag* juntamente com cada gRNA foram transfectados nas células utilizando o reagente Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 600 ng de DNA total, sendo 200 ng de cada um dos três plasmídeos. O volume dos reagentes obedeceu a proporção de 1 µg de DNA : 2 µL de reagente P3000 : 3 µL de Lipofectamine 3000.

Passadas 48h pós-transfecção, o meio de cultura contendo o reagente de transfecção foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X. Imediatamente após, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. A solução fixadora foi retirada e realizou-se, novamente, a lavagem com PBS 1X. Em seguida, as células foram coradas com DAPI 300 mM por 10 minutos. O corante foi removido e as células foram deixadas em PBS 1X.

Sobre uma lâmina de microscópio, foi adicionado 20 µL de meio de montagem ProLong™ Glass Antifade Mountant (Invitrogen™) para cada lamínula. Com auxílio de uma pinça, a lamínula foi retirada da placa de cultura e montada sobre a lâmina de forma que as células ficassem em contato com o meio de montagem. Seguindo as recomendações do fabricante, as lâminas repousaram no escuro por 24h para solidificação do meio de montagem, antes da captura das imagens.

#### 4.15 Análise por microscópio de fluorescência

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Olympus BX51. As imagens foram capturadas com 200 ms de exposição, nas objetivas de 40x e 100x com óleo de imersão. Com auxílio do *software* cellSens Dimension, foram fotografados de 5 a 6 campos aleatórios por amostra. As imagens foram examinadas pelo *software* ImageJ, onde contou-se 100 células por condição. Disto, contou-se o número de células transfectadas – ou seja, GFP-positivas – para calcular a taxa de transfecção. Dentre estas, calculou-se aquelas que apresentavam marcação intranuclear para as sequências (taxa de eficiência). Todas as imagens mostradas foram capturadas 48h pós-transfecção. Os gráficos foram plotados utilizando os valores absolutos das contagens.

#### 4.16 Análise estatística

Todos os dados relativos aos experimentos de expressão gênica de LINE-1 foram analisados utilizando-se o software SAS® (v9.4, Cary, North Carolina) em nível de significância de 95%. Inicialmente, os valores de LINE-1 foram submetidos à análise de normalidade (PROC UNIVARIATE) pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis considerando como fator fixo o TTO e Tempo. Para as análises com diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis, os dados foram submetidos ao teste de Wilcoxon 2 a 2 buscando avaliar entre quais comparações havia diferença significativa. Os resultados foram apresentados em termos de média e desvio padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Clonagem dos RNAs guia

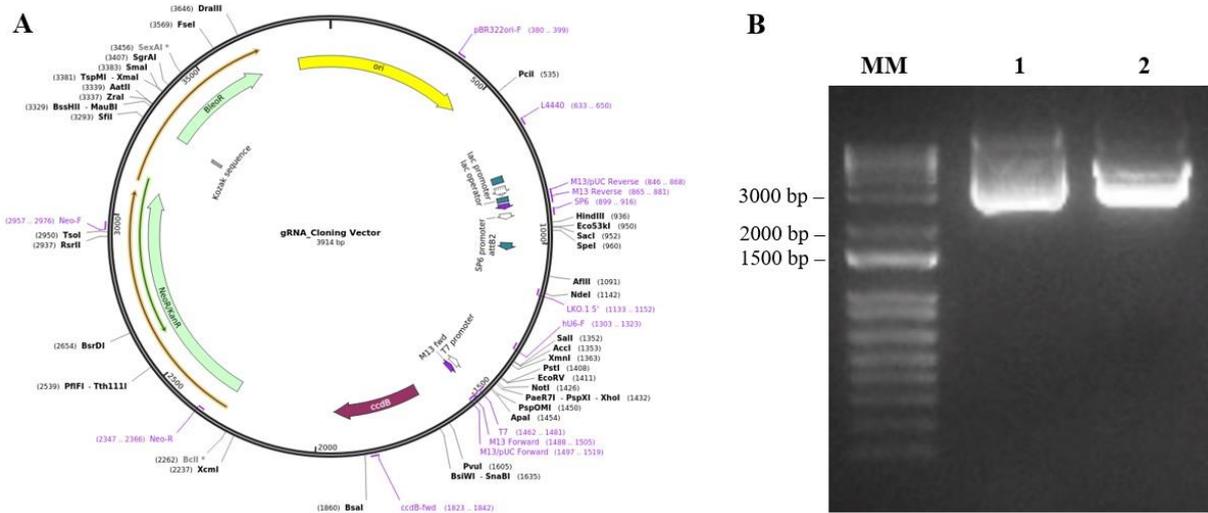
A seleção do gRNA para as sequências conservadas de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* foi feita com base no clone ‘*Trypanosoma cruzi Y kinetoplast minicircle sequence, clone M835, orf, complete cds*’, GenBank: U07845.1. A sequência FASTA do clone foi analisada pelo programa *Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool* (EuPaGDT), sendo imediatamente excluídas as sequências que possuíam conteúdo de GC inferior a 40% ou que apresentavam potenciais problemas durante a transcrição, sinalizados pelo programa. Os gRNAs remanescentes foram alinhados contra a sequência FASTA para filtrar apenas aqueles que se localizavam dentro de uma região conservada e, dentre esses, foi selecionado um gRNA.

Além disso, sabendo que os minicírculos de kDNA se integram preferencialmente em regiões ORF2 de retroelementos LINE-1 (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2006), e que estes representam 17% do genoma humano (BABUSHOK; KAZAZIAN, 2007), foi escolhido um gRNA direcionado para ORF2 de LINE-1 para servir como controle positivo dos experimentos. O clone previamente descrito RP13-444K19 (HECHT *et al.*, 2010) foi analisado pela ferramenta *LIXplorer* do banco de dados *Llbase 2* (PENZKOFER *et al.*, 2017b) para extração da sequência ORF2. Os gRNAs foram gerados pelo programa EuPaGDT e filtrados pelos mesmos critérios de exclusão citados anteriormente. Finalmente, foi selecionado aquele que apresentou menor quantidade de regiões alvo, segundo o site *Synthego* (<https://design.synthego.com/#/>).

Ademais, uma sequência não direcionada ao genoma humano (GAL4), que tem alvo em genomas bacterianos (CHEN *et al.*, 2013), foi escolhida como controle negativo. Todas as sequências selecionadas foram analisadas quanto à formação de estrutura secundária (*hairpin*) pelo programa *RNAfold Web Server* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Os gRNAs foram sintetizados como oligos dupla fita contendo 16 pb homólogos às regiões adjacentes ao sítio de restrição *AflIII*, totalizando 52 pb.

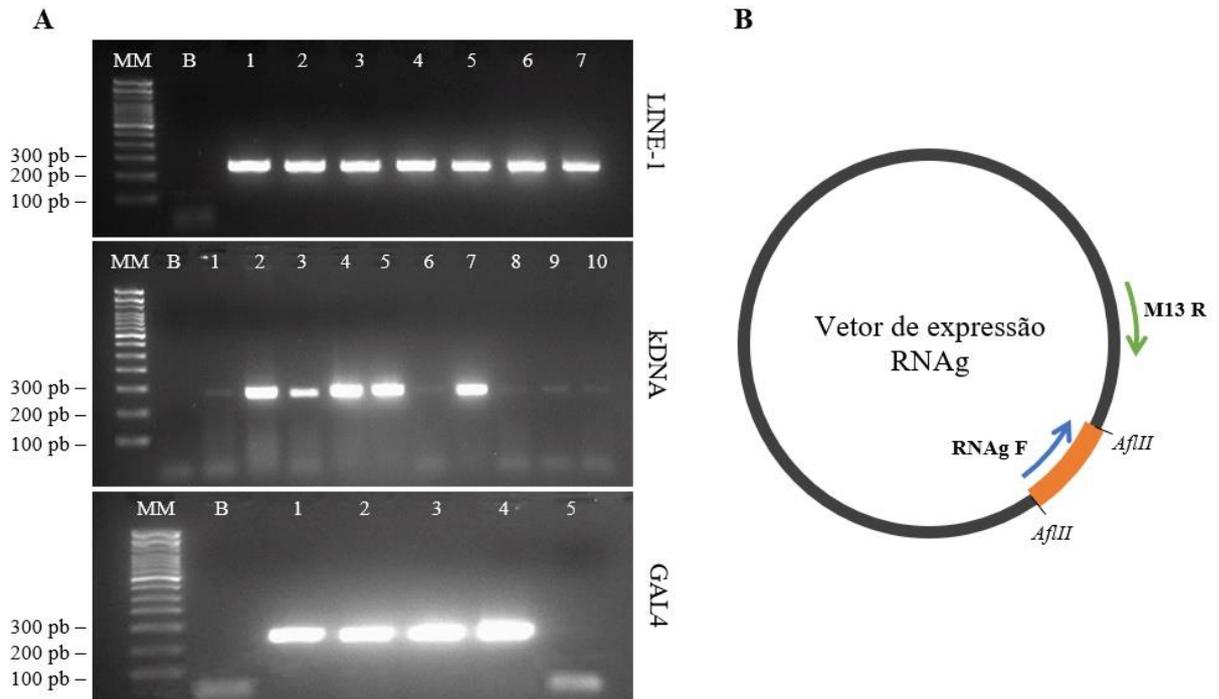
O plasmídeo utilizado para clonagem dos gRNAs foi o gRNA\_Cloning Vector (**Figura 10A**). O vetor foi previamente linearizado com a enzima de restrição *AflIII* (**Figura 10B**), e os oligos foram incorporados com auxílio do kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit

(New England BioLabs). O produto da clonagem foi transformado em bactérias competentes *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  e selecionado com 50  $\mu$ g/ml de canamicina.



**Figura 10: Preparo do vetor gRNA Cloning Vector para clonagem do gRNA.** A: Mapa do plasmídeo vetor utilizado para clonagem dos gRNAs. B: Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando resultado da linearização do vetor com a enzima *AflII*. O plasmídeo foi purificado com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen™). MM, marcador molecular 1 kb plus, 1, gRNA\_Cloning Vector não digerido, 2, gRNA\_Cloning Vector linearizado.

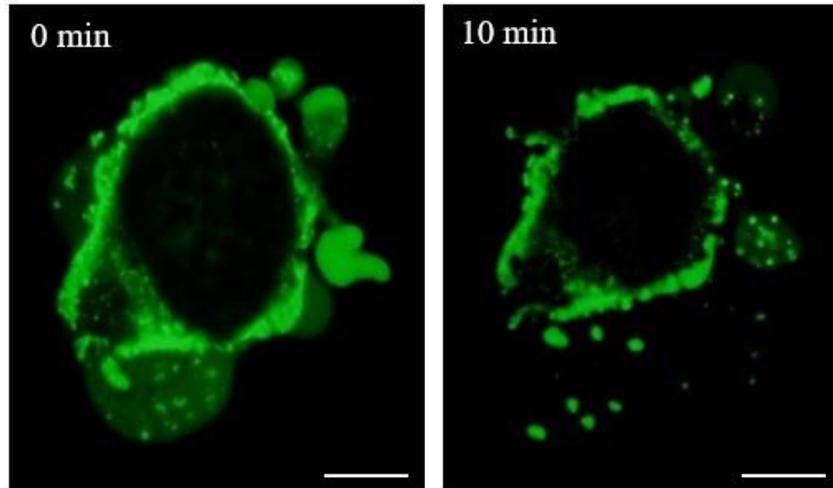
Após a transformação bacteriana, foi observado o crescimento de 7 colônias para o plasmídeo clonado com gLINE1. Para os gRNAs kDNA e GAL4, foram observados 10 e 5 colônias, respectivamente. Em seguida, foi feita uma PCR a partir de cada colônia crescida para verificar a presença do inserto. Para a reação, foi usado um *primer* universal M13 que se anela a estrutura do plasmídeo, próximo ao sítio de clonagem, e um *primer* reverso complementar específico para cada sequência inserida (**Figura 11B**). Desta forma, é possível verificar se as sequências foram clonadas no sítio esperado e na orientação correta. O produto de PCR gerado possui 226 pb e foi visualizado por eletroforese em gel de agarose. A **Figura 11** mostra que todas as colônias clonadas com gLINE1 apresentavam o inserto na orientação correta. Da mesma forma, 5 e 4 clones foram positivos para as sequências gkDNA e gGAL4, respectivamente.



**Figura 11: Confirmação da clonagem dos RNAs guia por PCR.** A: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os produtos de PCR a partir das colônias crescidas após transformação bacteriana. A presença de banda no tamanho de 226 pb é indicativo de clonagem no sítio e orientação corretos. B: Representação esquemática mostrando mapa do plasmídeo vetor. Um *primer* senso (gRNA F) é complementar a sequência inserida (laranja) e um *primer* antisense (M13 R) se anela a estrutura do plasmídeo, próximo ao sítio de clonagem (*AflII*). MM, Marcador molecular 100 bp; B, branco; Números de 1 a 10, colônias testadas para a presença do inserto.

## 5.2 Validação do sistema CRISPR/dCas9

Os três plasmídeos necessários para a formação do sistema *SunTag* foram transfectados, simultaneamente, em células HEK-293 por método de lipofecção. De fato, durante a etapa de validação do sistema, observamos diversos agregados fluorescentes ao redor do núcleo celular, sugestivos de complexos ribonucleoproteicos (RNP) formados pelos componentes do sistema CRISPR/dCas9. É possível observar pequenos agrupamentos que, com o passar do tempo, se acumulam ao redor do núcleo (**Figura 12**).



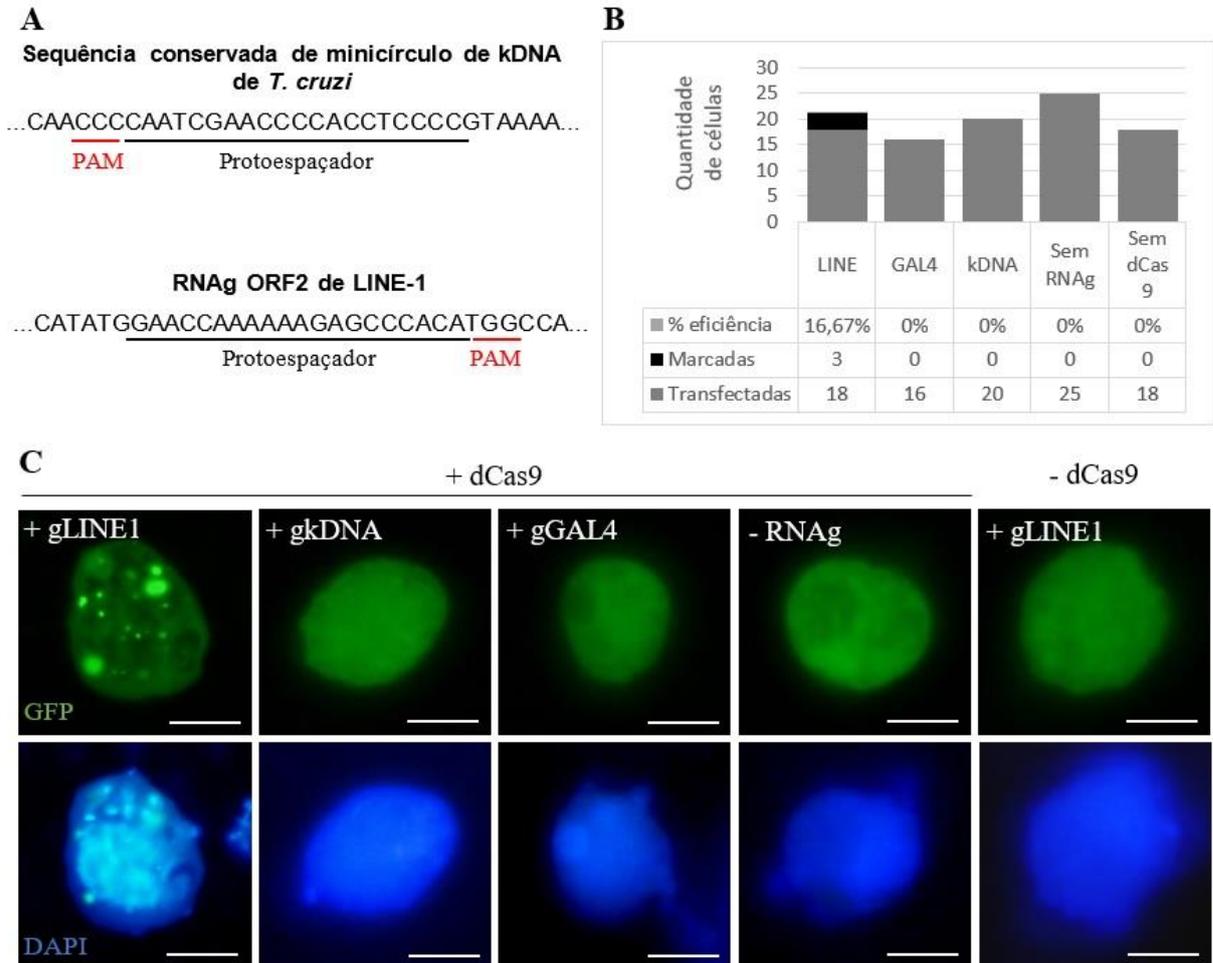
**Figura 12: Formação de complexos RNP com dCas9/gRNA ao redor do núcleo celular.** Imagens capturadas de vídeo feito 24h pós-transfecção. À esquerda (0 min), é possível observar pequenos pontilhados e agrupamentos sendo formados ao redor do núcleo. Há presença de fluorescência de GFP difusa. À direita, 10 min após a primeira observação, percebe-se a formação de complexos e um acúmulo destes na periferia externa do núcleo. O vídeo gravado com tempo de exposição de 200 ms, a 0, 5 e 10 mins após o início da observação. As fotos são representativas de cada corte de filmagem. Barras de referência, 10  $\mu$ M.

Inicialmente, o sistema CRISPR/dCas9 foi testado em células HEK-293 não infectadas, a fim de verificar o bom funcionamento e capacidade de marcação. Começamos marcando as células no sítio ORF2 de LINE-1, região encontrada em 17% do genoma humano (LANDER *et al.*, 2001). Seguindo um clone previamente descrito (HECHT *et al.*, 2010), criamos um gRNA (gLINE1) contendo uma sequência de direcionamento para essa região de 20 nucleotídeos (nt) (**Figura 13A**). Em 48h pós-transfecção, 16,67% (3/18) das células transfectadas com gLINE1 apresentaram pontos muito brilhantes no núcleo (**Figura 13B-C**).

Em seguida, testamos as células não infectadas para marcação de kDNA de *T. cruzi*, buscando verificar se haveria ligação inespecífica. Para isso, utilizamos gRNA voltado para a sequência conservada de minicírculo de kDNA do parasito (gkDNA) (**Figura 13A**), região geralmente envolvida nos eventos de TGH de *T. cruzi* para o hospedeiro (HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011a). Ao observarmos as células no microscópio de fluorescência, verificamos que a sequência gkDNA não apresentou nenhuma marcação no núcleo (0/16), exibindo uma fluorescência nuclear de GFP difusa (**Figura 13B-C**).

Além disso, visando verificar quaisquer outras marcações fora do alvo (*off targets*), diversos controles negativos foram incluídos. Para tanto, as células controle foram transfectadas em três condições diferentes: I) com um gRNA que não apresenta alvo em genoma humano (gGAL4), II) sem gRNA, e III) sem dCas9 com gLINE1. O objetivo dessas duas últimas condições era demonstrar que a ausência de um dos componentes do sistema CRISPR, seja a dCas9 ou o gRNA, impede a formação de pontos fluorescentes no núcleo. Digno de nota, não

houve absolutamente nenhum foco inespecífico nas amostras de controle negativo transfectadas sem o gRNA, bem como naquelas onde a dCas9 foi omitida ou o gRNA controle (gGAL4) foi usado (**Figura 13B-C**).



**Figura 13: Validação do sistema dCas9-SunTag em células HEK-293 não infectadas.** A: Construção de gRNAs para marcação de sequência em região ORF2 de LINE-1, gLINE1 (acima), e para região conservada de minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, gkDNA (abaixo). O protoespaçador consiste em uma sequência de 20 nt utilizada para guiar a dCas9 para uma região alvo desejada. O sítio PAM é uma sequência NGG, sendo N qualquer nucleotídeo, necessária para o reconhecimento e ligação da Cas9 à fita de DNA. B: Gráfico apresentando quantidade de células transfectadas (n=100) e marcadas. A taxa de eficiência representa a proporção de células marcadas em relação às transfectadas. C: Imagens das marcações em células HEK-293 com diferentes gRNAs na presença (+ dCas9) ou não (- dCas9) da dCas9. As imagens foram adquiridas com 200 ms de tempo de exposição, na objetiva 100X com óleo de imersão, 48h pós-transfecção. Na fileira de cima, marcação por GFP; embaixo, marcação com DAPI. Barras de referência, 10  $\mu$ M.

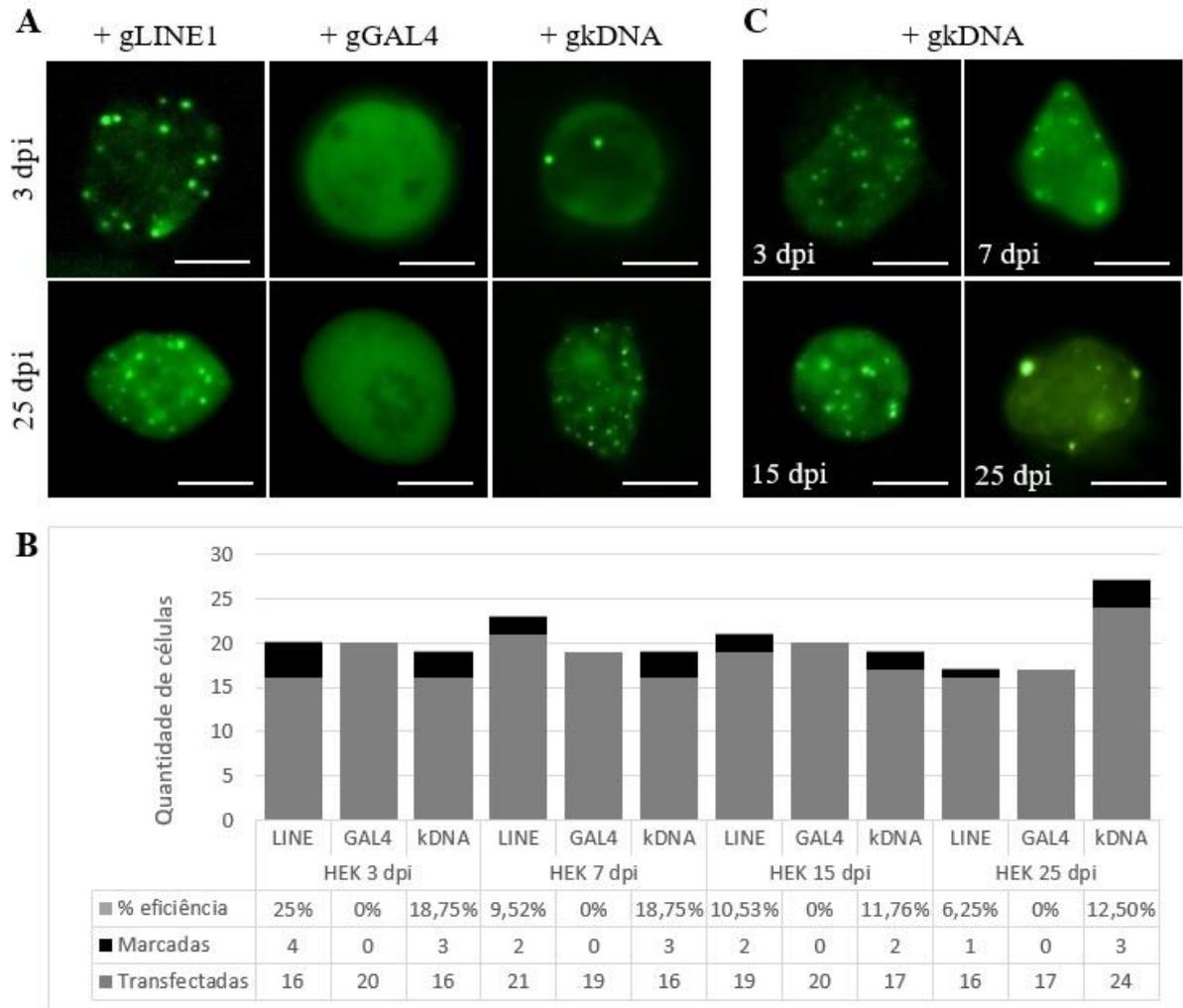
### 5.3 Marcação de sequência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma hospedeiro por CRISPR/dCas9

Para testar se o sistema CRISPR/dCas9 era capaz de identificar sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma hospedeiro, células HEK-293

infectadas pelo parasito foram transfectadas com gkDNA após 4 diferentes períodos pós-infecção: 3, 7, 15 e 25 dias. Vale ressaltar que, em todos os grupos experimentais e suas respectivas condições, o controle positivo (gLINE1) e o controle negativo (gGAL4) foram igualmente incluídos para validar os achados ao longo do tempo de infecção.

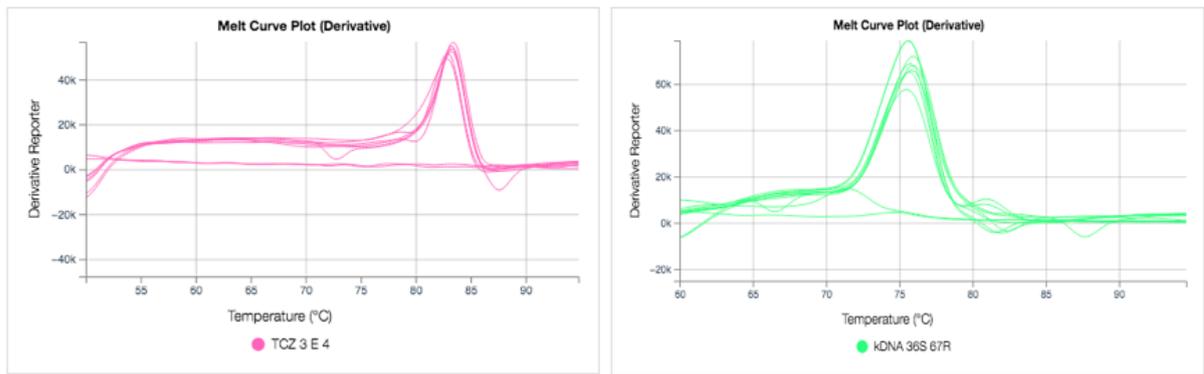
No 3º dia pós-infecção (dpi), observamos pontos fluorescentes no núcleo de 18,75% (3/16) das células transfectadas com gkDNA, indicando marcação da sequência de kDNA de *T. cruzi* no genoma celular (**Figura 14A**). Ao analisarmos a transfecção com gLINE1, verificamos que 25% (4/16) das células transfectadas apresentaram diversos focos fluorescentes no núcleo. Em contraste, gGAL4 resultou em ausência de marcação intranuclear. Este mesmo padrão se repetiu em todos os tempos analisados ao longo da infecção (**Figura 14B**). Quando examinamos o mesmo grupo em 25 dpi, observamos uma leve diminuição da taxa de eficiência da transfecção em relação ao primeiro tempo. No caso, 6,25% (1/16) das células apresentaram marcação para gLINE1 e 12,5% (3/24) formaram pontos fluorescentes quando transfectadas com gkDNA. Nenhuma célula exibiu marcação para gGAL4 (**Figura 14A-B**). De interesse, a análise estatística não identificou diferença significativa em cada grupo ao longo do tempo, nem entre os grupos.

Percebe-se que o sistema CRISPR/dCas9 foi capaz de identificar várias cópias da sequência de kDNA de *T. cruzi*, dentro de uma mesma célula, quando transfectado juntamente com gkDNA. O alvo foi detectado em todos os períodos pós-infecção analisados, resultando na formação de pontos fluorescentes no núcleo de células transfectadas (**Figura 14C**). Além disso, é possível observar uma variação na quantidade de sequências marcadas ao longo do tempo de infecção; fato que será discutido adiante.



**Figura 14: Identificação de sequências de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma celular após diferentes tempos pós-infecção.** A: Imagens das transfecções de células HEK-293 infectadas com *T. cruzi*, utilizando diferentes gRNAs. Nas fotos, estão mostradas as análises em 3 dpi e 25 dpi. É possível perceber marcação das células com gLINE1 e gkDNA. Células transfectadas com gGAL4 não apresentaram formação de focos fluorescentes. B: Gráfico apresentando quantidade de células transfectadas (n=100) e marcadas ao longo dos diferentes períodos pós-infecção analisados. A taxa de eficiência representa a proporção de células marcadas em relação às transfectadas. C: Imagens de células HEK-293 infectadas com *T. cruzi* e transfectadas com gkDNA. As fotos mostram formação de focos fluorescentes em todos os tempos examinados. Todas as imagens do painel foram adquiridas 48h pós-transfecção, com tempo de exposição a 200 ms, na objetiva 100X com óleo de imersão. Barras de referência, 10  $\mu$ M.

Os achados obtidos por transfecção e microscopia de fluorescência foram confirmados por ensaios de PCR em tempo real. Como método complementar às transfecções com gkDNA, as amostras foram verificadas qualitativamente para presença de DNA nuclear do parasito (*primers* TCZ 3 e 4) e minicírculo de kDNA de *T. cruzi* (*primers* S36 e S67R). É importante ressaltar que todas as amostras mostraram amplificação para os alvos testados (**Figura 15**).

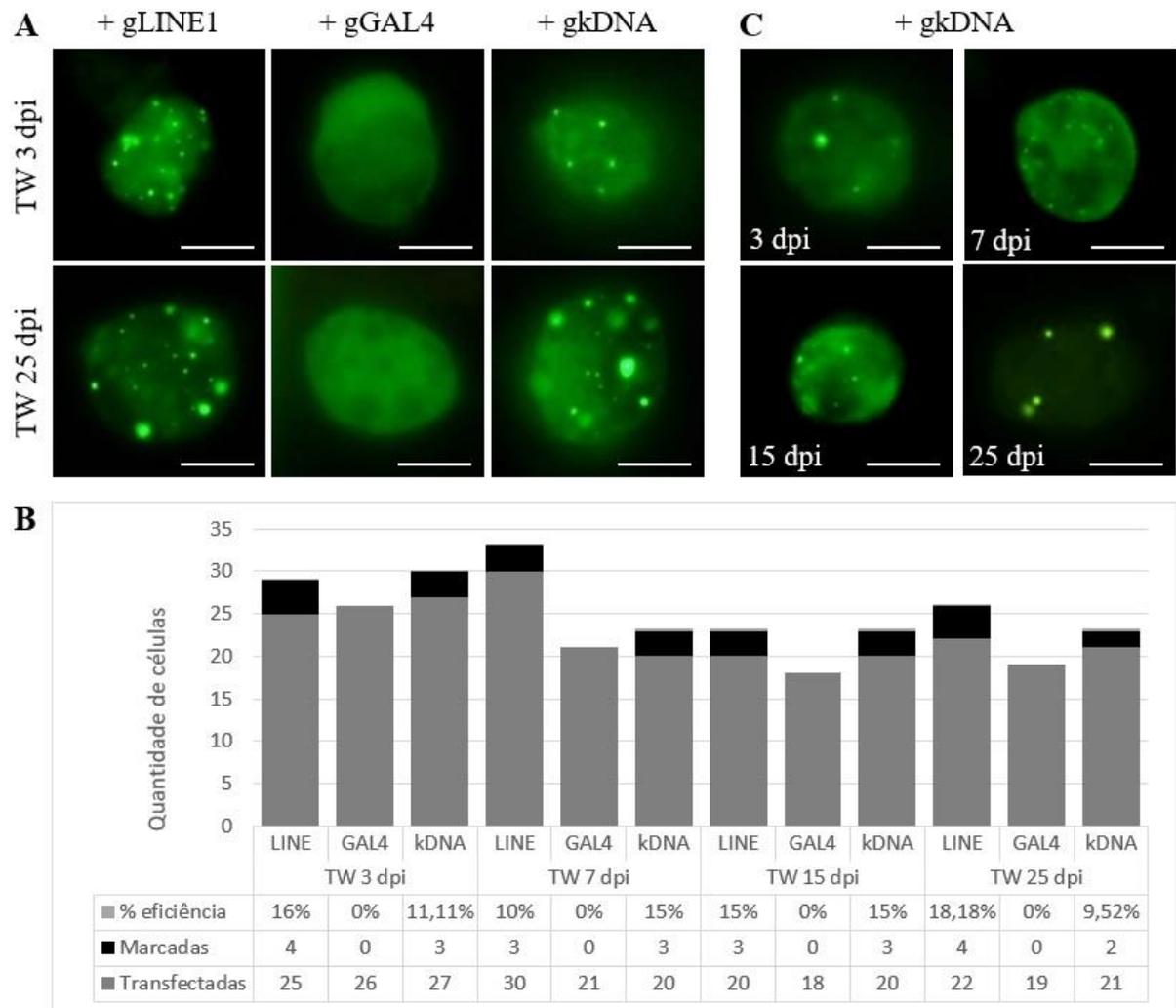


**Figura 15:** Curva de *melting* das amostras de células HEK-293 infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Células HEK-293 infectadas com *T. cruzi* apresentaram amplificação para os *primers* de nDNA (TCZ 3 e 4) e kDNA (S36 e S67R) do parasito. As amostras de DNA foram testadas por qPCR após 3, 7, 15 e 25 dpi.

#### 5.4 A transferência de minicírculo de kDNA para o genoma hospedeiro ocorre independentemente da presença do parasito

Buscando avaliar se a presença do parasito é necessária para a transferência de minicírculos de kDNA para o genoma hospedeiro, cocultivamos células HEK-293 juntamente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* em sistemas *transwell*. Após 3 dias da adição do parasito no compartimento superior da placa (TW 3 dpi), observamos que, 11,11% (3/27) das células transfectadas com gkDNA apresentaram marcação para as sequências alvo (**Figura 16A**). Tal achado sugere que as sequências de kDNA são transferidas via secretoma liberado pelo parasito. Analisando a transfecção com gLINE1, verificamos a presença de diversos focos fluorescentes no núcleo de 16% (4/25) das células transfectadas. Em contraste, gGAL4 não apresentou nenhuma marcação intranuclear. O mesmo padrão foi observado em 7, 15 e 25 dpi (**Figura 16A-B**).

Novamente, o sistema CRISPR/dCas9 revelou cópias de sequências de kDNA do parasito em todos os períodos analisados (**Figura 16C**). Células transfectadas com gkDNA apresentaram taxa de eficiência de 15% (3/20) para as análises de 7 e 15 dpi, e 9,52% (2/21) quando examinadas no 25º dia após a adição do parasito no compartimento superior do sistema *transwell* (**Figura 16B-C**). Neste grupo, considerando as transfecções de todos os gRNAs e seus respectivos tempos, o sistema apresentou taxa de eficiência média de 22,4% (**Figura 16C**). Não foi observada diferença significativa em cada grupo ao longo do tempo, nem entre os grupos.

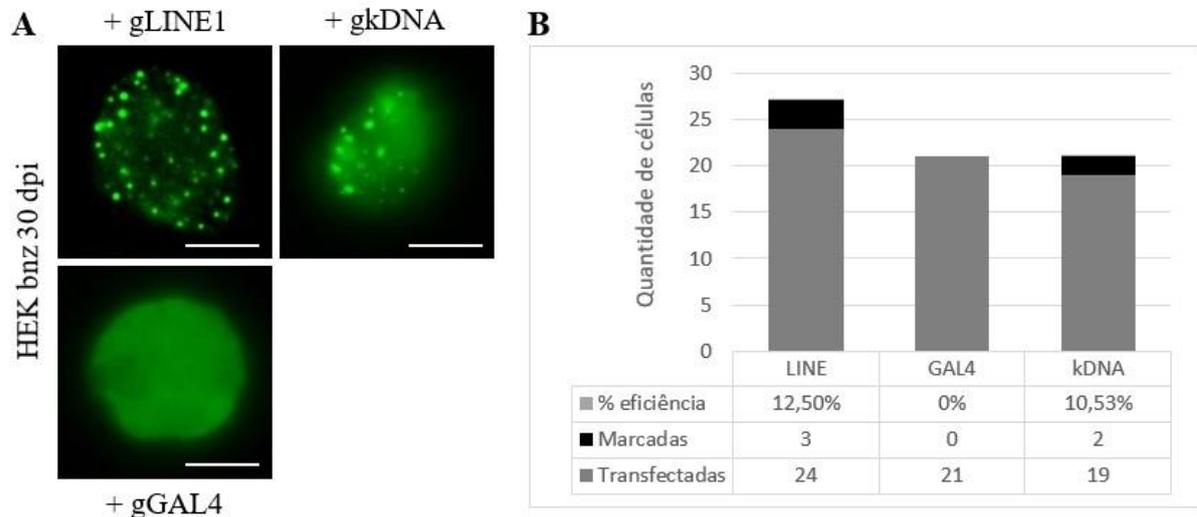


**Figura 16: Sequências de kDNA de *Trypanosoma cruzi* são transferidas para o genoma celular na ausência do parasito.** A: Fotos tiradas das marcações em células HEK-293 cocultivadas com *T. cruzi* em sistema *transwell*, utilizando diferentes gRNAs. Nas fotos, estão mostradas as análises em 3 dpi e 25 dpi. É possível perceber marcação das células com gLINE1 e gkDNA. Células transfectadas com gGAL4 não apresentaram formação de focos fluorescentes. B: Gráfico representado a quantidade de células transfectadas (n=100) e marcadas ao longo dos diferentes períodos analisados. A taxa de eficiência representa a proporção de células marcadas em relação às transfectadas. C: Imagens de células HEK-293 cocultivadas com *T. cruzi* e transfectadas com gkDNA. As fotos mostram formação de focos fluorescentes em todos os tempos examinados. Todas as imagens do painel foram adquiridas 48h pós-transfecção, com tempo de exposição a 200 ms, na objetiva 100X com óleo de imersão. Barras de referência, 10  $\mu$ M.

Em outro grupo experimental, células previamente infectadas com o parasito foram tratadas com benznidazol a partir do 5º dia pós-infecção. Assim como no outro grupo, excluimos a presença do parasito na avaliação da transferência de kDNA para o genoma hospedeiro. Ao contrário dos demais grupos apresentados, as amostras pertencentes a este foram analisadas apenas no 30º dia após o início da infecção.

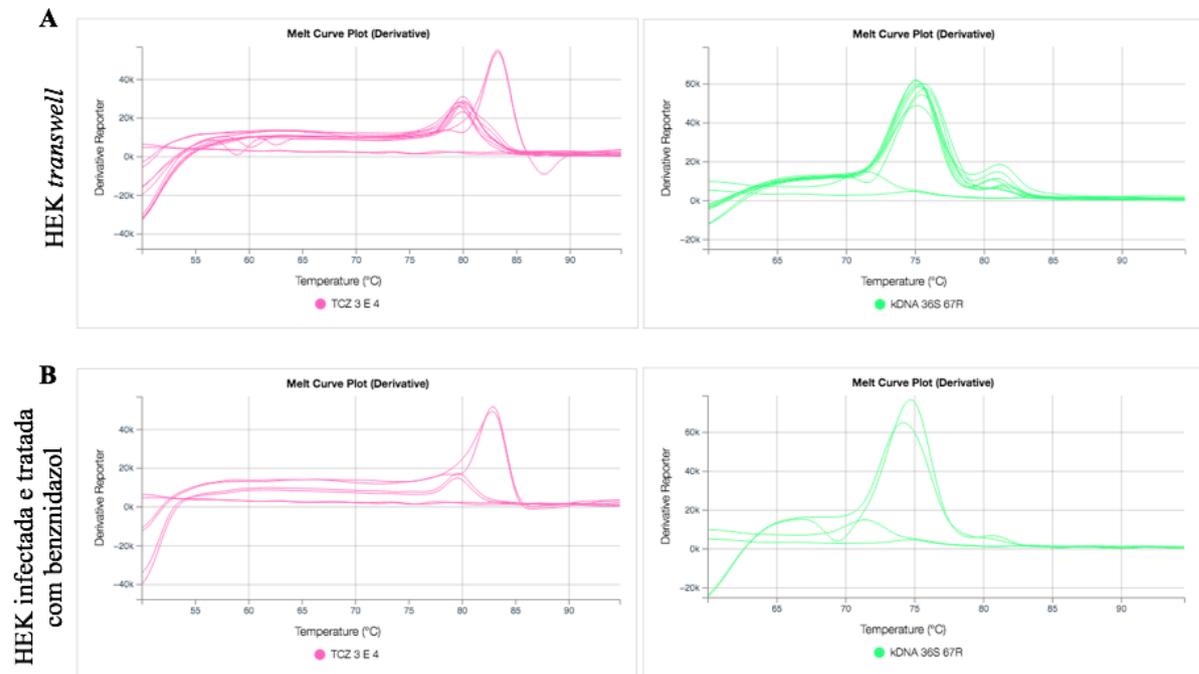
Seguindo os mesmos achados dos grupos anteriores, células transfectadas com gLINE1 obtiveram 12,5% (3/24) de eficiência de marcação. Da mesma forma, aquelas que foram marcadas com gGAL4 não apresentaram pontos fluorescentes no núcleo (**Figura 17A-B**).

Quando transfectadas com gkDNA, 10,53% (2/19) das células foram positivas para a marcação do alvo. O achado revela que, mesmo após a eliminação do parasito, as sequências de kDNA continuam presentes no genoma hospedeiro (**Figura 17A-B**).



**Figura 17: Transferência de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma hospedeiro ocorre mesmo após tratamento.** A: Imagens das marcações em células HEK-293 tratadas com benznidazol após infecção por *T. cruzi*, utilizando diferentes gRNAs. Nas fotos, a análise realizada no 30º dia após o início da infecção. É possível perceber marcação das células com gLINE1 e gkDNA. Células transfectadas com gGAL4 não apresentaram formação de focos fluorescentes. B: Gráfico apresentando quantidade de células transfectadas (n=100) e marcadas no tempo analisado. A taxa de eficiência representa a proporção de células marcadas em relação às transfectadas. Todas as imagens do painel foram adquiridas 48h pós-transfecção, com tempo de exposição a 200 ms, na objetiva 100X com óleo de imersão. Barras de referência, 10  $\mu$ M.

Vale destacar que todas as amostras de ambos os grupos, cocultivadas em sistema *transwell* e tratadas com benznidazol, foram testadas para amplificação de DNA nuclear do parasito e minicírculo de kDNA de *T. cruzi* por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que as amostras eram negativas para nDNA do parasito e positivas para kDNA (**Figura 18**). Nota-se que a análise da amplificação dos *primers* TCZ 3 e 4 revelou pequeno pico na curva de *melting* para as amostras testadas. No entanto, tais amostras apresentaram amplificação inespecífica com temperatura de *melting* a 79 °C, enquanto uma amostra infectada (pico maior a direita) amplificou a 82 °C. Portanto, devido a essa diferença, as amostras foram consideradas negativas (**Figura 18A-B**).

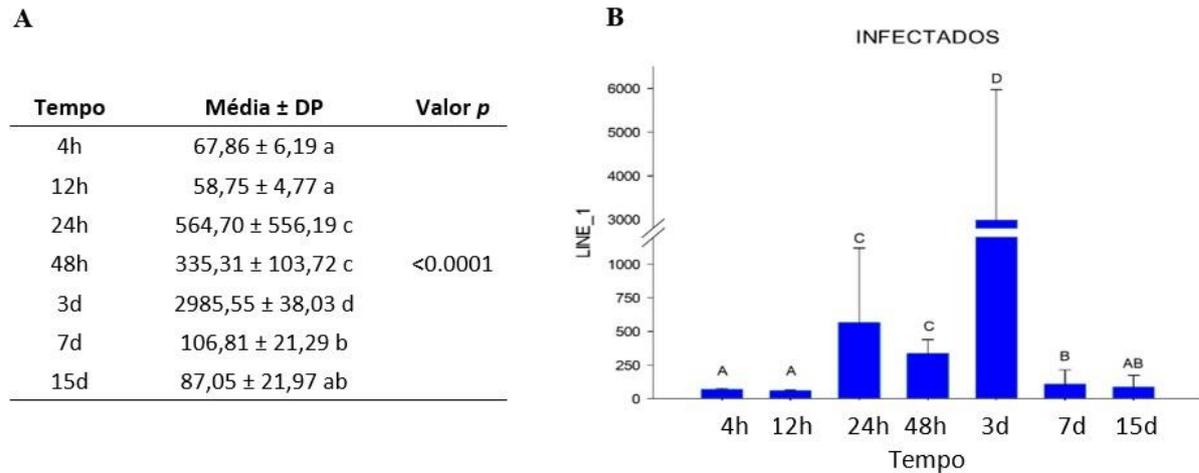


**Figura 18: Curva de *melting* das amostras de células HEK-293 cocultivadas com o parasito e das tratadas com benznidazol.** Curva de *melting* dos *primers* para nDNA (TCZ 3 e 4), e kDNA (S36 e S67R) de *T. cruzi*, respectivamente. Células HEK-293 apresentaram amplificação para kDNA de *Trypanosoma cruzi*, na ausência do parasito. A: Amostras representantes do grupo de células que foram cocultivadas com o parasito em sistema *transwell*. As amostras de DNA foram amplificadas por qPCR após 3, 7, 15 e 25 dias após a adição do parasito no compartimento superior da *transwell*. O pequeno pico na curva de *melting* dos *primers* TCZ 3 e 4 representa amplificação inespecífica do alvo, pois a temperatura de *melting* está 3 °C abaixo da amostra infectada (positiva). B: Amostras representantes do grupo de células que foram infectadas e tratadas com benznidazol. A amostra foi analisada apenas no 30º dia após o início da infecção. Novamente, as amostras que amplificaram em temperatura com 3 °C de diferença do controle foram consideradas negativas, pelo mesmo motivo mencionado anteriormente.

### 5.5 O sistema CRISPR/dCas9 bloqueia a expressão de retroelementos LINE-1

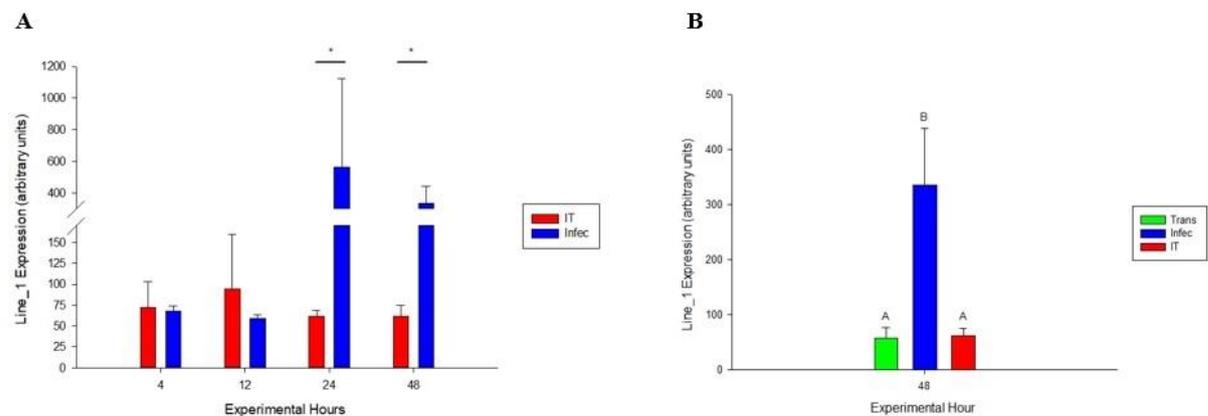
Diversos estudos já demonstraram que a integração de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* ocorre, na maioria dos casos, em regiões de retroelementos LINE-1 do genoma hospedeiro (HECHT *et al.*, 2010; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999, 2006; WESLEY *et al.*, 2019). Sabendo disso, avaliamos se a infecção pelo parasito modula a expressão desses retrotransposons, uma vez que este fato poderia favorecer a integração e posterior mobilização das sequências de minicírculo de kDNA.

A infecção das células pelo parasito gerou um aumento na expressão de retroelementos LINE-1 logo após o primeiro contato (4hpi  $67,86 \pm 6,19$ ) (**Figura 19A**). Após 24h (24hpi  $564,70 \pm 556,19$ ) e 3 dias pós-infecção (3d  $2985,55 \pm 38,03$ ), os níveis de RNAm de LINE-1 aumentaram consideravelmente em relação ao demais períodos (**Figura 19B**).



**Figura 19: Infecção por *Trypanosoma cruzi* modula a expressão de retroelementos LINE-1.** A: Tabela apresentando média, desvio padrão (DP) e valor de  $p$  dos diferentes tempos analisados no grupo infectado. B: Gráfico representando média e desvio padrão dos diferentes tempos analisados no grupo infectado. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

Para avaliar se a transfecção do sistema CRISPR/dCas9 influencia na expressão de retroelementos LINE-1, células transfectadas com gLINE1 foram infectadas 24h pós-transfecção (IT). As células foram então analisadas em diferentes períodos pós-infecção. Em 24h pós-infecção, o grupo infectado pós-transfecção (24h IT  $61,3 \pm 7,55$ ) apresentou nível de expressão de LINE-1 inferior ao grupo infectado (24h Infec  $564,7 \pm 556,2$ ), sugerindo que a ligação do sistema CRISPR/dCas9 à sequência alvo impede a transcrição gênica (**Figura 20A**). Da mesma maneira, passadas 48h da infecção, o grupo infectado (48h Infec  $335,31 \pm 103,7$ ) apresentou nível aumentado de RNAm para LINE-1 quando comparado ao grupo infectado pós-transfecção (48h IT  $61,43 \pm 13,3$ ) e o controle apenas transfectado (48h Trans  $57,17 \pm 19,1$ ) (**Figura 20B**).



**Figura 20: Ligação do sistema CRISPR/dCas9 impacta a transcrição gênica.** Gráficos apresentando média e desvio padrão dos diferentes tempos analisados no grupo infectado (Infec, barra azul), infectado pós-transfecção (IT, barra vermelha) e apenas transfectado (Trans, barra verde). A: Amostras do grupo Infec e Trans foram comparadas em relação ao mesmo período de tempo (4, 12, 24 e 48h). B: Amostras do grupo Infec, IT e Trans foram comparadas em 48h pós-infecção. Letras diferentes representam amostras estatisticamente diferentes.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Validação de sistema CRISPR/dCas9 para identificação de transferência gênica lateral

Os genes adquiridos lateralmente podem fornecer aos organismos receptores novas funções que impactam sua biologia e trajetória evolutiva. Como parasitos são nutricionalmente dependentes de seus organismos hospedeiros, tendo geralmente uma associação física íntima e de longo prazo, isso fornece amplas oportunidades para a troca de material genético entre eles e seus hospedeiros (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY, 2013). Esses eventos derivam em um processo de coevolução que, por sua vez, representa uma extrema especialização parasitária (AGEITOS; VIÑAS; VILLA, 2019).

A esse respeito, nosso trabalho explorou a aplicação do sistema CRISPR/dCas9 no estudo de TGH entre parasitos e hospedeiros, utilizando a infecção por *T. cruzi* como modelo de estudo. Durante a validação do sistema *SunTag*, agregados fluorescentes se formaram ao redor do núcleo celular, compatíveis com complexos RNP. A saber, antes de qualquer efeito do CRISPR, o gRNA deve ser complexado com a dCas9, formando uma RNP. Dentro da célula, a sequência de DNA do guia e da dCas9, entregue pelos plasmídeos, é transportada para o núcleo e transcrita em RNAm. O RNA se move para o citoplasma, onde é traduzido e complexado com o gRNA para formar a RNP. Com o complexo formado, a sequência NLS atrai a RNP para o interior do núcleo (LIU *et al.*, 2017). Visto que os RNPs se acumularam ao redor do núcleo, isso sugere que, devido ao tamanho e quantidade de plasmídeos transfectados simultaneamente, estaria ocorrendo uma possível “competição” pela entrada no núcleo, dificultando a passagem do complexo do citoplasma para essa organela.

Ao se avaliar a capacidade de marcação do sistema utilizado, verificamos que ele é altamente específico. Como esperado, em células controle negativo (sem infecção), só se observou a marcação fluorescente nas células transfectadas com gLINE1, visto que este retroelemento constitui cerca de 17% do genoma humano (LANDER *et al.*, 2001). Já as células transfectadas com gGAL4 e gkDNA apresentaram apenas uma fluorescência difusa, referente à ausência de marcação, uma vez que essas sequências não pertencem ao genoma humano. Desta forma, embora estudos anteriores tenham relatado ligação e edição fora do alvo no genoma humano (FU *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2014), nossos resultados mostram que o sistema dCas9/*SunTag*, utilizado neste trabalho, foi capaz de superar essa limitação.

A especificidade ao alvo foi também evidenciada nos experimentos de expressão de LINE-1. Nossos resultados mostram que a transfecção pelo sistema CRISPR/dCas9 reprimiu a expressão da ORF2 desse retroelemento em cerca de 80%. De fato, a ligação do complexo à fita de DNA parece perturbar a expressão gênica. Um estudo mostrou que a inserção de gRNAs guiados para o gene *MUC4* resultou em aproximadamente 45% de repressão do gene alvo. Além disso, quando o sítio de ligação da Cas9 é muito próximo ao promotor, a repressão pode chegar a 80% (CHEN *et al.*, 2013). No entanto, esse efeito parece ser minimizado ao marcar uma região distante do promotor ou uma região de íntron (CHEN *et al.*, 2013, 2018).

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a capacidade do sistema CRISPR/dCas9 em marcar a mesma sequência múltiplas vezes (CHEN *et al.*, 2013). Isso é observado ao transfectar células com gLINE1. Passadas 48h pós-transfecção, verificamos presença de vários pontos fluorescentes no núcleo celular, indicando reconhecimento e ligação da sequência alvo em diferentes sítios do genoma. Nossos resultados são condizentes com a literatura, uma vez que se sabe que os retroelementos LINE-1 estão dispersos por todos os cromossomos humanos (LANDER *et al.*, 2001; SIEBER; BROMLEY; DUNNING HOTOPP, 2017).

Ainda durante a validação, verificamos taxas de transfecção de 16-25%. Essas baixas taxas podem ser explicadas pelo fato de que, quando os vetores que codificam os componentes necessários para a formação do complexo CRISPR/Cas9 são grandes (9–19 kb), eles resultam em baixa eficiência de transfecção e viabilidade celular (SØNDERGAARD *et al.*, 2020). Um estudo comprovou que, usando um pequeno plasmídeo repórter (3,5 kb), a eletrotransferência de mais de 90% das células, com aproximadamente 70% de viabilidade, pode ser alcançada rotineiramente. No entanto, nas mesmas condições experimentais, a transfecção de plasmídeos maiores (de 6–16 kb) resultou em viabilidade e eficácia de transfecção muito baixas (LESUEUR; MIR; ANDRÉ, 2016), mostrando que essas fortes reduções estão diretamente ligadas ao tamanho físico da molécula do plasmídeo.

Ademais, a taxa de eficiência de gLINE1 foi de 16,67%, uma taxa relativamente menor quando comparado a outros trabalhos utilizando esse sistema (CHEN *et al.*, 2013; TANENBAUM *et al.*, 2014). Vale lembrar que retroelementos LINE-1, apesar de apresentarem sequências conservadas, são altamente passíveis de sofrerem mutações ou truncamentos ao longo do tempo (SIEBER; BROMLEY; DUNNING HOTOPP, 2017), o que poderia explicar a baixa taxa de eficiência do sistema em nosso trabalho. Outra possível explicação seria o uso de um único gRNA para cada sequência alvo. Visando detectar sequência do gene *MUC4*, um estudo produziu coquetéis de lentivírus, cada um contendo 5 a 6 gRNAs, e infectaram as células

com diferentes quantidades de gRNA. Foi observado marcação efetiva das sequências alvo usando 36 gRNAs. Curiosamente, o aumento do número de gRNAs para 73 não aumentou a eficiência de detecção, mas a redução para 16 resultou em ausência de marcação (CHEN *et al.*, 2013).

Desta forma, nossos achados possuem respaldo em dados prévios da literatura. Estudos futuros nessa temática precisarão levar em consideração o tamanho dos plasmídeos e o número de gRNAs utilizados para que se chegue a uma maior proporção de células transfectadas e a uma maior taxa de eficiência, possibilitando uma melhor compreensão da frequência em que os eventos de TGH ocorrem e um melhor acompanhamento da dinâmica de sequências-alvo em tempo real, permitindo o registro do arranjo espaço-temporal das mesmas (CHEN; GUAN; HUANG, 2016). A compreensão de eventos TGH a nível celular e molecular representará um grande avanço nos estudos evolutivos e de organização genômica.

## **6.2 CRISPR/dCas9 é capaz de detectar sequências de kDNA de *T. cruzi* transferidas lateralmente ao genoma hospedeiro**

Estudos anteriores demonstraram a transferência lateral de kDNA de *T. cruzi* para o genoma de vários vertebrados, utilizando diferentes metodologias, como PCR, *Southern blotting* genômico e FISH (Hecht *et al.*, 2010; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 1991, 1994). Assim, nossos resultados obtidos com o uso do sistema CRISPR/dCas9 fortalecem e complementam os achados anteriores.

Ao se infectar as células com o *T. cruzi* e transfectá-las em diferentes dias pós-infecção, observou-se a marcação de sequências de kDNA no núcleo da célula. Isso confirma que o kDNA está, de fato, integrado no genoma e não livre no citoplasma, comportando-se como um DNA episomal. Ademais, esse resultado demonstra que a aplicação desse método em nosso modelo de estudo com *T. cruzi* foi bem sucedida. É importante ressaltar que, de acordo com nossas pesquisas bibliográficas, este é o primeiro trabalho a realizar a transfecção de sistema CRISPR/Cas9 em uma célula infectada por protozoário.

Nesse sentido, a presença do parasito não impactou a taxa de transfecção de nenhum dos grupos, mantendo-as entre 16 e 24%. Igualmente, a eficiência da marcação em células transfectadas com gLINE1 e gkDNA não se alterou de maneira significativa ao longo do tempo de infecção, havendo marcação desses alvos em todo o período de estudo. Isso demonstra que o kDNA está sendo transferido de maneira contínua para o genoma da célula hospedeira, reforçando a hipótese de Wesley e colaboradores (2019), de que a integração de minicírculos

de kDNA no genoma hospedeiro representa um mecanismo adaptativo do *T. cruzi*, podendo favorecer a infecção.

A esse respeito, sabe-se que o parasito provoca lesões no DNA da célula hospedeira, as quais promovem o recrutamento de poli [ADP-ribose] polimerase-1 (PARP1), 8-oxoguanina glicosilase (OGG1) e XRCC6, indicando a ativação do processo de reparo do DNA (FLORENTINO *et al.*, 2023, 2021). O aumento de tais proteínas está associado ao aumento da atividade de retroelementos LINE-1, como confirmado em nossos experimentos de expressão gênica. Esse mecanismo, além de auxiliar no reparo do DNA danificado (FARKASH; PRAK, 2006; PROTASOVA; ANDREEVA; ROGAEV, 2021), também pode servir como um facilitador para a entrada de DNAs exógenos no genoma da célula hospedeira (MEERS; KESKIN; STORICI, 2016), como o kDNA de *T. cruzi*

Ainda que nossos dados tenham conseguido identificar o kDNA integrado, é compreensível que haja uma preocupação quanto à baixa taxa de eficiência em nossos grupos experimentais, uma vez que sequências transferidas lateralmente podem não ter sido detectadas devido a limitações da técnica. Vale lembrar que a cultura de células infectadas se comporta como um mosaico (TEIXEIRA *et al.*, 2011a), havendo desde células com várias cópias de kDNA integrado até células sem nenhuma integração, fator que, por si só, já dificulta a identificação das sequências de interesse. Esse mesmo fato poderia explicar ainda a dificuldade de plataformas de sequenciamento em detectar a integração de kDNA no genoma (FLEGONTOVA; LUKEŠ; FLEGONTOV, 2012). A esse respeito, considerando que obtivemos êxito em detectar sequências de kDNA com o sistema CRISPR, a técnica pode auxiliar nesse aspecto, uma vez que, havendo ligação no alvo, é possível verificar o sítio de integração por imunoprecipitação de cromatina seguido de sequenciamento (CHIP-seq) (LI *et al.*, 2018).

### **6. 3 Transferência de kDNA de *T. cruzi* ocorre mesmo na ausência do parasito**

Exossoma e microvesículas são vesículas extracelulares (EV – *extracellular vesicles*) capazes de transferir horizontalmente moléculas biologicamente ativas, como RNA e elementos transponíveis (KAWAMURA *et al.*, 2019; ONO *et al.*, 2019). Essas entidades são conhecidas por seu papel na comunicação intercelular em vários processos biológicos, incluindo a interação parasito-hospedeiro (COAKLEY; MAIZELS; BUCK, 2015; SZEMPRUCH *et al.*, 2016). Por exemplo, *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, modula receptores citosólicos

das células imunes inatas do hospedeiro secretando EVs contendo pequenos RNAs e DNA genômico parasitários (SISQUELLA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, células cocultivadas com *T. cruzi* em sistemas *transwell* apresentaram taxas de transfecção bem homogêneas em relação aos diferentes grupos experimentais, demonstrando que as moléculas presentes no secretoma não interferem no sistema utilizado. Quando transfectadas com gkDNA, as células apresentaram marcação para sequências de kDNA no genoma, com taxas de marcação similares às encontradas em células infectadas. O achado foi apoiado por técnica de qPCR, que mostrou ausência de DNA nuclear do *T. cruzi* e presença de minicírculos de kDNA nas amostras, confirmando que as sequências podem ser liberadas no secretoma do parasito, conforme descrito por Moraes (2022).

Além disso, nossos resultados também mostraram presença de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de células tratadas com benznidazol. Com esses dados, é possível constatar que a presença dos minicírculos de kDNA no genoma independem da presença do parasito, uma vez que a transfecção com gkDNA detectou alvos no genoma hospedeiro mesmo no 30º dia de análise. Isso pode ser explicado pela preferência de integração de sequências de kDNA em regiões de retroelemento LINE-1. Quando associado a esses elementos, o kDNA pode ser mobilizado e replicado para outras partes do genoma (SIEBER; BROMLEY; DUNNING HOTOPP, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2011a).

Aparentemente, a transferência de sequências de minicírculos de kDNA para o genoma hospedeiro é um processo natural de *T. cruzi*, do qual ele se utiliza para adquirir vantagens adaptativas, como sua própria sobrevivência e persistência no hospedeiro. De uma forma geral, as vesículas secretadas por *T. cruzi* têm um papel importante na modulação inflamatória e evasão do sistema imune, uma vez que elas participam da comunicação intracelular transportando moléculas funcionais. Por exemplo, ensaios *in vitro* utilizando macrófagos mostraram que a estimulação com EVs antes da infecção por *T. cruzi* aumentou a taxa de internalização do parasito e a liberação de tripomastigotas infectantes por essas células (LOVO-MARTINS *et al.*, 2018). Ainda, as EVs parecem participar da ativação de macrófagos via TLR2 desencadeando a produção de citocinas e uma série de outras moléculas, modulando assim a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, promovendo a sobrevivência do parasito (D'AVILA *et al.*, 2021).

#### **6.4 Expressão de retroelementos LINE-1 é modulada por infecção de *T. cruzi* e transfecção por CRISPR/dCas9**

Em concordância com o resultado do tópico anterior, observamos que células infectadas pelo parasito tiveram aumento significativo na expressão de LINE-1 em todos os tempos analisados. Níveis aumentados de expressão ocorreram desde o primeiro contato das células com *T. cruzi* (4h), havendo um pico na expressão de mRNA após 3 dias. Tal fato pode favorecer a integração, mobilidade e replicação das sequências de kDNA no genoma por mecanismo de retrotransposição. A esse respeito, outros patógenos parecem modular essa maquinaria. A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) causou um aumento significativo dos níveis endógenos da proteína ORF1 codificada por LINE-1 (SCHÖBEL *et al.*, 2021). Da mesma forma, o transcrito de células derivadas de pulmão infectadas com SARS-CoV-2 mostrou aumento da expressão de retrotransposon. De uma maneira geral, a regulação positiva desses retroelementos pode levar ao aumento da instabilidade do genoma (YIN *et al.*, 2021).

Além disso, o resultado obtido nesse experimento reforça a ligação específica do sistema CRISPR/dCas9 no sítio alvo determinada por gLINE1, uma vez que células transfectadas por esse gRNA tiveram a expressão reprimida. Em estudos futuros, seria possível verificar se a repressão causada pelo sistema CRISPR/dCas9 impacta a integração e multiplicação das sequências no genoma por avaliação quantitativa por qPCR.

## 7 CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o sistema CRISPR/dCas9 representa uma tecnologia robusta e confiável para detectar evento de transferência gênica horizontal no modelo de infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Neste projeto, o sistema demonstrou ser específico na identificação de sequências de LINE-1 e minicírculos de kDNA do parasito em células infectadas; fato que foi apoiado pela ausência de marcação de células transfectadas com gGAL4 e células não infectadas transfectadas com kDNA.

Além disso, apesar de o sistema apresentar algumas limitações que sabidamente resultam em uma baixa taxa de transfecção, como tamanho dos plasmídeos, e escolha e quantidade dos gRNAs, fomos capazes de visualizar sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* em células infectadas pelo parasito, em todos os períodos analisados. Ademais, comprovamos que a transferência de kDNA ocorre mesmo na ausência do parasito, fator que pode representar um mecanismo adaptativo usado por *T. cruzi* para modular a resposta imune do hospedeiro. No entanto, devido às limitações discutidas anteriormente, o sistema precisa ser aprimorado para maior abrangência e detecção de sequências transferidas lateralmente em futuros estudos dessa natureza.

Ainda, nossos resultados mostraram que a infecção por *T. cruzi* causa um aumento da expressão de retroelementos LINE-1, o que pode favorecer a integração, mobilidade e replicação das sequências de kDNA no genoma. De interesse, observamos que a ligação do sistema CRISPR/dCas9 em regiões ORF2 de LINE-1 reprimiu significativamente a expressão desse retroelemento. Como perspectiva, seria possível analisar se tal repressão impacta a integração e mobilização das sequências de kDNA, a fim de compreender o mecanismo de integração.

De forma geral, os resultados deste trabalho abrem novas perspectivas quanto ao emprego do sistema CRISPR/dCas9 como metodologia complementar nos estudos de eventos de transferência gênica horizontal entre diferentes organismos. A possibilidade do uso da técnica em células vivas permitiria o acompanhamento em tempo real das sequências transferidas horizontalmente, bem como noção da organização espaço-temporal dessas sequências. A versatilidade e extensa aplicabilidade da técnica podem ser exploradas para estudos com diferentes organismos, auxiliando na compreensão aprofundada de eventos dessa natureza.

## REFERÊNCIAS

- ADDGENE. **CRISPR Plasmids: Cut**. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.addgene.org/crispr/cut/>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- AGEITOS, J. M.; VIÑAS, M.; VILLA, T. G. Horizontal Gene Transfer in Obligate Parasites. *Em: HORIZONTAL GENE TRANSFER*. [s. l.]: Springer International Publishing, 2019. p. 235–255. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-21862-1\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-21862-1_9).
- ALMEIDA, M. V. *et al.* Taming transposable elements in vertebrates: from epigenetic silencing to domestication. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 529–553, 2022.
- ANDERSSON, J. O. Lateral gene transfer in eukaryotes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [s. l.], v. 62, n. 11, p. 1182–1197, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761667>.
- ARAUJO, P. F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 112, n. 6, p. 437–446, 2017.
- AZAD, R. K.; LAWRENCE, J. G. Towards more robust methods of alien gene detection. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. e56, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297116>.
- BABAIAN, A. *et al.* Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. **Oncogene**, [s. l.], v. 35, n. 19, p. 2542–2546, 2016.
- BABUSHOK, D. v; KAZAZIAN, H. H. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. **Human mutation**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 527–539, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309057>.
- BEAULAURIER, J. *et al.* Metagenomic binning and association of plasmids with bacterial host genomes using DNA methylation. **Nature biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 61–69, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29227468>.
- BECK, C. R. *et al.* LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 187–215, 2011.
- BECQ, J.; CHURLAUD, C.; DESCHAVANNE, P. A benchmark of parametric methods for horizontal transfers detection. **PloS one**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e9989, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376325>.
- BERN, C. *et al.* Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 1, 2019.
- BONNEY, K.; ENGMAN, D. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 510–518, 2008.
- BORGEAUD, S. *et al.* The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. **Science**, [s. l.], v. 347, n. 6217, p. 63–67, 2015.
- BRELSFOARD, C. *et al.* Presence of extensive Wolbachia symbiont insertions discovered in the genome of its host *Glossina morsitans morsitans*. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e2728, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24763283>.

- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. THE MECHANISMS OF TRYPANOSOMA CRUZI INVASION OF MAMMALIAN CELLS. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 175–200, 1995.
- CAI, L. *et al.* Deeply Altered Genome Architecture in the Endoparasitic Flowering Plant *Sapria himalayana* Griff. (Rafflesiaceae). **Current biology : CB**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 1002-1011.e9, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33485466>.
- CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Trypanosoma cruzi Nuclear DNA and its Correlation with the Parasite Lifecycle. *Em*: TEIXEIRA, A. R. L.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. (org.). **Emerging Chagas Disease**. [S. l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2012. p. 70–82.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 5, n. 13, p. 1231–1240, 2003.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- CHAUDHARY, N. *et al.* Background-suppressed live visualization of genomic loci with an improved CRISPR system based on a split fluorophore. **Genome Research**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1306–1316, 2020.
- CHEN, B. *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. **Cell**, [s. l.], v. 155, n. 7, p. 1479–1491, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>.
- CHEN, B. *et al.* Efficient labeling and imaging of protein-coding genes in living cells using CRISPR-Tag. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5065, 2018.
- CHEN, X.; AZIZKHAN, J. C.; LEE, D. C. The binding of transcription factor Sp1 to multiple sites is required for maximal expression from the rat transforming growth factor alpha promoter. **Oncogene**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1805–1815, 1992.
- CHEN, B.; GUAN, J.; HUANG, B. Imaging Specific Genomic DNA in Living Cells. **Annual review of biophysics**, [s. l.], v. 45, n. April, p. 1–23, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27145877>.
- COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 477–489, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433251>.
- COLBY, D. W. *et al.* Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 342, n. 3, p. 901–912, 2004.
- COLONNA ROMANO, N.; FANTI, L. Transposable Elements: Major Players in Shaping Genomic and Evolutionary Patterns. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1048, 2022.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. de. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.
- DANIELS, S. B. *et al.* Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 339–355, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155157>.

- D'AVILA, H. *et al.* Impact of the Extracellular Vesicles Derived From *Trypanosoma cruzi*: A Paradox in Host Response and Lipid Metabolism Modulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.
- DENLI, A. M. *et al.* Primate-Specific ORF0 Contributes to Retrotransposon-Mediated Diversity. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 583–593, 2015.
- DEY, R. *et al.* Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 399–414, 2010.
- DNDI. **Chagas disease**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>. Acesso em: 18 nov. 2022.
- DOMINGUEZ, A. A.; LIM, W. A.; QI, L. S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 5–15, 2016.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6213, 2014.
- DREZEN, J.-M. *et al.* Foreign DNA acquisition by invertebrate genomes. **Journal of invertebrate pathology**, [s. l.], v. 147, p. 157–168, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27642089>.
- ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.
- EISEN, J. A. Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. **Current opinion in genetics & development**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 606–611, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11088009>.
- EL-SAYED, N. M. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.
- EMAMALIPOUR, M. *et al.* Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, 2020.
- EME, L. *et al.* Lateral Gene Transfer in the Adaptation of the Anaerobic Parasite *Blastocystis* to the Gut. **Current biology : CB**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 807–820, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28262486>.
- FARKASH, E. A.; PRAK, E. T. L. DNA Damage and L1 Retrotransposition. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2006, p. 1–8, 2006.
- FENG, Q. *et al.* Human L1 Retrotransposon Encodes a Conserved Endonuclease Required for Retrotransposition. **Cell**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 905–916, 1996.
- FLEGONTOVA, O.; LUKEŠ, J.; FLEGONTOV, P. Lack of evidence for integration of *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA in South American human genomes. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 437–441, 2012.
- FLORENTINO, P. T. V. *et al.* DNA damage and oxidative stress in human cells infected by *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. e1009502, 2021.
- FLORENTINO, P. T. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection changes the chromatin proteome profile of infected human cells. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 272, p. 104773, 2023.

- FU, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 822–826, 2013.
- FUNKHOUSER-JONES, L. J. *et al.* Wolbachia co-infection in a hybrid zone: discovery of horizontal gene transfers from two Wolbachia supergroups into an animal genome. **PeerJ**, [s. l.], v. 3, p. e1479, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26664808>.
- GILBERT, C. *et al.* A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. **Nature**, [s. l.], v. 464, n. 7293, p. 1347–1350, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428170>.
- GILBERT, C.; FESCHOTTE, C. Horizontal acquisition of transposable elements and viral sequences: patterns and consequences. **Current opinion in genetics & development**, [s. l.], v. 49, p. 15–24, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29505963>.
- GIRARD, R. M. B. M. *et al.* An Aromatic Diamidine That Targets Kinetoplast DNA, Impairs the Cell Cycle in *Trypanosoma cruzi*, and Diminishes Trypomastigote Release from Infected Mammalian Host Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 5867–5877, 2016.
- GOGARTEN, J. P.; TOWNSEND, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 679–687, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138096>.
- GUIMARO, M. C. *et al.* Inhibition of autoimmune Chagas-like heart disease by bone marrow transplantation. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e3384, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521296>.
- GUO, D.-G. *et al.* CRISPR-based genomic loci labeling revealed ordered spatial organization of chromatin in living diploid human cells. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, [s. l.], v. 1866, n. 12, p. 118518, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31376419>.
- GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 673–685, 2009.
- HECHT, M. M. *et al.* Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PloS one**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. e9181, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169193>.
- HERRERA, L. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in false negative samples of collected triatomines, xenodiagnosis material, and biopsies of experimentally infected animals. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 141–147, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33156443>.
- HOLMES, S. E.; SINGER, M. F.; SWERGOLD, G. D. Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 267, n. 28, p. 19765–19768, 1992.
- HONG, Y. *et al.* Comparison and optimization of CRISPR/dCas9/gRNA genome-labeling systems for live cell imaging. **Genome biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 39, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29566733>.
- HUSNIK, F.; MCCUTCHEON, J. P. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 67–79, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.137>.
- JANG, H. S. *et al.* Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancers. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 611–617, 2019.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. das C.; ROQUE, A. L. R. Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020.

KAPLI, P.; YANG, Z.; TELFORD, M. J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 428–444, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41576-020-0233-0>.

KAWAMURA, Y. *et al.* Extracellular vesicles mediate the horizontal transfer of an active LINE-1 retrotransposon. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1643214, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31448067>.

KEELING, P. J.; PALMER, J. D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. **Nature reviews. Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 605–618, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591983>.

KHAZINA, E.; WEICHENRIEDER, O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 731–736, 2009.

KHOSRAVI, S. *et al.* Live-Cell CRISPR Imaging in Plant Cells with a Telomere-Specific Guide RNA. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2166, p. 343–356, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32710419>.

KISHORE, S. P.; STILLER, J. W.; DEITSCH, K. W. Horizontal gene transfer of epigenetic machinery and evolution of parasitism in the malaria parasite Plasmodium falciparum and other apicomplexans. **BMC evolutionary biology**, [s. l.], v. 13, p. 37, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398820>.

KOONIN, E. v. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. **F1000Research**, [s. l.], v. 5, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508073>.

LANDER, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, [s. l.], v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.

LESUEUR, L. L.; MIR, L. M.; ANDRÉ, F. M. Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 5, p. e291, 2016.

LEWIS, M. D. *et al.* Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in Trypanosoma cruzi populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 1305–1317, 2009.

LI, C. *et al.* Verification of DNA motifs in Arabidopsis using CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1446–1451, 2018.

LIN, Y. *et al.* CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 7473–7485, 2014.

LIU, C. *et al.* Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 266, p. 17–26, 2017.

LIU, B. *et al.* Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 363–369, 2005.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOVO-MARTINS, M. I. *et al.* Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, 2018.
- LUKEŠ, J. *et al.* Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.
- MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. Editing Machines. **Cell**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 435–438, 2002.
- MARTIN, S. L.; BUSHMAN, F. D. Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein from the Mouse LINE-1 Retrotransposon. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 467–475, 2001.
- MATHIAS, S. L. *et al.* Reverse Transcriptase Encoded by a Human Transposable Element. **Science**, [s. l.], v. 254, n. 5039, p. 1808–1810, 1991.
- MÄTLIK, K.; REDIK, K.; SPEEK, M. L1 Antisense Promoter Drives Tissue-Specific Transcription of Human Genes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2006, p. 1–16, 2006.
- MCINNES, R. S. *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 53, p. 35–43, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32143027>.
- MEERS, C.; KESKIN, H.; STORICI, F. DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question. **DNA Repair**, [s. l.], v. 44, p. 17–21, 2016.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature reviews. Genetics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>.
- MORAES, A. S. **Elucidação dos mecanismos de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro.** 2022. 1–132 f. - Universidade de Brasília, Brasília, 2022.
- MORAN, J. *et al.* High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells. **Cell**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 917–927, 1996.
- MOREIRA, O. C. *et al.* Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. **Parasites & vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 404, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28851417>.
- MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 404–405, 2020.
- NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D8–D13, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140470>.
- OLIVEIRA, R. P. *et al.* The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 94, n. suppl 1, p. 65–70, 1999.

- ONO, R. *et al.* Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. **Communications biology**, [s. l.], v. 2, p. 57, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30775458>.
- PASSOS-SILVA, D. G. *et al.* Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, [s. l.], v. 2010, p. 1–14, 2010.
- PATERSON, I. K. *et al.* Optimising Antibiotic Usage to Treat Bacterial Infections. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 37853, 2016.
- PAYER, L. M.; BURNS, K. H. Transposable elements in human genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 760–772, 2019.
- PENZKOFER, T. *et al.* L1Base 2: more retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D68–D73, 2017a.
- PENZKOFER, T. *et al.* L1Base 2: more retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D68–D73, 2017b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924012>.
- PEREIRA, K. S. *et al.* Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 441–446, 2009.
- PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 595–603, 2015.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.
- PETERSEN, G. *et al.* Mitochondria in parasitic plants. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 52, p. 173–182, 2020.
- PHILIPPE, H.; TELFORD, M. J. Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. **Trends in Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 614–620, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534706002655>.
- PROTASOVA, M. S.; ANDREEVA, T. V.; ROGAEV, E. I. Factors Regulating the Activity of LINE1 Retrotransposons. **Genes**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1562, 2021.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- RAVARANI, C. N. J. *et al.* Affinity and competition for TBP are molecular determinants of gene expression noise. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10417, 2016.
- RIBEIRO, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 162, p. 1–6, 2016.
- RICHARDS, T. A. *et al.* Horizontal Gene Transfer and the Evolution of Parasitic Protozoa. **Protist**, [s. l.], v. 154, n. 1, p. 17–32, 2003.
- RIOU, G.; DELAIN, E. ELECTRON MICROSCOPY OF THE CIRCULAR KINETOPLASTIC DNA FROM *TRYPANOSOMA CRUZI*: OCCURRENCE OF CATENATED FORMS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 210–217, 1969.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, [s. l.], v. 3, 2001.

SANCHEZ-PUERTA, M. V. *et al.* Genome-scale transfer of mitochondrial DNA from legume hosts to the holoparasite *Lophophytum mirabile* (Balanophoraceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, [s. l.], v. 132, p. 243–250, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30528080>.

SANCHEZ-PUERTA, M. V. *et al.* Unparalleled replacement of native mitochondrial genes by foreign homologs in a holoparasitic plant. **The New phytologist**, [s. l.], v. 214, n. 1, p. 376–387, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905116>.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogenic heart cells in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 38–53, 1974.

SCHAACK, S.; GILBERT, C.; FESCHOTTE, C. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. **Trends in ecology & evolution**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 537–546, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20591532>.

SCHNAUFER, A.; DOMINGO, G. J.; STUART, K. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1071–1084, 2002.

SCHÖBEL, A. *et al.* Hepatitis C virus infection restricts human LINE-1 retrotransposition in hepatoma cells. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. e1009496, 2021.

SCHÖNKNECHT, G.; WEBER, A. P. M.; LERCHER, M. J. Horizontal gene acquisitions by eukaryotes as drivers of adaptive evolution. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 9–20, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24323918>.

SCOTT, A. F. *et al.* Origin of the human L1 elements: Proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. **Genomics**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 113–125, 1987.

SIBBALD, S. J. *et al.* Lateral Gene Transfer Mechanisms and Pan-genomes in Eukaryotes. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 927–941, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32828660>.

SIEBER, K. B.; BROMLEY, R. E.; DUNNING HOTOPP, J. C. Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. **Experimental cell research**, [s. l.], v. 358, n. 2, p. 421–426, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28189637>.

SIMÕES-BARBOSA, A. *et al.* Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 101, n. 8, p. 833–843, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293976>.

SIMÕES-BARBOSA, A. *et al.* Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 94 Suppl 1, p. 249–252, 1999.

SISQUELLA, X. *et al.* Malaria parasite DNA-harbouring vesicles activate cytosolic immune sensors. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1985, 2017.

SKIPPINGTON, E.; RAGAN, M. A. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 707–735, 2011.

- SØNDERGAARD, J. N. *et al.* Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. **Communications Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 319, 2020.
- SONG, W. *et al.* MetaCHIP: community-level horizontal gene transfer identification through the combination of best-match and phylogenetic approaches. **Microbiome**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 36, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832740>.
- SOUICY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature reviews. Genetics**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 472–482, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3962>.
- SWERGOLD, G. D. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 6718–6729, 1990.
- SYVANEN, M. HORIZONTAL GENE TRANSFER: Evidence and Possible Consequences. **Annual Review of Genetics**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 237–261, 1994.
- SZEMPRUCH, A. J. *et al.* Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 669–675, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27615028>.
- TANENBAUM, M. E. *et al.* A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. **Cell**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 635–646, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 82, n. 974, p. 788–798, 2006.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* [Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 55–58, 1991.
- TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Parasite induced genetically driven autoimmune Chagas heart disease in the chicken model. **Journal of visualized experiments : JoVE**, [s. l.], n. 65, p. 3716, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951533>.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011a.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation research**, [s. l.], v. 305, n. 2, p. 197–209, 1994.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e1000, 2011b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468314>.
- THOMAS, S. *et al.* A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 133, 2007.
- THOMAS, J.; PRITHAM, E. J. Helitrons, the Eukaryotic Rolling-circle Transposable Elements. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2015.
- VAN VALEN, L. A new evolutionary law. **Evolutionary Theory**, [s. l.], v. 1, p. 1–30, 1973.

- WANG, J. Y.; DOUDNA, J. A. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. **Science**, [s. l.], v. 379, n. 6629, 2023.
- WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual review of biochemistry**, [s. l.], v. 85, p. 227–264, 2016.
- WESLEY, M. *et al.* Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 1856, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31496999>.
- WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. [S. l.], 2022. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1). Acesso em: 2 set. 2022.
- WICKER, T. *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 973–982, 2007.
- WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, [s. l.], v. 482, n. 7385, p. 331–338, 2012.
- WIJAYAWARDENA, B. K.; MINCHELLA, D. J.; DEWOODY, J. A. Hosts, parasites, and horizontal gene transfer. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 329–338, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.001>.
- WU, X. *et al.* Live-Cell Imaging of Genomic Loci Using CRISPR/Molecular Beacon Hybrid Systems. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2166, p. 357–372, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32710420>.
- YIN, Y. *et al.* Exogenous Coronavirus Interacts With Endogenous Retrotransposon in Human Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.
- ZANTA, M. A.; BELGUISE-VALLADIER, P.; BEHR, J.-P. Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 91–96, 1999.
- ZATTERA, M. L.; BRUSCHI, D. P. Transposable Elements as a Source of Novel Repetitive DNA in the Eukaryote Genome. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 21, p. 3373, 2022.
- ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 180, n. 2, p. 480–486, 1999.
- ZUMA, A. A. *et al.* Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on Trypanosoma cruzi: implications for kDNA ultrastructure and replication. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 419–430, 2015.