

Héllida Marina Costa Silva

Caracterização funcional do gene Hus1 de *Trypanosoma cruzi*

**Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
Fevereiro de 2015**

Héllida Marina Costa Silva

Caracterização funcional do gene Hus1 de *Trypanosoma cruzi*

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado
Coorientadora: Dra. Ceres Luciana Alves**

Dissertação de Mestrado submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Fevereiro de 2015**



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE HÉLLIDA MARINA COSTA SILVA. Aos vinte dias do mês de fevereiro de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização funcional do gene Hus1 de Trypanosoma cruzi", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Débora de Oliveira Lopes (Universidade Federal de São João Del Rey), aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ceres Luciana Alves - Co-orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.

D. Lopes

Dra. Débora de Oliveira Lopes (Universidade Federal de São João Del Rey)

Ronaldo Alves Pinto Nagem

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)

Ceres Luciana Alves

Dra. Ceres Luciana Alves - Co-orientadora (UFMG)

Jader dos Santos Cruz
 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Carlos Renato Machado

Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)

Dedico esta dissertação aos meus amores.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Carlos Renato por ter me orientado durante esse projeto. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela disposição em me ouvir, por me mostrar o lado positivo dos resultados e, principalmente, pela paciência nos meus momentos de desespero.

Também agradeço aos demais pesquisadores do Laboratório de Genética Bioquímica pelas discussões, críticas e sugestões durante este trabalho. À Neuza por contribuir na manutenção do laboratório, facilitando a execução dos meus experimentos. Aos alunos e ex-alunos do LGB pela ajuda durante minha adaptação ao novo laboratório e pela convivência na rotina de bancada. Ao grupo de reparo pela ajuda na execução do projeto e pelas discussões dos resultados gerados. Em especial, quero agradecer à Ceres, pelo auxílio fundamental no desenvolvimento de todo este trabalho. Ao João por ter me ensinado sobre citometria de fluxo. Ao Rodrigo, à Mainá e ao Bruno pela ajuda na parte de bioinformática. À Anna, à Selma e ao Pedro pelas explicações sobre as curvas de crescimento. À Isabela pelas conversas durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço aos demais laboratórios do ICB pela disponibilidade em ajudar. À Rafaela Paim pela sua dedicação durante a realização da reação de PCR em tempo real. À Dani Reis pela ajuda no uso do citômetro e pelas conversas que tornaram os experimentos mais agradáveis. Ao Juliano pela realização das reações de sequenciamento de DNA. Às agências de fomento, CNPq, Capes e Fapemig, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, que foram muito importantes durante esses dois anos, que tornaram esta etapa da minha vida mais divertida, que ouviram meus desabafos sobre o mestrado e os resultados nem sempre positivos. Aos amigos que estão sempre por perto e aos que vejo só de vez em quando. Às amigas que fiz em BH, às que deixei em Viçosa, às do ensino médio, às da faculdade e às do LBM. Especialmente à Pri por estar comigo dentro e fora do laboratório, pela companhia desde a época da graduação, por entender os dilemas da vida de uma bacharela em Bioquímica e por compartilhar os medos e sonhos dos iniciantes nessa carreira científica.

Ao Víctor, meu namorado e amigo mais que especial, que mesmo não entendendo nada sobre reparo de DNA, sempre me ouve discutir os resultados, planejar os experimentos e ensaiar as apresentações. Por ser minha luz, fora desse mundo louco da pesquisa, que me ajuda a seguir em frente e nunca desistir apesar dos desafios durante o caminho. Por se fazer presente mesmo estando longe e com seu otimismo, me mostrar o lado bom das coisas.

À minha família pelo carinho e apoio. Ao meu pai por ter me dado base para que eu conseguisse chegar até aqui. À minha mãe e minha irmã, pela amizade, amor e incentivo constante, por vibrarem com as conquistas e escutarem pacientemente as reclamações ao longo do caminho. Minha Pretinha, sinto falta da sua companhia diária, muito obrigada por fazer parte da minha vida e com esse seu jeito único tornar meus dias mais felizes. Mamãe, muito obrigada pelo colo, exemplo, dedicação, conselhos e amor incondicional. Obrigada por me ajudar nos momentos difíceis, por acreditar nos meus sonhos e fazer de tudo para que eu possa realizá-los, mesmo que isso signifique estar longe de você.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades que tive nesses anos e pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho. “A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode” (Isaac Newton).

A todos vocês que fizeram parte desta jornada, meu muito obrigada!

“Sejam quais foram os resultados, com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: fiz o que pude.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	v
1. Introdução	1
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	1
1.2. As vias de reparo de DNA	7
1.3. A resposta ao dano de DNA	10
1.4. Hus1 e o estresse replicativo	14
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Material e Métodos	18
3.1. Células utilizadas e condições de cultivo	18
3.2. Iniciadores	18
3.3. Reação em Cadeia da Polimerase	18
3.4. Clonagem do gene Hus1 em vetor de clonagem	19
3.5. Clonagem do gene Hus1 em vetor de expressão	20
3.6. Sequenciamento de DNA e análise por bioinformática	21
3.7. Transfecção de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.8. Extração de RNA e RT-qPCR	23
3.9. Avaliação do efeito da superexpressão do gene TcHus1 no crescimento de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.9.1. Curva de crescimento	25
3.9.2. Curvas de crescimento na presença de agentes genotóxicos	25
3.10. Análise do nível de transcrição de TcHus1 após tratamento com MMS	26
3.11. Análise da progressão do ciclo celular da cultura selvagem por FACS	26
4. Resultados	27
4.1. Clonagem do gene Hus1	27

4.2. Sequenciamento de DNA e análise por bioinformática	31
4.3. Extração de RNA e RT-qPCR para confirmação da superexpressão	35
4.4. Curva de crescimento	36
4.5. Curvas de crescimento na presença de agentes genotóxicos	36
4.6. Nível de transcrição de TcHus1 após o tratamento com MMS	45
4.7. Avaliação da progressão do ciclo celular de parasitos selvagens	45
5. Discussão	48
6. Conclusão	55
7. Referências Bibliográficas	56
8. Anexos	65
8.1. Anexo 1: Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega)	65
8.2. Anexo 2: Mapa do vetor pROCKhigro	66

RESUMO

A resposta ao dano de DNA (DDR) é um mecanismo coordenado de sinalização do dano, no qual a detecção da lesão leva à parada do ciclo celular e o recrutamento da maquinaria de reparo. Uma das vias da DDR é ativada pela cinase ATR. Em resposta à replicação parada, o complexo 9-1-1, formado por Rad9, Rad1 e Hus1, é carregado para regiões de DNA de fita simples recobertas pela proteína RPA. A presença de 9-1-1 facilita o recrutamento de TopBP1, ativador alostérico de ATR. ATR ativa é capaz de fosforilar a cinase Chk1 que, por sua vez, fosforila e inativa Cdc25, promovendo o *checkpoint* de replicação e a parada do ciclo celular. Estudos em *Leishmania major* sugerem a associação entre Hus1 e o aumento da capacidade desse parasito em lidar com o estresse replicativo. Os mecanismos envolvidos na resposta ao estresse replicativo não estão elucidados em *Trypanosoma cruzi*. Dessa forma, este trabalho visou caracterizar o gene Hus1 de *T. cruzi*, o parasito causador da doença de Chagas. Para estudar a função de TcHus1 foi construída uma linhagem de *T. cruzi* com níveis aumentados deste gene. Assim, formas epimastigotas da cepa CL Brener foram transfectadas com o vetor pROCKhigro contendo o gene TcHus1. A análise do perfil de crescimento do parasito superexpressor em condições normais de cultivo, sugeriu que a expressão elevada desse gene não compromete as funções básicas da célula. Também foi analisado o perfil de crescimento dos parasitos quando submetidos ao tratamento com agentes genotóxicos causadores de estresse replicativo. Os tratamentos realizados com benzonidazol, cisplatina, camptotecina, hidroxiureia e metil metano sulfonato (MMS) não apresentaram diferença no perfil de crescimento da célula superexpressora de TcHus1 quando comparada com as células controle. Contudo, a reação de PCR quantitativa em tempo real de células submetidas ao tratamento com MMS mostrou que apenas os parasitos pROCK-Hus1 foram capazes de aumentar a expressão de Hus1 em resposta ao estresse replicativo gerado pelo MMS. Os resultados apresentados neste trabalho não permitem concluir se a função do gene Hus1 de *T. cruzi* é promover a ativação da cinase de *checkpoint* ATR, como descrito nos demais eucariotos. Mais estudos serão necessários para compreender a função e a importância dessa via na manutenção da integridade do genoma desse protozoário.

ABSTRACT

The DNA damage response (DDR) is a coordinated mechanism of damage signaling, in which lesion detection leads to cell cycle arrest and recruitment of repair machinery. One branch of the DDR is activated by the ATR kinase. In response to replication arrest, the 9-1-1 complex, formed by Rad9, Rad1 and Hus1, is loaded into single strand DNA regions covered by RPA. The presence of 9-1-1 facilitates the recruitment of TopBP1, allosteric activator of ATR. Active ATR is capable of phosphorylating the Chk1 kinase which in turn phosphorylates and inactivates Cdc25, promoting replication checkpoint and cell cycle arrest. Studies in *Leishmania major* suggest an association between Hus1 and increased capacity of this parasite in dealing with replicative stress. The mechanisms involved in the replicative stress response are not elucidated in *Trypanosoma cruzi*. Thus, this study aimed to characterize the Hus1 gene in *T. cruzi*, the parasite that causes Chagas disease. To study TcHus1 function was constructed a *T. cruzi* strain with increased levels of this gene. Thus, epimastigotes of CL Brener strain were transfected with the vector pROCKhigro containing the gene TcHus1. The analysis of overexpressor parasite growth profile under normal culture conditions suggested that overexpression of this gene does not compromise the basic functions of the cell. The growth profile of the parasites treated with replicative stress inducing drugs was analyzed. The treatment with benznidazole, cisplatin, camptothecin, hydroxyurea and methyl methane sulfonate (MMS) showed no difference in the growth profile between TcHus1 overexpressing cells and control cells. However, the quantitative real time PCR reaction of MMS treated cells showed that only pROCK-Hus1 parasites were able to increase Hus1 expression in response to replicative stress generated by MMS. The results presented in this study do not allow to conclude whether the function of Hus1 gene in *T. cruzi* is to promote the activation of the checkpoint kinase ATR, as describing in other eukaryotes. More studies are needed to understand the role and the importance of this pathway in the maintenance of genome integrity on this protozoan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das alterações morfológicas no <i>Trypanosoma cruzi</i> durante seu ciclo de vida	2
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3: Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências	8
Figura 4: Ativação da ATM	13
Figura 5: Ativação da ATR	13
Figura 6: Estrutura do complexo 9-1-1	16
Figura 7: Amplificação do gene TcHus1	28
Figura 8: PCR de colônia com os clones pGEM-Hus1	28
Figura 9: Digestão enzimática	30
Figura 10: PCR de colônia com os clones pROCKhigro-Hus1	30
Figura 11: Linearização com a enzima <i>NotI</i>	30
Figura 12: Alinhamento entre as sequências de TcHus1 obtida por sequenciamento e depositada no banco de dados como alelo <i>Esmeraldo-like</i>	32
Figura 13: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de TcHus1 clonada e de alguns <i>Trypanosoma</i> depositadas no banco de dados	33
Figura 14: Sobreposição das estruturas tridimensionais de Hus1 preditas	33
Figura 15: Extração de RNA	37
Figura 16: Confirmação da superexpressão de Hus1	37
Figura 17: Curva de crescimento.....	38
Figura 18: Curva de crescimento com benzonidazol	38
Figura 19: Curva de crescimento com camptotecina	40
Figura 20: Curva de crescimento após tratamento com camptotecina	40
Figura 21: Curva de crescimento com cisplatina	41
Figura 22: Curva de crescimento com hidroxiureia	43
Figura 23: Curva de crescimento após o tratamento com MMS	44
Figura 24: Nível de expressão de Hus1 após o tratamento com MMS	46
Figura 25: Progressão do ciclo celular de culturas selvagens (WT) na presença e ausência de agentes genotóxicos	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nova nomenclatura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Tabela 2: Iniciadores usados neste trabalho	18
Tabela 3: SNPs encontrados no gene TcHus1 do alelo Esmeraldo- <i>like</i> de CL Brener	34
Tabela 4: SNPs encontrados no gene TcHus1 do alelo Não Esmeraldo- <i>like</i> de CL Brener	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Apurínico/Apirimidínico
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
ATRIP	Proteína de Interação com ATR
BER	Reparo por Excisão de Base
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCT	Domínio BRCA1 C-terminal
BZ	Benzonidazol
cDNA	DNA Complementar
CG	Meio de Cultura <i>CircleGrow</i>
Chk1	Cinase de <i>Checkpoint 1</i>
CPD	Dímero de Ciclobutano Pirimidina
CPT	Camptotecina
DDR	Resposta ao Dano de DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DSB	Quebra de Fita Dupla no DNA
DSBR	Reparo de Quebra de Fita Dupla no DNA
DTU	Unidade Discreta de Tipagem
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Assisted Cell Sorting</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGR	Reparo Global do Genoma
HR	Recombinação Homóloga
HU	Hidroxiureia
IDL	Alças de inserção/deleção
LIT	Meio de Cultura <i>Liver Infusion Tryptose</i>
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLH/PMS	Homólogos de MutL

MMC	Mitomicina C
MMR	Reparo de Erro de Pareamento
MMS	Metil Metano Sulfonato
MRN	Complexo Mre11-Rad50-Nbs1
MSH	Homólogo de MutS
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeo
NHEJ	Junção das Extremidades Não Homólogas
OD	Densidade Óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de Bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIKK	Cinase relacionada a cinase 3- fosfatidilinositol
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFC	Fator de Replicação C
RNA	Ácido Ribonucléico
rNTP	Ribonucleotídeos
RPA	Proteína de Replicação A
RT-qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SSB	Quebra de Fita Simples no DNA
ssDNA	DNA de Fita Simples
TCR	Reparo Acoplado a Transcrição
TopBP1	Proteína de Ligação a Topoisomerasa II 1
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Luz Ultravioleta
WT	<i>Wild Type</i>
9-1-1	Complexo Rad9-Rad1-Hus1
6-4 PP	6,4 - fotoprodutos

1. INTRODUÇÃO

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O parasito flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana. Essa é uma doença endêmica de 21 países da América Latina, incluindo o Brasil, que tem se espalhado para Estados Unidos, Canadá e muitos países da Europa e do Pacífico Ocidental, devido ao fluxo migratório. Estima-se que de 6 a 8 milhões de pessoas em todo mundo sejam acometidas por essa enfermidade (PAHO/WHO, 2014).

Em 1908, o médico brasileiro Carlos Chagas estava na cidade mineira de Lassance quando observou a presença de um inseto hematófago entre as moradias humanas, conhecido localmente como barbeiro. Ao estudar a biologia desse inseto, Chagas identificou em seu intestino posterior um protozoário flagelado de espécie desconhecida, o qual nomeou de *Trypanosoma cruzi*. Ele também observou a presença desse parasito no sangue periférico de animais domésticos, como gatos (revisado em Lewinsohn, 2003). Em abril de 1909, Chagas encontrou pela primeira vez *T. cruzi* em sangue humano ao examinar Berenice, uma menina com quase 2 anos de idade, febril e com sinais de infecção aguda (Chagas, 1909). Assim, Carlos Chagas descobriu uma nova doença humana, um novo parasito e seu vetor. Nos anos seguintes determinou o ciclo de vida desse parasito, as fases da doença e a sua patogenicidade (Coura e Borges-Pereira, 2010).

O protozoário *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, que inclui os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Uma das características dos organismos desta família é a alteração da sua morfologia celular durante os estágios do ciclo de vida. Em *T. cruzi* existem duas formas que são replicativas, a epimastigota e a amastigota, e duas que são infectivas e não se replicam, tripomastigota metacíclica e tripomastigota sanguínea (Figura 1). Os tripanossomatídeos contêm muitas organelas que são típicas da maioria dos eucariotos, como os lisossomos e o retículo endoplasmático, além de vias secretórias e endocíticas bem desenvolvidas. Contudo, algumas de suas organelas possuem características que são únicas desse grupo. Entre elas, destaca-se o fato de possuírem uma única mitocôndria que contém o cinetoplasto, que é uma estrutura

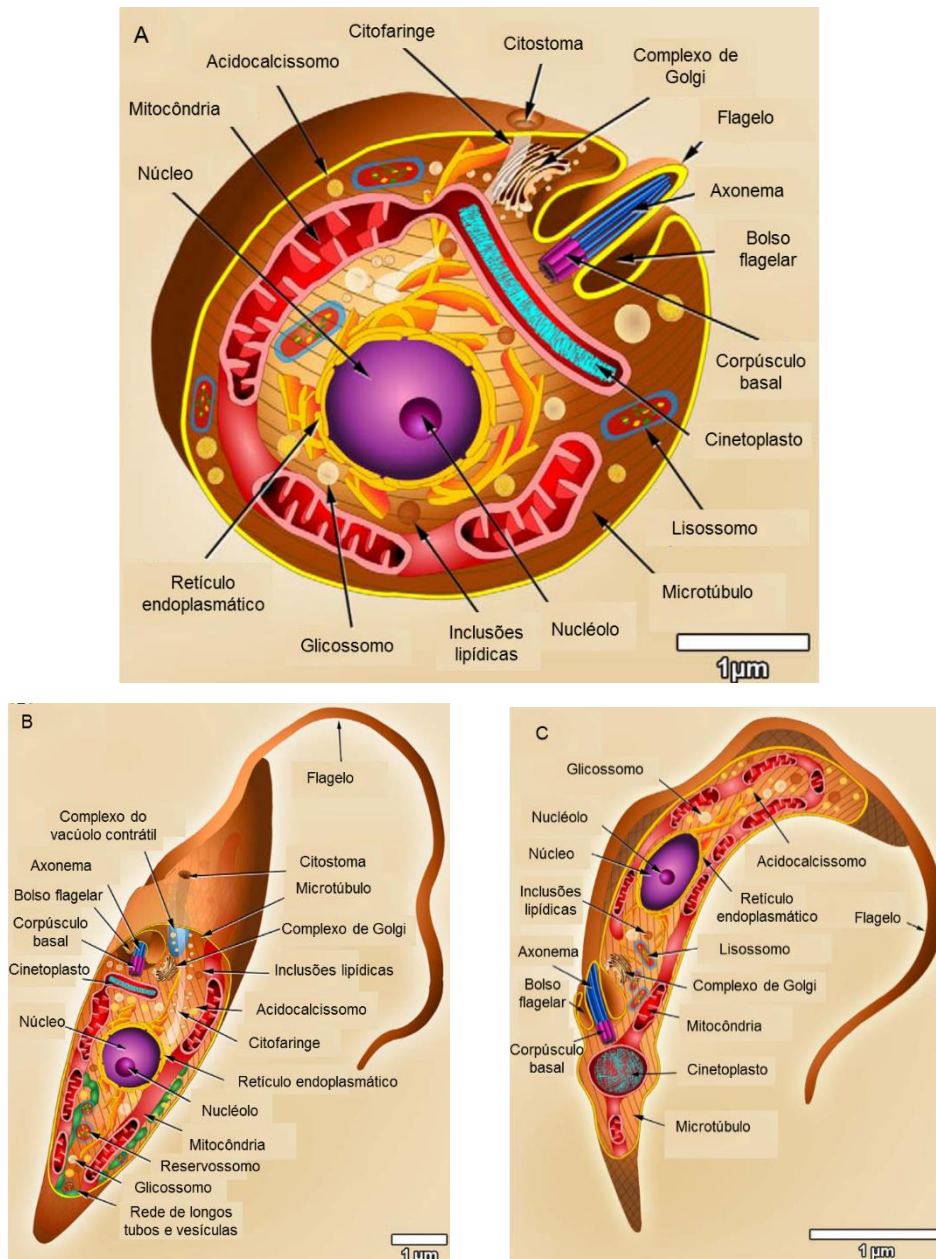


Figura 1: Representação esquemática das alterações morfológicas no *Trypanosoma cruzi* durante seu ciclo de vida. A) Forma replicativa amastigota presente no hospedeiro vertebrado B) Forma replicativa epimastigota presente no inseto C) Forma infectiva tripomastigota. Adaptado de Teixeira *et al*, 2012.

específica que se encontra adjacente ao corpo basal do flagelo e contém cerca de 5 a 20% do DNA celular total. O DNA do cinetoplasto, chamado de kDNA, é uma grande rede de milhares de cópias similares de minicírculos, que variam em tamanho de 0,5 a 2,5 kb, e de algumas dezenas de cópias de maxicírculos, que variam de 20 a 40 kb. O DNA do minicírculo codifica pequenos RNAs-guia que editam os transcritos do maxicírculo inserindo ou deletando uridilato em sua sequência. O kDNA do maxicírculo codifica RNAs ribossomais e algumas proteínas mitocondriais envolvidas no complexo respiratório, da mesma forma que o DNA mitocondrial de outros eucariotos (revisado em Docampo *et al*, 2005; de Souza, 2009).

Nas regiões endêmicas da doença de Chagas, a principal forma de transmissão para humanos se dá pelo contato com as fezes contaminadas de triatomíneos durante o repasto sanguíneo destes insetos. Os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos países do Pacto Andino e partes da América Central, e *Triatoma dimidiata* e *Triatoma barberi* no México (Rassi Jr *et al*, 2012). A transmissão da doença também pode ocorrer via transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos infectados, transmissão congênita (de mãe portadora para feto), pela rota oral via ingestão de alimentos contaminados com as fezes do vetor e por acidentes laboratoriais (Casadei, 2010).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, no qual formas com morfologia e funções biológicas diferentes se alternam (Figura 2). Um triatomíneo infectado contém *T. cruzi* tripomastigota metacíclico na porção final de seu intestino. Enquanto se alimenta de sangue humano (ciclo doméstico) ou de outros animais (ciclo silvestre) o inseto defeca, liberando os parasitos, que penetram no local da picada ou em mucosa íntegra. Uma vez dentro das células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se dividem várias vezes por fissão binária, se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula infectada. Os parasitos tripomastigotas liberados podem infectar células vizinhas ou ir para a corrente sanguínea e infectar outros tecidos do corpo. Quando um triatomíneo vai se alimentar de sangue novamente, ingere os parasitos tripomastigotas sanguíneos. No intestino médio, estes parasitos se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam e se diferenciam tripomastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo (revisado em Chatelain, 2014).

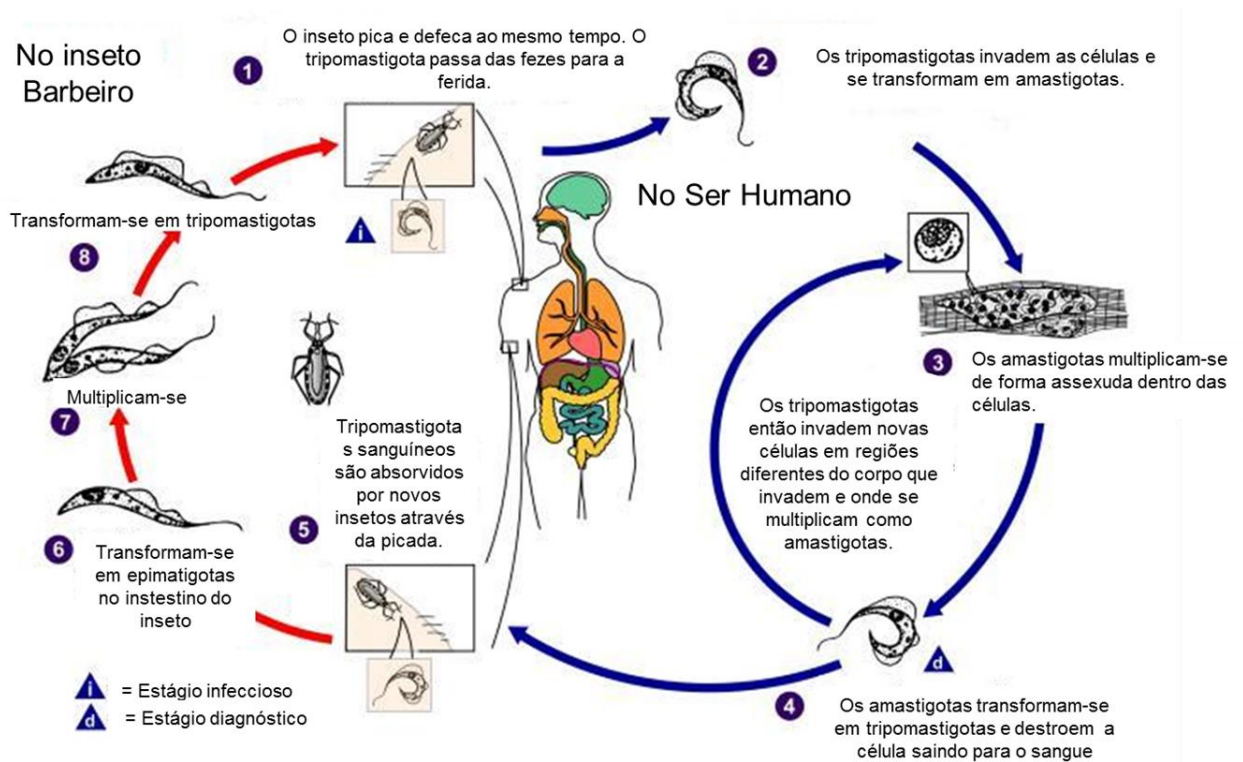


Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Esquema mostrando as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro deposita as fezes na pele do homem que se infecta com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após invadir as células, se transformam em amastigotas e se multiplicam. Em seguida, se transformam em tripomastigotas, caindo na corrente sanguínea, onde podem ser passados novamente para o barbeiro através de uma nova picada. Dentro do triatomíneo, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigotas. Adaptado de CDC – Center for Disease Control and Prevention (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Clinicamente, a doença de Chagas em humanos possui duas fases distintas, a aguda e a crônica. A fase aguda se inicia imediatamente após a infecção e é caracterizada por uma intensa reação inflamatória no ponto de entrada do parasito, originando o chagoma de infecção ou o sinal de Romana. Geralmente, essa fase é assintomática, mas alguns pacientes apresentam sintomas como febre, mialgias, mal-estar, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dificuldade em respirar, inchaço e sudorese. Na fase aguda, existe uma grande quantidade de parasitos circulantes no sangue, o que permite sua detecção por microscopia ou PCR (reação em cadeia da polimerase). Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica, na qual a parasitemia diminui e só é possível detectar a presença de *T. cruzi* por métodos sorológicos, como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Nessa fase, muitos pacientes infectados não apresentam sinais físicos ou evidências clínicas de lesão a qualquer órgão, o que constitui a fase crônica indeterminada, que pode permanecer indefinidamente. Cerca de 40% dos pacientes desenvolverão a forma crônica sintomática, caracterizada pelo comprometimento de alguns órgãos, principalmente o coração (forma cardíaca), o sistema digestivo (forma digestiva) ou ambos (forma mista) (revisado em Biolo *et al*, 2010).

Os fatores envolvidos na diversidade clínica observada na doença de Chagas ainda não estão completamente elucidados. Contudo, sabe-se que aspectos ambientais, imunológicos e genéticos do hospedeiro, bem como a diversidade genética do parasito, são importantes para essa variedade de sintomas. A diversidade genética em *T. cruzi* é perceptível pelo fato de que diferentes grupos desse parasito apresentam diferenças na taxa de crescimento, constituição antigênica, patogenicidade, suscetibilidade à droga, número e tamanho de cromossomos e conteúdo do DNA, além de variação em seu aspecto morfológico (Macedo *et al*, 2002; Buscaglia e Di Noia, 2003; Macedo *et al*, 2004).

A reprodução do *T. cruzi* ocorre, principalmente, de forma assexuada por meio de fissão binária. Uma vez que a recombinação é um evento raro, esse parasito pode ser definido como uma espécie clonal. O termo unidade discreta de tipagem (DTU) foi proposto para descrever conjuntos de unidades populacionais que são geneticamente mais semelhantes entre si do que entre outras populações, e que podem ser identificadas por meio de marcadores moleculares. Nesse contexto, os grupos

genéticos de *T. cruzi* podem ser tipados com base nesta definição (revisado por Zingales *et al*, 2012). Os primeiros estudos genéticos sugeriram a existência de duas principais linhagens em *T. cruzi*: a TcI e a TcII (Momen, 1999). Pesquisas posteriores, utilizando marcadores moleculares presentes no DNA mitocondrial e nuclear, indicaram a existência de uma terceira linhagem denominada TcIII (Robello *et al*, 2000; Machado e Ayala, 2001; Augusto-Pinto *et al*, 2003; de Freitas *et al*, 2006). A partir do uso das técnicas de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), Brisse e colaboradores (2000) confirmaram a existência de duas linhagens maiores, mas verificaram que a linhagem 2 se dividia em cinco agrupamentos filogenéticos: TcIIa-TcIIe (Brisse *et al*, 2000a; Brisse *et al*, 2000b; Brisse *et al*, 2001). Com a finalidade de unificar a nomenclatura do *T. cruzi*, foi definido que as linhagens do parasito seriam divididas em seis DTUs, designadas de TcI a TcVI (Tabela1). Nessa nova classificação, as DTUs TcV e TcVI se referem às cepas híbridas (Zingales *et al*, 2009).

Tabela 1: Nova nomenclatura do *Trypanossoma cruzi*

DTU	Abreviação	Equivalência nas classificações antigas	Exemplo
<i>T. cruzi</i> I	TcI	TcI ^a	Dm28c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	TcIIa ^a	Esmeraldo
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	TcIIc ^a , TcIII ^b	CM17
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	TcIIa ^a	CanIII cl1
<i>T. cruzi</i> V	TcV	TcIIId ^a	Bug2148 cl1
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	TcIIe ^a	CL Brener

DTU: Unidade discreta de tipagem; a: Brisse *et al*, 2000; b: Freitas *et al*, 2006. Baseada em Zingales *et al*, 2009.

A linhagem CL Brener é um clone da linhagem CL isolada de um *T. infestans*, que é um vetor estritamente doméstico no Brasil (Brener e Chiari, 1963). O *T. cruzi* CL Brener é classificado como TcVI, que é uma cepa híbrida originada a partir dos ancestrais TcII e TcIII. Por ser uma linhagem bem caracterizada experimentalmente, CL Brener foi escolhida para ter seu genoma sequenciado (El-Sayed *et al*, 2005).

1.2. As vias de reparo de DNA

A molécula de DNA está constantemente exposta a danos causados por agentes endógenos e exógenos. A luz ultravioleta, a radiação ionizante e vários compostos químicos genotóxicos, bem como subprodutos do metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio provenientes da respiração oxidativa, ameaçam a integridade do DNA (Yao e Dai, 2014). Além disso, algumas ligações químicas do DNA são rompidas espontaneamente, em condições fisiológicas, gerando sítios abásicos ou mesmo alterando a natureza das bases nitrogenadas (Hoeijmakers, 2001). Os erros que ocorrem durante o metabolismo normal do DNA representam outra fonte de lesão. Os danos no DNA podem gerar mutações durante a replicação da molécula ou mesmo bloquear este processo, e também a transcrição, resultando em parada do ciclo celular, senescência e morte da célula. Assim, o reparo do DNA lesionado é essencial para a manutenção da estabilidade genômica e a sobrevivência celular. Durante a evolução, as células desenvolveram um conjunto de mecanismos de resposta às lesões no DNA que são bastante conservados (de Boer, 2002) (Figura 3).

No sistema de reparo direto uma única enzima é capaz de reverter o dano, removendo adutos covalentes na molécula de DNA sem causar quebras na dupla fita. As duas principais lesões causadas pela radiação ultravioleta são os dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e os 6,4 - fotoprodutos (6-4 PP). A fotorreativação é um exemplo de reversão direta destes danos, no qual a enzima fotoliase utiliza a energia luminosa para romper a ligação covalente que une as duas pirimidinas adjacentes. Outro exemplo de reparo direto é a remoção do grupo metil presente na O⁶-metilguanina por metil-transferases. Esta base modificada é mutagênica e carcinogênica, pois é capaz de parear erroneamente com a timina, causando transições G:C para A:T durante a replicação do DNA (Yi e He, 2013).

Durante a replicação do DNA, dependendo da fidelidade da DNA polimerase, pode ocorrer a incorporação errada de nucleotídeos, o que gera mau pareamento entre as bases ou a formação de alças de inserção/deleção (IDL). O reparo de erro de pareamento (MMR, em inglês *mismatch repair*) é responsável pela correção desse tipo de lesão no DNA. Esta é uma via bem conservada desde bactérias a mamíferos. As proteínas MutS e MutL de *Escherichia coli* desempenham papel chave nessa via.

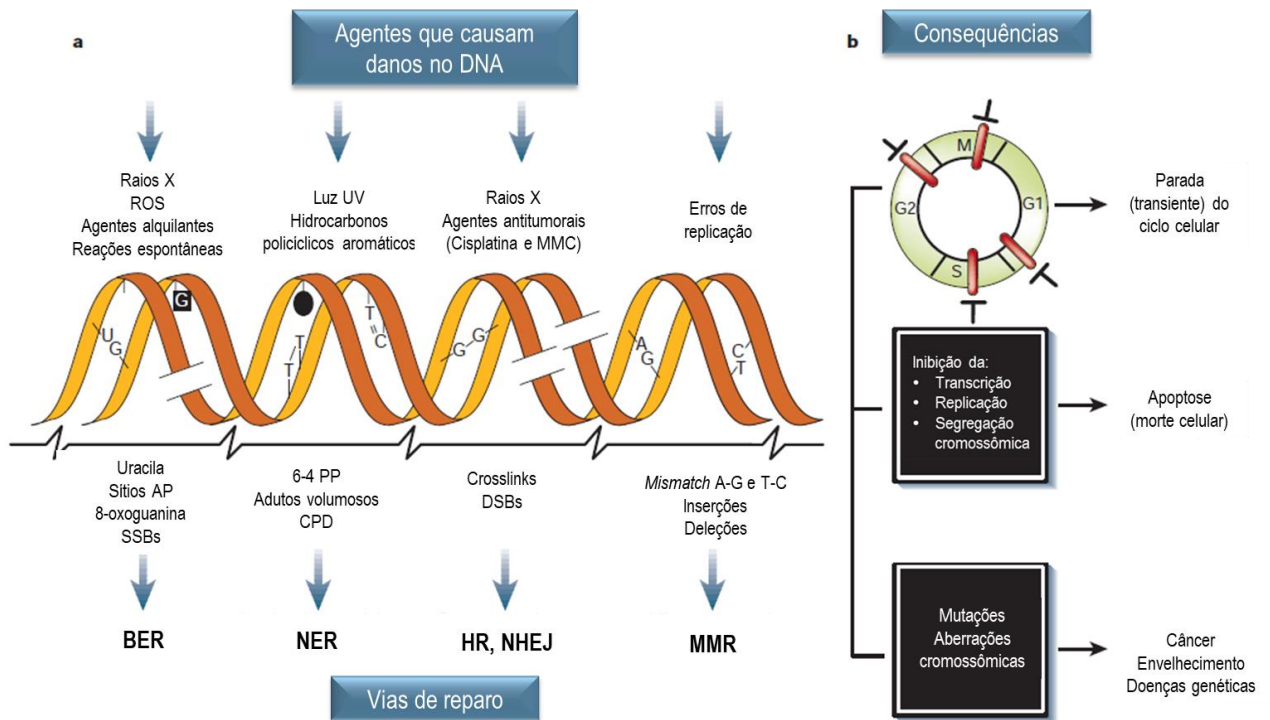


Figura 3: Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências. A) Exemplos de agentes que causam danos no DNA (porção superior), algumas lesões geradas por estes agentes (porção média) e mecanismos de reparo mais relevantes responsáveis por sua remoção ou correção (porção inferior). B) Porção superior: efeitos agudos de danos no DNA na progressão do ciclo celular, que resultam em atraso nas fases G1, S, G2 ou M. Porção média: efeitos agudos no metabolismo de DNA, que resultam em morte celular. Porção inferior: consequências ao longo prazo de injúrias no DNA, que incluem modificações permanentes na sequência de DNA (mutações de ponto, que afetam genes individuais, ou aberrações cromossômicas, que envolvem largas porções do cromossomo e podem afetar múltiplos genes) e seus efeitos biológicos. Abreviações: MMC, mitomicina C; 6-4 PP e CPD, 6,4 - fotoproducto e dímero de ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). Adaptado de Hoeijmakers, 2001.

Em eucariotos, os homólogos são as proteínas MSH e MLH/PMS, respectivamente (Li, 2008).

Os danos causados pelo metabolismo celular são reparados pela via de reparo por excisão de bases (BER, em inglês *base excision repair*). Bases modificadas por desaminação, metilação, hidroxilação ou oxidação são removidas por DNA glicosilases específicas, pela hidrólise da ligação glicosídica. O sítio abásico (sítio AP) gerado é removido por endonucleases. Em seguida, ocorre a síntese e a ligação do DNA. Quando a substituição de um sítio AP resulta na incorporação de único nucleotídeo, a via é chamada de *short-patch* BER. No entanto, quando pelo menos dois nucleotídeos são sintetizados pelas polimerases de reparo, temos o *long-patch* BER (Patrono *et al*, 2014).

Levando em consideração o tipo de lesão reconhecida, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, em inglês *nucleotide excision repair*) pode ser considerado o mais versátil de todos os sistemas de reparo (Hoeijmakers, 2001). Essa via é responsável pela correção de lesões que causam distorções na hélice de DNA, interferindo no pareamento de bases e obstruindo a replicação e a transcrição. Normalmente, lesões causadas por fontes exógenas, como a luz UV e agentes intercalantes, são reparados por esse sistema. As distorções na estrutura do DNA desencadeiam uma série de eventos que levam à remoção de um pequeno segmento de nucleotídeos, que contém a lesão. A lacuna originada é preenchida pela DNA polimerase e enzimas ligase específicas restauram a integridade da molécula de DNA. A via de reparo do NER pode ser subdividida em duas vias, a de reparo global do genoma (GGR, em inglês *genome global repair*) e a de reparo acoplado à transcrição (TCR, em inglês *transcription coupled repair*). O GGR-NER examina todo genoma em busca de danos, enquanto o TCR-NER é ativado quando uma lesão se localiza em um gene que está sendo transcrito, garantindo que genes ativos tenham prioridade para serem reparados que o resto do genoma (Nospikel, 2009).

Radiação ionizante, raios X, radicais livres, alguns compostos químicos e a replicação de uma molécula de DNA com quebra de fita simples (SSB, em inglês *DNA single strand break*) podem gerar quebras de fita dupla no DNA (DSB, em inglês *DNA double strand break*). Esse tipo de lesão é reparado pelo sistema de reparo de quebras de fita dupla do DNA (DSBR, em inglês *DNA double strand break repair*). Nele existem

duas vias principais: a recombinação homóloga (HR, em inglês *homologous recombination*) e a junção das extremidades não homólogas (NHEJ, em inglês *nonhomologous end joining*). Na NHEJ, que ocorre principalmente na fase G1 do ciclo celular, as duas extremidades quebradas do DNA são diretamente unidas sem o uso de moldes. Dessa forma, essa via de reparo é propensa a erros. Já a HR ocorre durante as fases S e G2, quando a cromátide irmã está presente. Neste processo, a cromátide irmã intacta é usada como molde para troca de informação com a fita danificada. Uma vez que o reparo por HR é dependente de homologia na sequência de DNA, esta via é livre de erros (Iyama e Wilson III, 2013).

Todas essas vias de reparo atuam de forma interligada, a fim de preservar a informação genética da célula. A importância desses mecanismos de reparo de DNA é notada pelo fato de que defeitos em qualquer desses sistemas pode levar a mutações e/ou morte celular (Hoeijmakers, 2001; de Boer, 2002).

O sequenciamento do genoma de *T. cruzi* revelou que esse parasito possui muitos dos genes que codificam para as enzimas envolvidas nas principais vias de reparo. Uma exceção é a NHEJ, que parece estar ausente nessa célula (El-Sayed *et al.*, 2005).

1.3. A resposta ao dano de DNA

Os organismos eucarióticos têm criado uma série de mecanismos para mitigar os efeitos deletérios do dano de DNA. Ao longo do ciclo celular existem pontos de verificação (*checkpoints*) que permitem a célula averiguar a integridade do seu material genético. Assim, complexos sistemas de vigilância monitoram continuamente o genoma procurando por uma ampla variedade de lesões. A detecção desses danos ou a incorreta segregação dos cromossomos leva à ativação dos *checkpoints* de danos de DNA (Hartwell e Weinert, 1989). Isto inicia a chamada resposta ao dano de DNA (DDR, em inglês *DNA damage response*), que é um mecanismo coordenado de sinalização do dano, no qual a detecção da lesão leva a parada da progressão do ciclo celular e o recrutamento da maquinaria de reparo, a fim de permitir a reversão do dano. Quando o DNA é completamente reparado, as células retomam a progressão do ciclo celular. Caso contrário, as células entram em um estado de senescência ou ativam a via de morte celular programada, a apoptose (Serrano e D'Amours, 2014).

A DDR pode ser considerada uma via de transdução de sinal que possui uma hierarquia bem definida, onde seus componentes são classificados em sensores, transdutores, mediadores e efetores (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012). Os sensores são as proteínas responsáveis pela detecção da lesão. Estas proteínas são necessárias para a transmissão do sinal para os transdutores. Estes, por sua vez, diversificam e amplificam o sinal da lesão para os mediadores, que recrutam as proteínas efetoras. As proteínas efetoras são responsáveis pelo controle de processos e vias celulares (Harper e Elledge, 2007; Derks *et al*, 2014). Esta via de sinalização é mediada por interações e alterações na atividade proteica via modificações pós-traducionais, como a fosforilação (Derks *et al*, 2014). Dessa forma, a ativação destas proteínas inicia uma cascata de fosforilação que leva à parada do ciclo celular e ao recrutamento das enzimas de reparo (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012).

Para uma adequada proteção do genoma, se faz necessário que todos os tipos de alterações estruturais no DNA sejam detectados, incluindo quebras, lacunas, DSBs e todas as alterações que geram o bloqueio da replicação do DNA (Harper e Elledge, 2007). Os principais transdutores da DDR são as cinases ATM e ATR, que são membros da família das proteínas cinases relacionadas a cinase 3-fosfatidilinositol (família PIKK). Estes transdutores são ativados por tipos diferentes de lesões: ATM é o mediador fisiológico da resposta a formação de DSB, enquanto ATR responde a SSB (Srivastava *et al*, 2009). Apesar desta diferença e de possuírem alguns substratos e funções específicas, a resposta desencadeada por estas duas cinases é, frequentemente, interligada (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012).

Os mecanismos envolvidos na detecção de quebras no DNA pelas células eucarióticas ainda não estão completamente elucidados, mas acredita-se que na presença de DSB o complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) atua como um sensor para a ATM, recrutando-a para a região de DNA quebrado (Figura 4). Em condições basais, a ATM existe na forma de dímeros inativos que, em resposta à DSB, se dissociam e se ativam, por meio de auto fosforilação. O complexo MRN também contribui para a fosforilação e ativação da ATM (Bakkenist e Kastan, 2003). A ativação da cinase transdutora ATM gera uma cadeia de fosforilação que leva ao recrutamento dos fatores envolvidos no reparo por recombinação homóloga (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012).

O DNA de fita simples (ssDNA, em inglês *single strand DNA*) pode surgir a partir de DSBs persistentes e, principalmente, de forquilhas de replicação paradas. Isso ocorre, pois apesar de a DNA polimerase ter interrompido seu movimento, a helicase replicativa continua desenrolando a dupla hélice a frente da forquilha. Essas regiões de ssDNA, geradas diretamente sobre dano de DNA ou após o seu processamento, são imediatamente recobertas pela proteína de replicação A (RPA) (Marechal e Zou, 2015). A presença dessa estrutura funciona como um sensor para a cinase ATR, estimulando seu recrutamento para a lesão, o que permite a sua ativação (Figura 5). A ATR forma um complexo com a proteína ATRIP (proteína de interação com ATR), que é ligada por RPA ao ssDNA e, assim, carrega a cinase para o sítio de lesão (Zou e Elledge, 2003).

RPA também interage com Rad17, trazendo-o para o DNA danificado. Rad17 existe em um complexo com quatro pequenas subunidades do fator de replicação C (RFC-2, RFC-3, RFC-4, e RFC-5), similar ao complexo responsável pelo carregamento do grampo PCNA durante a replicação do DNA. Por sua vez, Rad17-RFC é responsável pelo recrutamento do complexo 9-1-1 (Rauen *et al*, 2000; Majka e Burgers, 2003). O complexo heterotrimérico 9-1-1, formado pelas proteínas Rad9, Rad1 e Hus1, é homólogo ao complexo homotrimérico PCNA, incluindo a sua estrutura em forma de anel (Doré *et al*, 2009). Além de recrutar o complexo 9-1-1, Rad17-RFC tem a função de abrir o grampo para que ele possa envolver a fita de DNA (Rauen *et al*, 2000; Ellison e Stillman, 2003).

O complexo 9-1-1 é essencial para recrutar e posicionar o ativador alostérico TopBP1. Rad9 possui uma cauda C-terminal que não está envolvida na interação com Rad1 e Hus1 para formar o grampo (Rauen *et al*, 2000). Essa cauda possui múltiplos sítios de fosforilação (Roos-Mattjus *et al*, 2003). Já a proteína TopBP1 contém oito domínios BRCA1 na sua porção C-terminal, chamados de domínios BRCT (Manke *et al*, 2003; Yu *et al*, 2003). Quando fosforilada, a cauda de Rad9 liga-se aos domínios BRCT de TopBP1, trazendo-o para a região de dano. Assim, o papel do complexo 9-1-1 é aproximar TopBP1 de ATR-ATRIP, promovendo a sua ativação (Delacroix *et al*, 2007; Mordes *et al*, 2008).

Apesar dos numerosos substratos fosforilados pela ATR ativa, destaca-se a fosforilação e ativação da cinase efetora Chk1. Por sua vez, a Chk1 fosforila e inativa

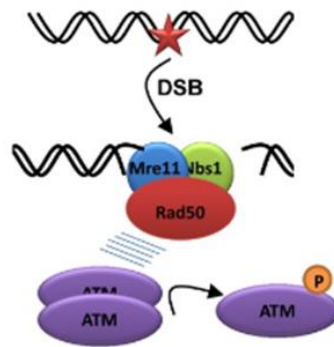


Figura 4: Ativação da ATM. DSBs (asterisco vermelho) são detectadas pelo complexo MRN, que atrai ATM para a região da quebra. A ATM existe na forma de dímeros inativos que, em resposta à DSB, se dissociam e se ativam, por meio de auto fosforilação. O complexo MRN também contribui para a ativação de ATR. Retirado de Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012.

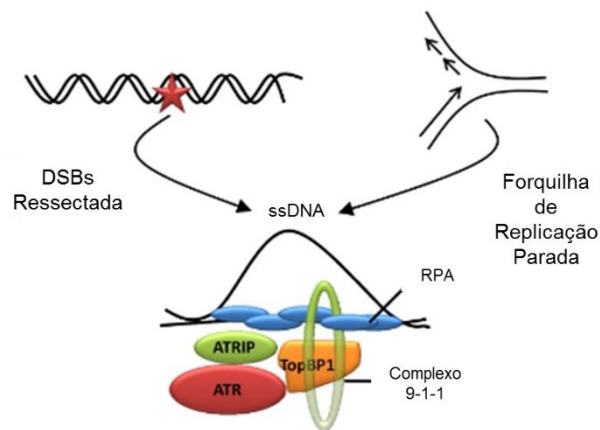


Figura 5: Ativação da ATR. O substrato para a ativação de ATR é ssDNA, que pode derivar a partir de DSB ressectada (esquerda), ou a partir de forquilha de replicação paradas (direita). O ssDNA recoberto com RPA recruta os complexos ATRIP-ATR e 9-1-1, o que aproxima ATR e seu ativador alostérico TopBP1. Adaptado de Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012.

a Cdc25, o que promove o *checkpoint* de replicação e previne a progressão do ciclo celular (Sancar *et al*, 2004). É importante ressaltar que o mecanismo de ativação de ATR aqui descrito é conservado entre os eucariotos, desde as leveduras até os humanos (Mordes *et al*, 2008).

1.4. Hus1 e o estresse replicativo

Barreiras para a replicação causam uma diminuição ou parada da progressão da forquilha, o que é definido como estresse replicativo (Mazouzi *et al*, 2014). Muitos são os fatores que podem gerar esse tipo de estresse. Entre eles, os mais comuns são lesões de DNA não reparadas, que constituem uma barreira física para a progressão das forquilhas de replicação. Além disso, a incorporação errônea de rNTPs no lugar de dNTPs também causa a parada das polimerases replicativas. Outro fator que pode retardar a velocidade da forquilha de replicação é a ausência ou quantidades limitadas de nucleotídeos, componentes da maquinaria de replicação e/ou histonas. A presença de sequências repetitivas no DNA também pode ser uma fonte de estresse replicativo, pois essas regiões tendem a formar estruturas secundárias (*hairpins*, por exemplo) o que impede a passagem da forquilha. A compactação da cromatina afeta a acessibilidade do DNA, o que pode atrasar o movimento das forquilhas (Zeman e Cimprich, 2014).

Tanto a replicação quanto a transcrição operam utilizando moldes de DNA, de modo que colisões entre essas duas maquinarias ou mesmo a tensão topológica gerada por esses processos induzem o estresse replicativo. Além disso, certas regiões gênicas, chamadas de sítios frágeis, são propensas à geração de DSBs quando replicadas ou transcritas, contribuindo para o estresse replicativo. Durante a síntese de RNA, a perda de componentes do processamento dessa molécula pode retardar a taxa de transcrição ou impedir a dissociação do complexo de transcrição do DNA. Isso pode gerar híbridos de DNA-RNA, devido ao pareamento entre o transcrito nascente e o DNA atrás do complexo de transcrição, o que interfere com a replicação do DNA. A superexpressão ou ativação constitutiva de oncogenes é uma fonte emergente de estresse replicativo, pois os oncogenes promovem o aumento da iniciação da replicação, o que pode levar ao esgotamento dos grupos de nucleotídeos e/ou aumento de colisões com complexos de transcrição (Zeman e Cimprich, 2014).

A proteína Hus1, como mencionado no tópico anterior, faz parte do complexo heterotrimérico 9-1-1, juntamente com as proteínas Rad9 e Rad1. Esse complexo é essencial para a ativação da via de ATR, que é a principal forma de resposta ao estresse replicativo. Análises de bioinformática sugeriam que esse complexo teria uma estrutura em forma de anel, homóloga ao grampo PCNA (Venclovas e Thelen, 2000). A determinação da estrutura cristalina da Rad9-Rad1-Hus1 humana (Doré *et al*, 2009) mostrou que, como previamente proposto, o complexo apresenta uma arquitetura em forma de anel fechado, no qual o furo elíptico tem tamanho suficiente para permitir a passagem de um duplex de DNA, similar ao PCNA (Figura 6).

Os dados gerados pela estrutura cristalina também revelaram que existe uma significativa diferença entre as subunidades em termo de suas interações entre si e com outras proteínas ligantes, sugerindo uma especialização funcional entre Rad9, Rad1 e Hus1. Um exemplo é a interação do grampo 9-1-1 com o seu carregador Rad17-RFC. Considerando que o mecanismo desse carregamento seja o mesmo do carregamento de PCNA por RFC, a estrutura cristalina indica que enquanto Hus1 e Rad9 interagem com Rfc3 e Rfc5, Rad1 interage diretamente com Rad17. Assim, a interface Rad1-Rad9 seria o ponto de quebra no anel para permitir que o complexo envolva o DNA (Doré *et al*, 2009).

Nunes e colaboradores (2011) testaram os efeitos da superexpressão do homólogo de Hus1 em *Leishmania major* e verificaram um aumento da resistência desse protozoário a agentes genotóxicos que causam parada da forquilha de replicação. Isso sugere que o gene Hus1 em *L. major* está associado com o aumento da capacidade deste parasito em lidar com o estresse replicativo, indicando que LmHus1 apresenta a mesma função que em eucariotos superiores.

Dados do nosso grupo de pesquisa tem mostrado que o *T. cruzi* é muito eficiente em responder a agentes genotóxicos que causam DSBs (Regis-da-Silva *et al*, 2006; Passos-Silva, 2010). Contudo, a maneira como esse parasito lida com o estresse replicativo ainda não está elucidada. Dessa maneira, o estudo do gene TcHus1 poderia permitir uma melhor compreensão do papel, em *T. cruzi*, dessa via importante para a manutenção da estabilidade genômica.

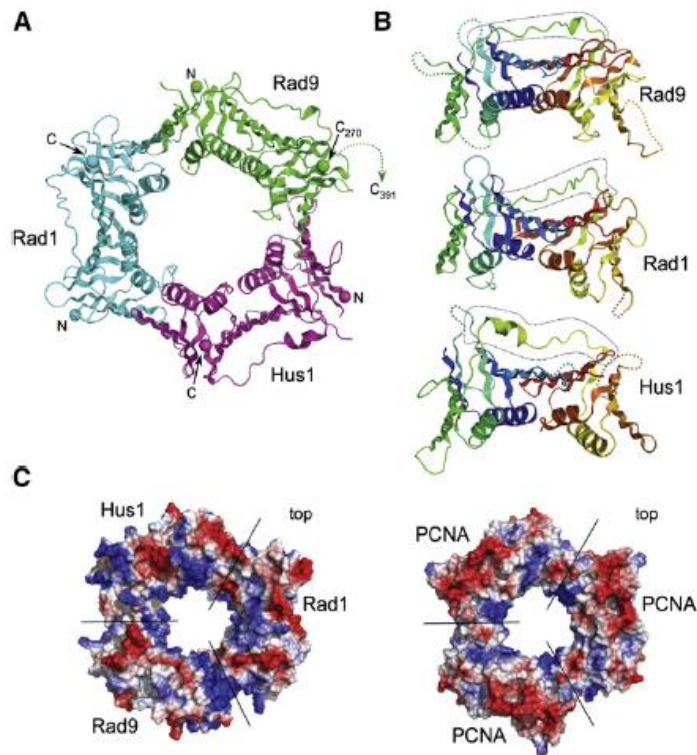


Figura 6: Estrutura do complexo 9-1-1. A) Desenho da estrutura secundária do anel 9-1-1, no qual Rad9 está em verde, Rad1 em ciano e Hus1 em roxo. Os resíduos N- e C-terminais visíveis de cada cadeia são marcados por uma esfera. O C-terminal de Rad9 é seguido por uma cauda C-terminal desestruturada de cerca de 120 resíduos, que foi omitida da construção de Rad9 utilizada para cristalografia. B) Estruturas das subunidades Rad9, Rad1 e Hus1, de cima para baixo, estão coloridas de azul para vermelho do N- para C-terminal. Embora todas as três subunidades tenham um enovelamento global semelhante, existem diferenças substanciais. Segmentos tracejados indicam laços desordenados. C) Superfícies eletrostáticas de 9-1-1 (esquerda) e PCNA (direita). Ambos os grampos têm regiões de forte potencial positivo (azul) em torno do canal central através do qual passa o DNA. Retirado de Doré *et al*, 2009.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a importância do gene TcHus1 na resposta ao estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Construir uma linhagem de *T. cruzi* CL Brener na forma epimastigota que superexpresse o gene TcHus1;
- Avaliar o crescimento da linhagem transfectada, em relação a linhagem selvagem, na presença de agentes genotóxicos que causam estresse replicativo;
- Avaliar o nível de transcritos de TcHus1 após o tratamento com o agente alquilante metil metano sulfonato (MMS) nas linhagens transfectada e selvagem;
- Avaliar o efeito do tratamento com agentes genotóxicos na progressão do ciclo celular em *T. cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células utilizadas e condições de cultivo

Nas etapas iniciais de clonagem foi utilizada a linhagem *Escherichia coli* XL1-Blue (genótipo: *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*). O meio *Circlegrow* (CG – MP Biomedicals) foi usado para cultivo bacteriano a 37°C e para o estoque das culturas a -80°C, mediante acréscimo de 25% de glicerol. Em todas as outras etapas desse estudo, foram utilizadas formas epimastigotas da cepa CL Brener de *Trypanossoma cruzi*. O meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) foi usado para cultivo celular a 28°C.

3.2. Iniciadores

Com base na sequência do gene Hus1 de *T. cruzi* da cepa CL Brener disponível no banco de dados (TritypDB: TcCLB.466823.10), iniciadores foram desenhados (Tabela 2). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT Technologies e diluídos em água destilada estéril para a concentração de estoque de 200 mM.

Tabela 2: Iniciadores usados neste trabalho. Os sítios de restrição presentes nos iniciadores estão sublinhados.

Iniciadores	Sequência	Tamanho do Amplicon	(T _m)	Finalidade
<i>Hus1FXbaI</i>	5' <u>TCTAGAATGAAGTTCAAGGCCACTG</u> 3'	915 pb	56,7°C	Superexpressor Hus1
<i>Hus1RSaI</i>	5' <u>GTCGACTTATTGCTCCACGGCAG</u> 3'		60,1°C	Superexpressor Hus1
<i>Hus1FRT</i>	5' GAGGGTGACAATGACGCCG 3'	108 pb	58,7°C	RT- qPCR
<i>Hus1RRT</i>	5' CTCCACCGACACTGAGGC 3'		58,1°C	RT- qPCR

3.3. Reação em Cadeia da Polimerase

Para a extração de DNA genômico, cerca de 1×10^7 células epimastigotas selvagens da cepa CL Brener de *T. cruzi*, após serem lavadas com PBS, foram lisadas utilizando a solução de Madisen (0,2% SDS, 1,0 M NaCl, 40,0 mM EDTA e 100 μM Tris-HCl pH 8,0). Em seguida, as células foram submetidas à lise mecânica, utilizando esferas de vidro, sob agitação constante por 25 minutos. Então, a amostra foi aquecida a 95°C durante 10 minutos e centrifugada por 1 minuto a 16000 g. O sobrenadante foi

transferido para um tubo novo. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 500 µL de isopropanol 100% gelado e 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 à amostra, que foi homogeneizada por inversão e incubada por 16 horas a -20°C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 16000 g, a 4°C por 15 minutos. O sedimento obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 16000 g, por 10 minutos, a 4°C. A solução foi removida por inversão e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água destilada.

As reações de amplificação foram preparadas com 0,25 µM dos iniciadores Hus1FXbal e Hus1RSall (Tabela 2), juntamente com 100 ng do DNA molde, 2 µL de tampão de amplificação 10X, 1,25 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen), totalizando um volume final de 20 µL. As condições de amplificação para esse conjunto de iniciadores consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose TAE 1% contendo SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen). As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat.

3.4. Clonagem do gene Hus1 em vetor de clonagem

O produto de PCR da reação descrita no item 3.3 foi ligado no vetor pGEM T-Easy (Promega) (Anexo 1). Para tal, foi preparada uma reação contendo 5 µL do tampão de ligação 2X, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor pGEM e 3 µL do produto de PCR. A reação foi mantida a 4°C *overnight*.

Para obtenção de bactérias *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes, 500 mL de cultura com OD_{600nm} foi centrifugada a 2500 g por 25 minutos a 4°C e lavada três vezes com volumes variados (500 mL, 250 mL e 20 mL) de glicerol 10% gelado. As células foram solubilizadas em 1 mL de glicerol 10% gelado e armazenadas em alíquotas de 40 µL de cultura a -80°C.

Para a transformação, uma alíquota de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente foi incubada com 3 µL da reação de ligação por 5 minutos no gelo. Em seguida, a alíquota foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) e eletroporada a 2,5 kV, em um eletroporador MicroPulser (Bio-Rad). Imediatamente após a eletroporação, foi

adicionado 500 µL de meio CG e mantido por 45 minutos a 37°C e 180 rpm. Em seguida, 100 µL da cultura foi plaqueada em meio CG sólido contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubada a 37°C *overnight*.

Para seleção dos clones positivos foi realizada uma PCR de colônia. Para tal, colônias foram dissolvidas em 50 µL de água destilada estéril e fervidas por 10 minutos. Três µL dessa solução foram utilizados como amostra de DNA na reação de PCR descrita no item 3.3.

Os clones positivos para a PCR de colônia foram crescidos em 10 mL de meio CG líquido com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi realizada com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

3.5. Clonagem do gene Hus1 em vetor de expressão

Os plasmídeos contendo o inserto foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Sa*II (Fermentas). Assim, 20 µL do plasmídeo foram incubados com 1,5 µL da enzima *Xba*I, 3 µL do tampão tango 10X e 4 µL de água por 2 horas a 37°C. Logo após, foram adicionados 1,5 µL da enzima *Sa*II e a incubação foi repetida. Os fragmentos liberados foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A ligação ao vetor pROCKhigro (DaRocha *et al*, 2004) (Anexo 2), previamente digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I (Fermentas) e também purificado, foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e seu tampão 2X (Fermentas). A reação de ligação foi preparada levando em conta a seguinte proporção:

$$\text{quantidade do inserto (ng)} = \frac{\text{quantidade do vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)} \times 3}{\text{tamanho do vetor (pb)}}$$

As reações de ligação foram incubadas a 4°C *overnight*. Como descrito no item anterior, o produto de ligação foi utilizado para transformar células *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes. Os clones positivos foram selecionados por meio de PCR de

colônia e tiveram seu DNA plasmidial extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

3.6. Sequenciamento de DNA e análise por bioinformática

Os plasmídeos obtidos, descritos no item anterior, foram encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG) e as sequências geradas foram analisadas no *software* DNA Baser v4 (disponível em: <http://www.dnabaser.com>).

A sequência do gene Hus1 clonado foi utilizada em algumas análises de bioinformática, realizadas pelo Dr. Rodrigo de Paula Baptista e pelos alunos de pós-graduação Mainá Bitar (Bioinformática/UFMG) e Bruno Marçal Repolês (Genética/UFMG).

Para verificar o número de cópias do gene Hus1 presentes no genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*, foram alinhadas as *reads* disponíveis de CL Brener contra o genoma referência dessa cepa utilizando o *software* Bowtie2 (PMID: 22388286). O resultado obtido foi tratado e ordenado usando o pacote Samtools (PMID: 19505943), permitindo rodar um *script* em *perl in house* do Laboratório de Imunologia e Genética de Parasitos (ICB/UFMG), que calcula a cobertura média de *reads* por posição nucleotídica do genoma. Com o BLAST do gene alvo contra o genoma referência é possível selecionar a posição do genoma que será analisada. Calibrando os resultados com genes sabidamente de cópia única, determina-se que a cobertura média do genoma de CL Brener montado foi de aproximadamente 15x para genes de cópia única, 30x para duas cópias, 45x para três cópias e assim por diante. Após a determinação do número total de cópias do gene Hus1 em CL Brener, deu-se a análise de polimorfismos (SNP, em inglês *Single Nucleotide Polimorphism*) utilizando os programas *Mpileup* e *Bcftools* do pacote Samtools a fim de averiguar o grau de conservação e quais os principais pontos e tipos de mutação ao longo do gene.

Outra análise de bioinformática foi a predição da estrutura tridimensional da proteína Hus1 clonada. As sequências dos genes TcHus1 (TcCLB.466823.10) e LmHus1 (LmjF.23.0290) foram recuperadas do banco de dados de tripanossomatídeos (disponível em <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Através do programa BLAST, utilizando o algoritmo blastp, contra a base de dados RSCB *Protein Data*

Bank, foram recuperadas estruturas depositadas que poderiam ser utilizadas como modelos para a geração das estruturas de Hus1. A melhor estrutura, escolhida a partir da identidade com a sequência desejada, foi utilizada como modelo para a geração das estruturas tridimensionais previstas a partir do programa MODELLER 9.13, que permite a geração de modelos a partir de homologia e restrições espaciais. Para cada sequência analisada (Hus1 clonada, TcHus1 e LmHus1 depositadas) foram gerados 1000 modelos com o programa MODELLER 9.13, utilizando o algoritmo para modelagem por homologia. Os melhores modelos foram escolhidos a partir dos valores de DOPE e GA341 gerados pelo próprio programa. A validação dos modelos gerados se deu a partir do uso do programa PROCHECK4, onde modelos com PROCHECK Score acima de 80% são considerados como válidos. Então, as imagens geradas foram sobrepostas e tratadas com o programa ICM Browser (MolSOFT) para destacar os polimorfismos e as semelhanças estruturais.

3.7. Transfecção de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O primeiro passo na etapa de transfecção foi linearizar, com a enzima *NotI*, 100 µg do vetor pROCKhigro contendo o inserto de interesse. Em seguida, o DNA foi precipitado com isopropanol e solubilizado em 50 µL de água milliQ estéril. A transfecção dos plasmídeos foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Para tal, parasitos selvagens em fase exponencial de crescimento foram lavados e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8,0, e 5 mM MgCl₂) a uma concentração final de 1x10⁸ células.mL⁻¹. Em uma cubeta de eletroporação Gene Pulser de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de DNA de interesse para obter a cepa transfectante, ou com 50 µL de água miliQ, para controle da eletroporação. Em seguida, foi aplicado choque elétrico de dois pulsos a voltagem de 0,3 kV e capacitância de 500 µF. Aplicou-se três pulsos elétricos com intervalos de 30 segundos entre eles. Após a eletroporação, as cubetas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, os parasitos transfectados foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio de cultura e incubados a 28°C. Foi adicionado ao meio 200 µg.mL⁻¹ de higromicina (Invitrogen), 24 horas após

a eletroporação. As células foram mantidas em garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo onde sofreram seleção, por cerca de 4 semanas, através do cultivo na presença de 200 µg.mL⁻¹ de higromicina. Dessa forma, os parasitos tranfectados com o vetor vazio (denominados de pROCK) e os parasitos tranfectados com o gene TcHus1 (denominados pROCK-Hus1) conseguiram crescer na presença do antibiótico, enquanto os parasitos tranfectados com água miliQ (chamados de *mock*) morreram durante a seleção.

3.8. Extração de RNA e RT-qPCR

Para confirmar que os parasitos selecionados estavam superexpressando o gene Hus1 foi realizada PCR quantitativa em tempo real. Esta é uma técnica bastante versátil, cuja aplicação mais comum é a análise da expressão gênica. O cDNA, produzido a partir do RNA expresso na célula, é utilizado como molde na reação e com métodos de quantificação relativa, como o método do $\Delta\Delta C_t$, é possível quantificar diferenças no nível de expressão de um gene alvo entre amostras distintas. Dessa forma, o primeiro passo foi a extração de RNA total das células utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). Cerca de 1×10^8 células de *T. cruzi*, na forma epimastigota e em fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos e a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de TRIzol e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para promover a lise celular. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao lisado, que foi misturado por inversão e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. Para separar a fase aquosa, os tubos foram centrifugados a 13500 g por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa incolor foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol. Após a homogeneização, a mistura foi incubada por pelo menos 1 hora a -20°C. O RNA precipitado foi centrifugado a 13500 g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (7500 g, 5 minutos, 4°C). Após o tempo de secagem, o RNA foi ressuscitado em 60 µL de H₂O miliQ, dosado a 260 nm e sua qualidade foi analisada em gel de agarose 1% contendo formaldeído.

Uma vez verificado que o RNA estava íntegro era necessário remover as contaminações com DNA genômico. Assim, 10 µg de cada amostra de RNA foram

tratadas com DNase fornecida no kit *DNA free Kit* (Ambion), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram novamente dosadas e submetidas a reação de PCR descrita no item 3.3, para conferir a eficiência do tratamento.

O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa usando como molde 1 µg do RNA tratado, utilizando o kit Super Script III First – Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos no aparelho StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em triplicatas, contendo 2 ng de cDNA, 300 nM de cada iniciador (Tabela 2), 7,5 µL de Mix SYBR 2X (Applied Biosystems) e água DNARNase *free* para completar um volume final de 15 µL. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto cada. Um controle negativo da transcrição reversa (sem a enzima transcriptase reversa) e um controle negativo sem cDNA (substituído por água DNARNase *free*) foram incluídos em cada placa para cada conjunto de iniciadores utilizados, com a finalidade de confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de iniciadores ou a contaminação dos reagentes, respectivamente. Após as reações, foi feita a análise da curva de dissociação dos produtos amplificados de cada amostra para verificar se as reações estavam produzindo mais de um produto ou se havia formação de dímeros. A quantidade relativa de transcritos alvo em cada amostra foi determinada usando o método $\Delta\Delta C_t$ e GAPDH como gene constitutivo, para a normalização dos resultados obtidos. Para testar a eficiência dos iniciadores desenhados (Tabela 2) utilizou-se o valor de inclinação da curva obtida pela diluição seriada do cDNA obtido das células pROCK (50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng, 1,56 ng, 0,78 ng e 0,39 ng). Foram consideradas aceitáveis as eficiências entre 90% e 110%.

3.9. Avaliação do efeito da superexpressão do gene TcHus1 no crescimento de *Trypanosoma cruzi*

3.9.1. Curva de crescimento

Células selvagens, contendo o vetor vazio e superexpressoras do gene Hus1, em fase exponencial de crescimento, foram diluídas para a concentração de 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT e tiveram seu crescimento acompanhado a cada 24 horas, até atingirem a fase estacionária de crescimento. A determinação do número de parasitos ocorreu em câmara citométrica, usando o corante vital eritrosina (0,04% em PBS, pH 7,4) para diferenciar células vivas e mortas.

3.9.2. Curvas de crescimento na presença de agentes genotóxicos

Para estudar o papel do gene TcHus1 em *T. cruzi*, foi avaliado o crescimento dos parasitos WT, pROCK e pROCK-Hus1 quando tratados com alguns agentes genotóxicos que causam estresse replicativo na célula.

Parasitos em fase exponencial de crescimento foram diluídos para 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT, tratados com 120 μ M de benzonidazol (BZ) e incubados a 28°C. O crescimento foi acompanhado a cada 24 horas, por cerca de seis dias. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

Parasitos em meio LIT com crescimento exponencial foram diluídos para 1×10^7 células.mL⁻¹ e tratados com 5 μ M de camptotecina (CPT) e incubados a 28°C. Durante cerca de seis dias o crescimento foi acompanhado a cada 24 horas. Uma variação desse tratamento é a retirada da droga no tempo de 48 horas, no qual as células foram lavadas com PBS e permitido seu crescimento em meio fresco, livre de drogas. Para cada forma de tratamento foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

Parasitos em fase exponencial de crescimento foram diluídos para 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT, tratados com 50, 100 ou 150 μ M de cisplatina e incubados a 28°C. Durante cerca de cinco dias o crescimento foi acompanhado a cada 24 horas. Para cada dose testada, foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram diluídos para 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT, tratados com 20 ou 30 mM de hidroxiureia (HU) e incubados a 28°C por 24 horas. Após esse tempo, a droga foi retirada do meio, as células foram lavadas três vezes em PBS e os parasitos foram ressuspensos em meio fresco, livre

de drogas. Então, o crescimento da cultura foi acompanhado a cada 24 horas, por mais quatro dias. Para cada dose testada foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram diluídos para 1×10^7 células.mL⁻¹, lavados com PBS e tratados com 1,5 mM de metil metano sulfonato (MMS), em PBS por 1 hora a 28°C. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas em meio LIT fresco, sem droga. O crescimento foi acompanhado a cada 24 horas, por cerca de seis dias. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

3.10. Análise do nível de transcrição de TcHus1 após tratamento com MMS

Para verificar se o tratamento com agente genotóxico era capaz de alterar o nível de mRNA de TcHus1, o tratamento com MMS descrito no item anterior foi repetido e, 1 hora após o fim da incubação com MMS, as células foram preparadas para o RT-qPCR, como descrito no item 3.8.

3.11. Análise da progressão do ciclo celular da cultura selvagem por FACS

Com o intuito de avaliar as alterações no ciclo celular do parasito selvagem devido ao estresse replicativo, as células foram submetidas à análise por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Células em fase exponencial de crescimento foram cultivadas na presença de 150 µM de cisplatina, 120 µM de BZ ou 1 mM de MMS. A cada 24 horas amostras foram recolhidas para análise da progressão do ciclo celular. Para tal, 1×10^7 células.mL⁻¹ foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos, lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% a -20°C por pelo menos 16 horas. Após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas em PBS contendo 10 µg.mL⁻¹ de RNase A (Invitrogen) e 10 µg.mL⁻¹ de iodeto de propídeo (BD Pharmingen), para marcação do conteúdo de DNA. As amostras foram incubadas nessa solução por 30 minutos a 37°C e ao abrigo da luz. Então, as amostras foram lidas em um aparelho FACSCan (Benckton-Dickson) e os resultados analisados em forma de histograma no programa FlowJo v10.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem do gene Hus1

Para caracterizar a função do gene Hus1 da cepa CL Brener de *T. cruzi* foi construída uma linhagem desse parasito que superexpressa esse gene. Para tal, foi necessário clonar o gene TcHus1 anotado no banco de dados de tripanossomatídeos (TritrypDB: TcCLB.466823.10). O primeiro passo nesse processo de clonagem foi a amplificação deste gene com os iniciadores descritos na Tabela 2. Era esperado um amplicon com cerca de 915 pb e, como pode ser visto na figura 7, o fragmento amplificado na reação de PCR está no tamanho previsto.

Em seguida, o amplicon obtido foi ligado ao vetor pGEM T-Easy (Promega) (Anexo 1). O produto da ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes. Algumas das colônias crescidas na placa de meio CG sólido contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina foram selecionadas para o PCR de colônia com os mesmos iniciadores da reação anterior (Figura 8). Novamente, foi obtido um fragmento no tamanho esperado de cerca de 915 pb, confirmando que todas as colônias testadas continham o gene alvo inserido no vetor. Dos clones confirmados como positivos para o gene TcHus1, foram escolhidas as colônias 3 e 4 para dar prosseguimento ao processo de clonagem. Assim, esses clones foram crescidos em 10 mL de meio CG líquido com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina para a extração do DNA plasmidial com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

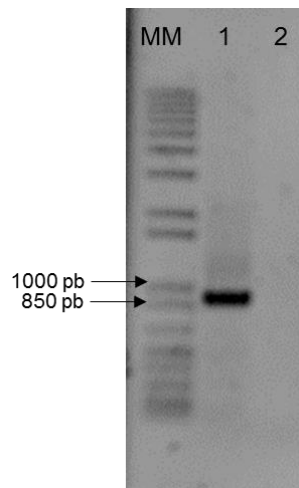


Figura 7: Amplificação do gene TcHus1. Gel de agarose 1% do produto de amplificação obtido da análise do genoma de *T. cruzi* CL Brener com o iniciador Hus1. Reação com DNA da cepa selvagem (1) e reação sem DNA (2). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

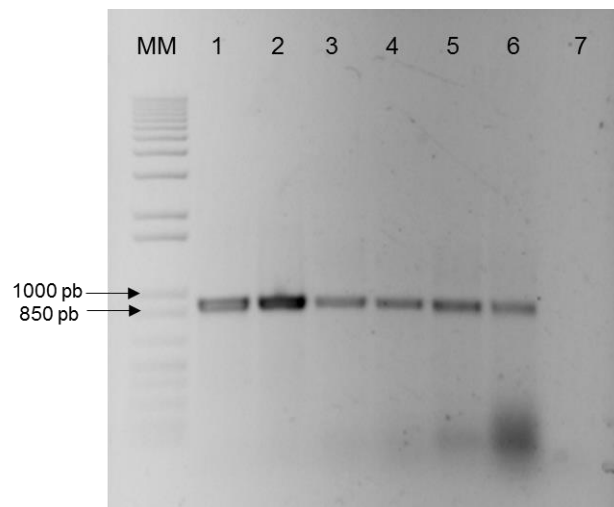


Figura 8: PCR de colônia com os clones pGEM-Hus1. Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com o iniciador Hus1, da análise de colônias obtidas após transformação. Clone 1 (1), clone 2 (2), clone 3 (3), clone 4 (4), clone 5 (5), clone 6 (6) e reação sem DNA (7). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

Após a obtenção dos plasmídeos contendo o gene alvo inserido, era necessário transferir o inserto do vetor de clonagem, pGEM, para o vetor de expressão em *T. cruzi*, pROCKhigro (Anexo 2). Para isso, depois da extração de DNA plasmidial dos clones 3 e 4, os plasmídeos pGEM-TcHus1 foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *SaI* (Fermentas). Com esse procedimento pode-se separar o gene alvo do vetor. Como é possível observar na figura 9, com a digestão enzimática obteve-se duas bandas para cada clone. O fragmento de maior peso molecular, cerca de 3000 pb, é referente ao vetor pGEM. Já o fragmento menor, próximo de 1000 pb, é relativo ao gene TcHus1.

Os fragmentos de TcHus1 liberados foram purificados do gel de agarose e ligados ao vetor pROCKhigro, previamente digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI* (Fermentas) e purificado. Novamente, o produto de ligação foi utilizado para transformar células *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes. Para testar se as colônias presentes na placa de meio CG sólido contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina estavam transformadas com o vetor pROCKhigro contendo o gene alvo, algumas delas foram selecionadas para o PCR de colônia (Figura 10). Como o fragmento amplificado na reação de PCR está próximo de 1000 pb, sugere-se que todas as colônias testadas continham o plasmídeo pROCKhigro-Hus1.

Os clones 1 e 2 foram selecionados para dar prosseguimento aos experimentos. Dessa forma, essas colônias foram crescidas em 10 mL de meio CG contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Essas culturas foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Os plasmídeos pROCKhigro-Hus1 obtidos foram linearizados com a enzima *NotI* (Fermentas) (Figura 11). Em seguida, o clone 1 foi utilizado para transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, por eletroporação. Os parasitos obtidos foram selecionados, durante 4 semanas, em 5 mL de meio LIT contendo 200 µg.mL⁻¹ de higromicina. As culturas obtidas foram denominadas de pROCK (parasito transfectado com o vetor vazio) e pROCK-Hus1 (parasito transfectado com o vetor contendo o gene TcHus1).

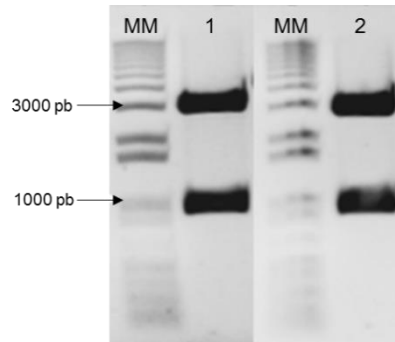


Figura 9: Digestão enzimática. Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *XbaI* e *SaI*. Digestão do clone 3 (1) e digestão do clone 4 (2). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

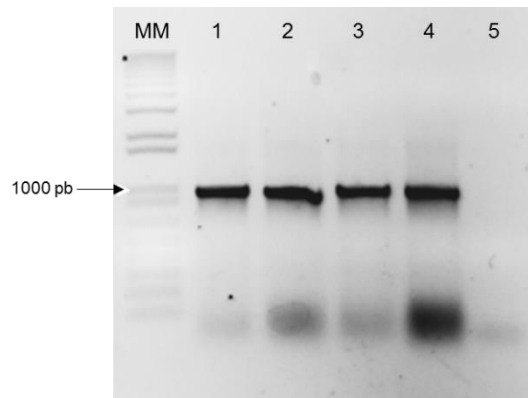


Figura 10: PCR de colônia com os clones pROCKhigro-Hus1. Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com o iniciador Hus1, obtido da análise de colônias obtidas após transformação. Clone 1 (1), clone 2 (2), clone 3 (3), clone 4 (4) e reação sem DNA (5). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

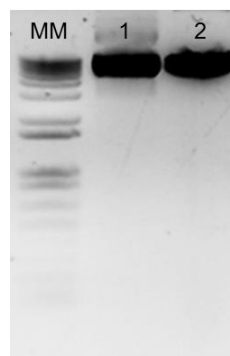


Figura 11: Linearização com a enzima *NotI*. Gel de agarose 1% do produto da linearização dos clones pROCKhigro-Hus1. Marcador molecular 1kb (Invitrogen) (1), clone 1 (2) e clone 2 (3).

4.2. Sequenciamento de DNA e análise por bioinformática

O plasmídeo obtido do clone 1 foi sequenciado no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG), utilizando-se todos os iniciadores descritos na Tabela 2.

O resultado gerado pelo *software* DNA Baser v4 foi alinhado com a sequência de TcHus1 alelo Esmeraldo-*like* disponível no banco de dados (Figura 12A). Essa análise indicou a presença de 29 alterações na sequência de Hus1 do clone 1. Para entender como essas modificações afetam a proteína Hus1 clonada, sua sequência de aminoácidos foi obtida com o uso do programa ExPASy Translate (disponível em <http://web.expasy.org/translate/>). O alinhamento das sequências de aminoácidos mostrou 15 diferenças entre Hus1 predita no banco de dados e Hus1 clonada (Figura 12B). Entretanto, ao comparar a sequência de aminoácidos de Hus1 clonada com as sequências de Hus1 de outros organismos, como *T. cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-*like*, *T. cruzi* Sylvio, *T. cruzi* Marinkellei e *T. rangeli*, apenas três aminoácidos (posições 60, 123 e 148) são únicos de Hus1 clonada e dois (posições 233 e 238) estão em uma região não muito conservada (Figura 13).

Para determinar se esses aminoácidos diferentes interfeririam na estrutura tridimensional de Hus1, a estrutura cristalina do complexo 9-1-1 de *Homo sapiens* (PDB ID: 3G65, resolução 2.9 Å) foi utilizada como modelo para a predição da estrutura tridimensional da proteína Hus1 clonada. Os modelos gerados foram validados e essa análise de bioinformática indicou que as alterações acima citadas não causam modificação da estrutura proteica de Hus1, quando comparada com os modelos preditos para as sequências de TcHus1 e LmHus1 depositadas no banco de dados (Figura14).

A determinação do número de cópias do gene Hus1 encontrou aproximadamente 105X de cobertura para o haplótipo Não Esmeraldo-*like* e 125X para o Esmeraldo-*like*. Após a normalização pela cobertura média dos genes de cópia única definiu-se sete e oito cópias para Não Esmeraldo-*Like* e Esmeraldo-*Like*, respectivamente, todas presentes no cromossomo 22. Uma vez esclarecido o número total de cópias do gene Hus1 em CL Brener, foi analisado o grau de conservação ao longo do gene. Foram encontrados 33 pontos de mutação no haplótipo Esmeraldo-*like* e 17 no Não Esmeraldo-*like* (Tabelas 3 e 4).

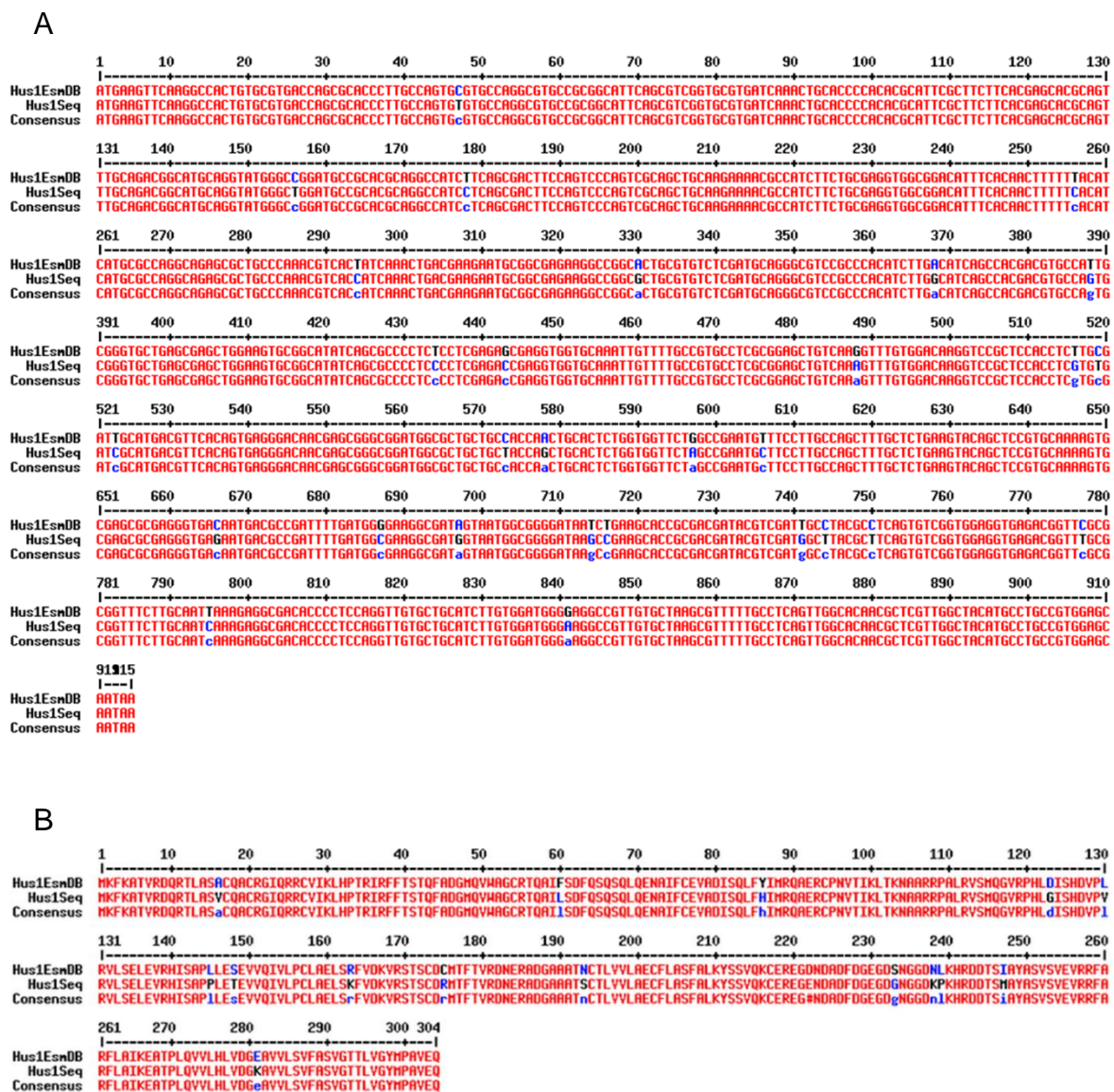


Figura 12: Alinhamento entre as sequências de TcHus1 obtida por sequenciamento e depositada no banco de dados como alelo Esmeraldo-*like*. Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B). Em vermelho estão os nucleotídeos/aminoácidos iguais entre as duas sequências analisadas e em preto, os nucleotídeos/aminoácidos da sequência depositada que diferem dos nucleotídeos sequenciados. Na imagem, Hus1EsmDB refere-se à sequência depositada no banco de dados de tripanossomatídeos, enquanto Hus1Seq é a sequência obtida do plasmídeo do clone 1. As sequências foram alinhadas no programa MultiAlign.

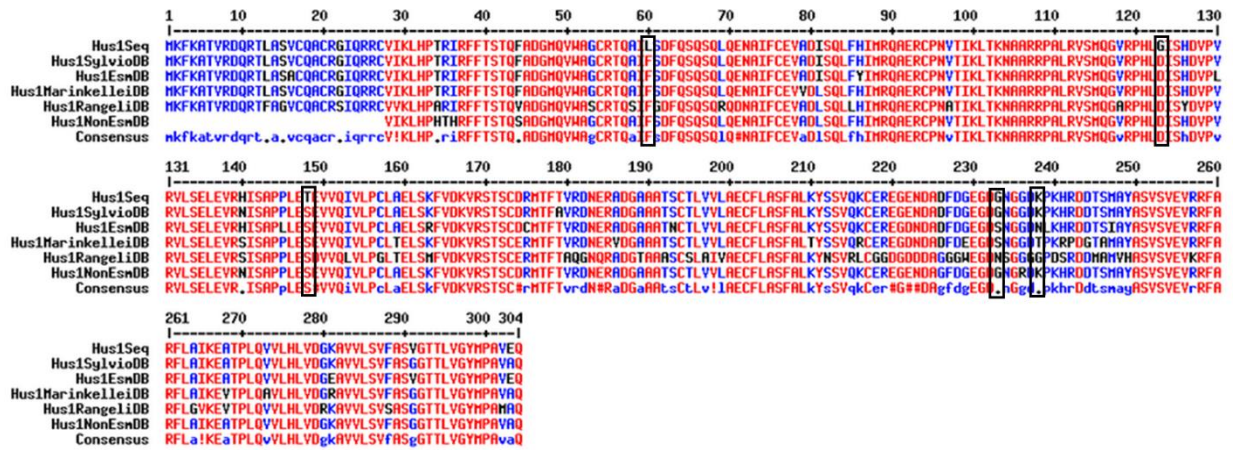


Figura 13: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de TcHus1 clonada e de alguns *Trypanosoma* depositadas no banco de dados: *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like, *Trypanosoma cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like, *Trypanosoma cruzi* Sylvio, *Trypanosoma cruzi* Marinkellei e *Trypanosoma rangeli*. Em vermelho estão os aminoácidos iguais entre todas as sequências analisadas. Na imagem, Hus1Seq é a sequência obtida do plasmídeo do clone 1, enquanto as demais correspondem a sequências depositadas no banco de dados de tripanosomatídeos. Os retângulos pretos destacam as posições de modificação em Hus1Seq. As sequências foram alinhadas no programa MultiAlign.

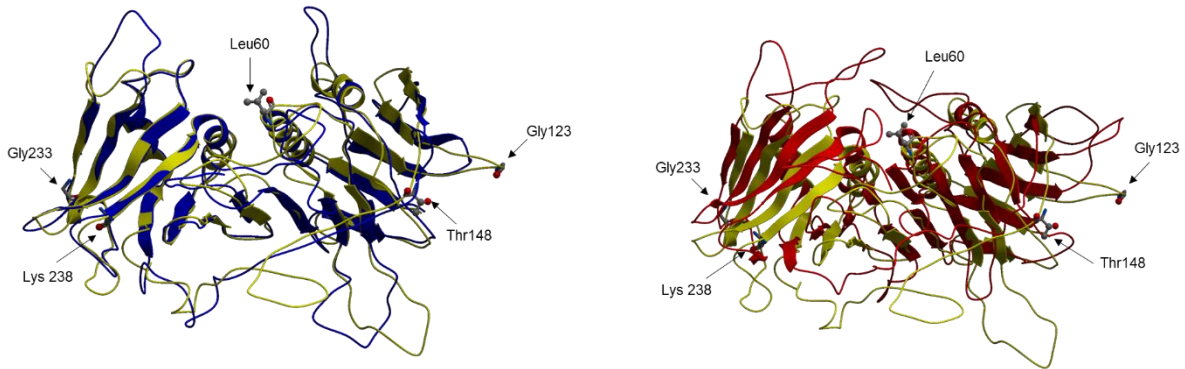


Figura 14: Sobreposição das estruturas tridimensional de Hus1 preditas. As sequências do gene Hus1 clonado, TcHus1 e LmHus1 depositados no banco de dados foram utilizadas para a predição da estrutura tridimensional das proteínas por elas codificadas. A estrutura de Hus1 clonada (em amarelo) foi sobreposta com a estrutura de Hus1 de *T. cruzi* (em azul) e de *L. major* (em vermelho), mostrando conservação na sua estrutura. Os aminoácidos citados no texto estão destacados.

Tabela 3: SNPs encontrados no gene TcHus1 do alelo Esmeraldo-*like* de CL Brener.

Cromossomo	Posição do Gene	SNP1	SNP2	Qualidade	Informação	Posição Chr 22
TcChr22-S	7	T	G	225	DP4=6,8,5,10	36042
TcChr22-S	24	G	A	36	DP4=9,15,2,2	36059
TcChr22-S	43	A	C	225	DP4=4,10,7,9	36078
TcChr22-S	74	C	T	225	DP4=5,7,6,12	36109
TcChr22-S	120	A	G	225	DP4=5,12,6,11	36155
TcChr22-S	138	G	A	217	DP4=8,14,4,9	36173
TcChr22-S	165	G	A	225	DP4=4,8,10,13	36200
TcChr22-S	174	A	C	225	DP4=4,8,10,13	36209
TcChr22-S	175	A	G	225	DP4=9,13,5,8	36210
TcChr22-S	218	T	C	157	DP4=11,13,4,5	36253
TcChr22-S	249	G	C	225	DP4=8,9,7,10	36284
TcChr22-S	337	T	C	225	DP4=5,6,11,13	36372
TcChr22-S	392	A	G	225	DP4=9,8,9,11	36427
TcChr22-S	399	A	C	225	DP4=9,7,10,11	36434
TcChr22-S	420	C	G	199	DP4=15,10,4,8	36455
TcChr22-S	427	C	T	225	DP4=6,5,13,14	36462
TcChr22-S	438	C	T	31	DP4=16,19,3,2	36473
TcChr22-S	440	C	T	198	DP4=14,14,5,7	36475
TcChr22-S	441	G	A	198	DP4=14,14,5,7	36476
TcChr22-S	467	C	T	107	DP4=16,18,3,5	36502
TcChr22-S	481	A	G	225	DP4=9,11,10,15	36516
TcChr22-S	497	G	T	49	DP4=14,23,3,4	36532
TcChr22-S	516	C	A	31	DP4=17,23,1,5	36551
TcChr22-S	527	A	C	225	DP4=7,8,11,21	36562
TcChr22-S	553	T	A	105	DP4=16,25,3,6	36588
TcChr22-S	574	G	A	105	DP4=15,26,3,6	36609
TcChr22-S	585	T	C	225	DP4=7,8,11,24	36620
TcChr22-S	609	C	T	78	DP4=16,25,2,6	36644
TcChr22-S	621	A	G	225	DP4=7,5,10,27	36656
TcChr22-S	659	A	G	225	DP4=10,16,6,16	36694
TcChr22-S	737	A	G	178	DP4=12,21,3,10	36772
TcChr22-S	784	A	G	130	DP4=10,22,3,6	36819
TcChr22-S	868	G	A	225	DP4=5,4,4,19	36903

Observação: Tabela gentilmente cedida pelo Dr. Rodrigo de Paula Baptista. DP4= frequência do SNP1Foward, SNP1Reverse, SNP2Foward, SNP2Reverse

Tabela 4: SNPs encontrados no gene TcHus1 do alelo Não Esmeraldo-*like* de CL Brener.

Cromossomo	Posição do Gene	SNP1	SNP2	Qualidade	Informação	Posição Chr 22
TcChr22-P	57	A	G	118	DP4=21,9,3,5	100862
TcChr22-P	65	A	C	225	DP4=5,4,20,13	100870
TcChr22-P	71	G	A	109	DP4=22,11,3,5	100876
TcChr22-P	80	A	G	225	DP4=19,9,6,8	100885
TcChr22-P	100	C	A	25	DP4=22,15,3,2	100905
TcChr22-P	133	A	G	14,2	DP4=22,16,4,1	100938
TcChr22-P	159	G	T	225	DP4=11,12,16,5	100964
TcChr22-P	211	T	C	225	DP4=6,5,24,14	101016
TcChr22-P	230	G	C	105	DP4=26,17,4,5	101035
TcChr22-P	240	C	T	225	DP4=6,7,26,14	101045
TcChr22-P	362	T	C	108	DP4=28,13,2,8	101167
TcChr22-P	499	T	C	62	DP4=22,17,6,3	101304
TcChr22-P	518	A	C	142	DP4=20,17,8,3	101323
TcChr22-P	557	C	T	225	DP4=12,10,15,6	101362
TcChr22-P	587	C	T	113	DP4=18,15,7,2	101392
TcChr22-P	676	G	T	225	DP4=5,8,13,7	101481
TcChr22-P	786	G	A	41	DP4=9,7,0,4	101591

Observação: Tabela gentilmente cedida pelo Dr. Rodrigo de Paula Baptista. DP4= frequência do SNP1Forward, SNP1Reverse, SNP2Forward, SNP2Reverse

Mesmo com essa quantidade de polimorfismos entre as cópias do gene Hus1 de *T. cruzi* CL Brener, as alterações observadas na sequência de Hus1 clonada não correspondem a nenhum dos SNPs apresentados nas tabelas anteriores. Contudo, os alinhamentos mostraram que apenas cinco dessas alterações poderiam interferir no enovelamento da proteína. Como a predição da estrutura proteica mostrou que essas modificações não implicam em alteração estrutural, é possível sugerir que também não há mudança de função dessa proteína e, dessa forma, os parasitos selecionados após a transfecção com o plasmídeo do clone 1 foram usados nas etapas seguintes do trabalho.

4.3. Extração de RNA e RT-qPCR para confirmação da superexpressão

Com o intuito de confirmar que os parasitos selecionados após a transfecção estavam superexpressando o gene TcHus1, foi feita uma PCR quantitativa em tempo real. O primeiro passo para a realização da RT-qPCR foi a extração de RNA total das células utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). Nesta etapa, o RNA foi extraído dos

parasitos transfectados com o vetor pROCKhigro vazio e contendo TcHus1. O gel de agarose 1% contendo formaldeído mostrou que o RNA extraído estava íntegro e de boa qualidade (Figura 15).

Em seguida, o RNA foi tratado com DNase para remover as contaminações por DNA genômico e foi utilizado para a síntese do cDNA. Para cada reação, 2 ng de cDNA foi utilizado como molde. A partir do método do $\Delta\Delta Ct$ foi possível fazer a quantificação relativa da expressão gênica (Figura 16), mostrando que as células pROCK-Hus1 tem cerca de duas vezes mais mRNA para esse gene do que as células pROCK.

4.4. Curva de crescimento

Após a seleção dos parasitos e a confirmação da superexpressão do gene TcHus1 foi feita uma curva de crescimento com as células selvagem e transformadas com o plasmídeo (Figura 17). Os parasitos foram contados por cinco dias, a cada 24 horas, em câmara citométrica. O gráfico mostra que a presença do vetor pROCK vazio ou contendo o inserto não interfere no crescimento das culturas, quando comparado com a cepa selvagem (WT).

4.5. Curvas de crescimento na presença de agentes genotóxicos

Com a finalidade de estudar o papel do gene Hus1 em *T. cruzi*, as culturas de parasitos WT, pROCK e pROCK-Hus1 foram submetidas ao tratamento com alguns agentes genotóxicos que causam estresse replicativo na célula. Isso ajudaria a avaliar se Hus1 estaria envolvido na via de ativação de ATR em *T. cruzi*, como ocorre em outros eucariotos. Para todas as drogas testadas, o perfil de crescimento dos três tipos de parasitos foi analisado, sendo que havia o grupo que recebia o tratamento e o grupo controle não tratado.

Os parasitos, em fase exponencial de crescimento, receberam o tratamento com 120 μM de BZ e a cada 24 horas o número de parasitos foi contado em câmara citométrica. A presença dessa droga fez com que as células parassem seu crescimento durante o tempo analisado, entretanto não foi possível observar diferença de crescimento entre as três culturas testadas (Figura 18).

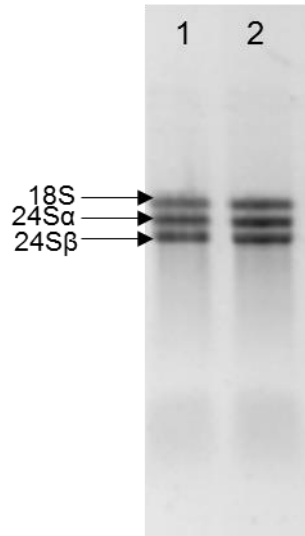


Figura 15: Extração de RNA. Gel de agarose 1% da extração de RNA total. Célula pROCK (1) e célula pROCK-Hus1 (2). As setas indicam as bandas de RNA ribossômico.

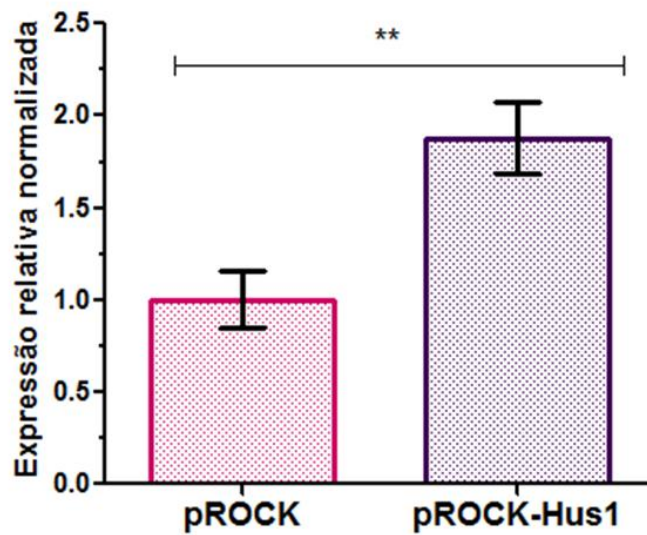


Figura 16: Confirmação da superexpressão de Hus1. Quantificação relativa da expressão gênica das células pROCK e pROCK-Hus1, mostrando que o gene TcHus1 está superexpresso. Gráfico e estatística feitos no programa GraphPad Prism.

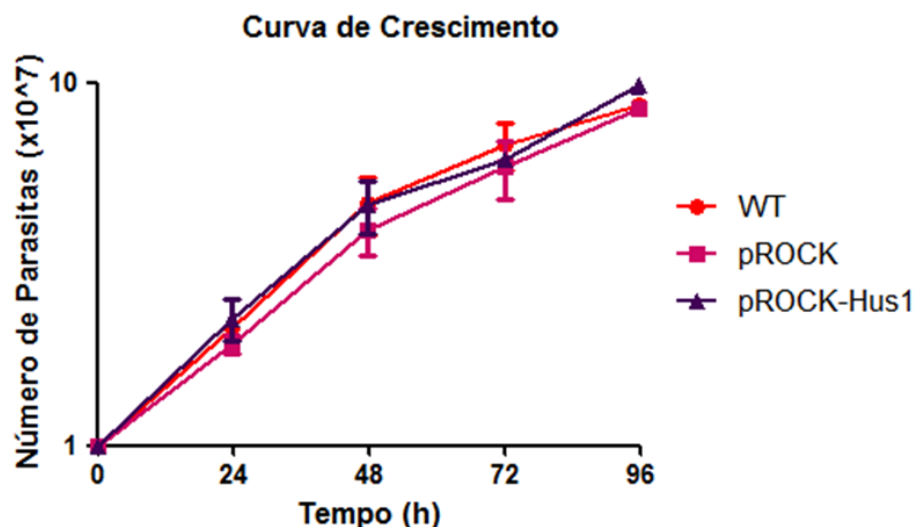


Figura 17: Curva de crescimento. Avaliação do crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1). Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Os parasitos foram contados em uma câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

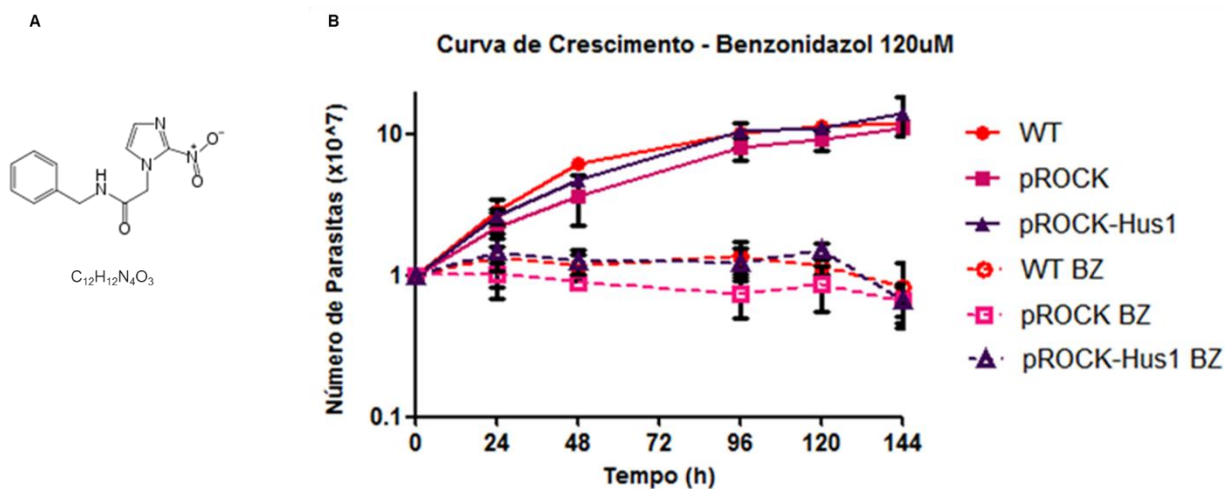


Figura 18: Curva de crescimento com benzonidazol. A) Estrutura química e fórmula molecular do benzonidazol. B) Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) na presença de 120 μ M de BZ. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

O tratamento com CPT ocorreu de dois modos, que se diferenciavam devido ao tempo de exposição das células à droga. Em ambos, as células em crescimento exponencial foram tratadas com 5 μM de CPT e o número de parasitos contado diariamente em câmara citométrica. Quando a CPT foi deixada no meio de cultivo durante todo o tempo analisado, as células tiveram redução da sua taxa de crescimento em comparação com as células que não receberam o tratamento. Contudo, não foi possível observar diferenças entre os três tipos de parasitos que receberam o tratamento (Figura 19). Na segunda forma de tratamento, a droga foi retirada no tempo de 48 horas. Tal variação no tratamento permite a retomada de crescimento pelas células, porém não contribuiu para o crescimento diferenciado entre os parasitos testados (Figura 20).

Para avaliar o efeito da cisplatina no crescimento dos parasitos, três doses diferentes foram testadas: 50, 100 ou 150 μM . Assim, parasitos em crescimento exponencial foram incubados com alguma dessas doses e tiveram seu perfil de crescimento avaliado por meio da contagem do número de células a cada 24 horas. O tratamento com a dose mais baixa, 50 μM , não alterou a taxa de crescimento celular. Para os três tipos de parasitos e em todos os pontos coletados, o crescimento das células que receberam o tratamento foi praticamente o mesmo das que não receberam (Figura 21 B). A exposição de doses maiores de cisplatina, 100 e 150 μM , conseguiu retardar o crescimento das células de maneira dose-dependente, quando comparado com o crescimento apresentado pelas células sem tratamento. No entanto, em nenhuma das duas doses testadas, foi possível observar diferença entre o perfil de crescimento dos parasitos WT, pROCK e pROCK-Hus1 que receberam cisplatina (Figura 21 C e D).

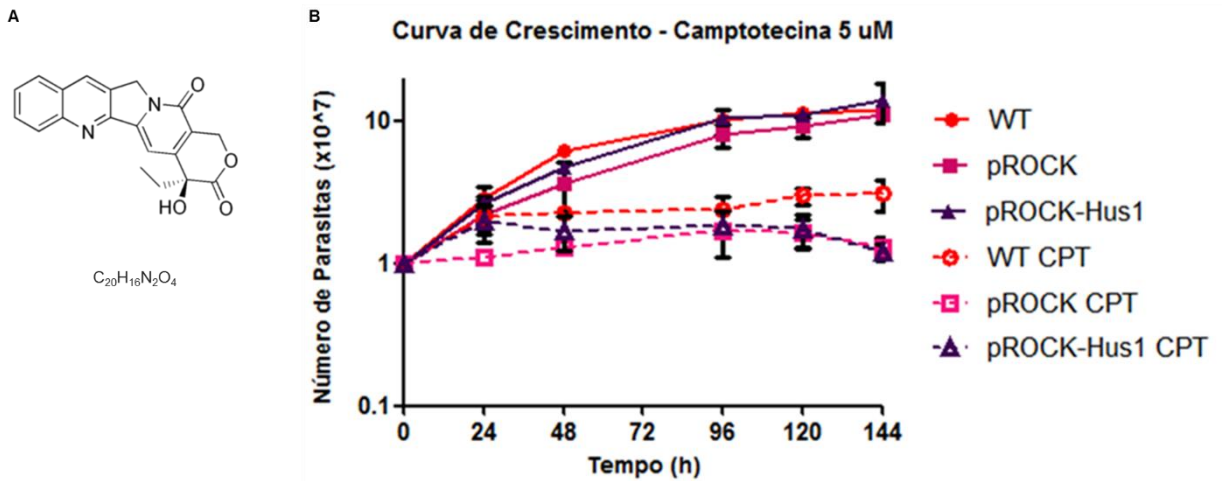


Figura 19: Curva de crescimento com camptotecina. A) Estrutura química e fórmula molecular da camptotecina. B) Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) na presença de 5 μ M de CPT. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

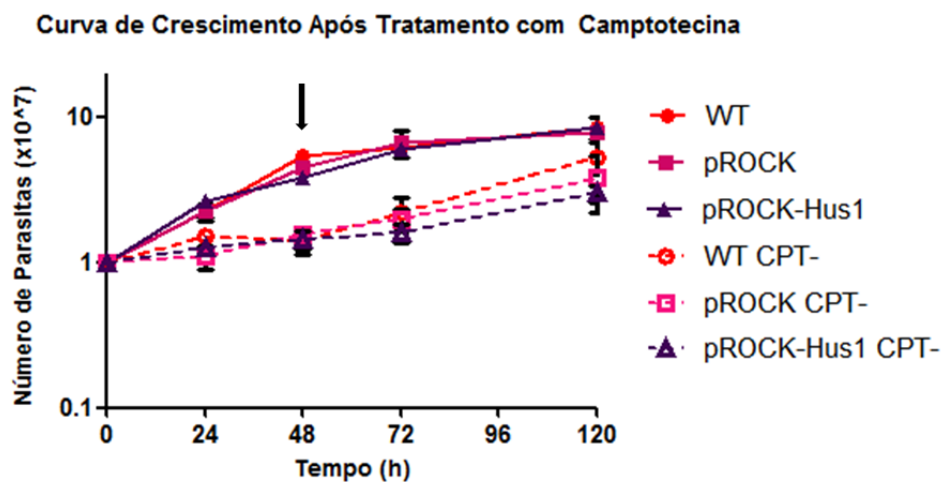


Figura 20: Curva de crescimento após tratamento com camptotecina. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) após o tratamento com 5 μ M de CPT. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida. O experimento foi realizado em triplicata.

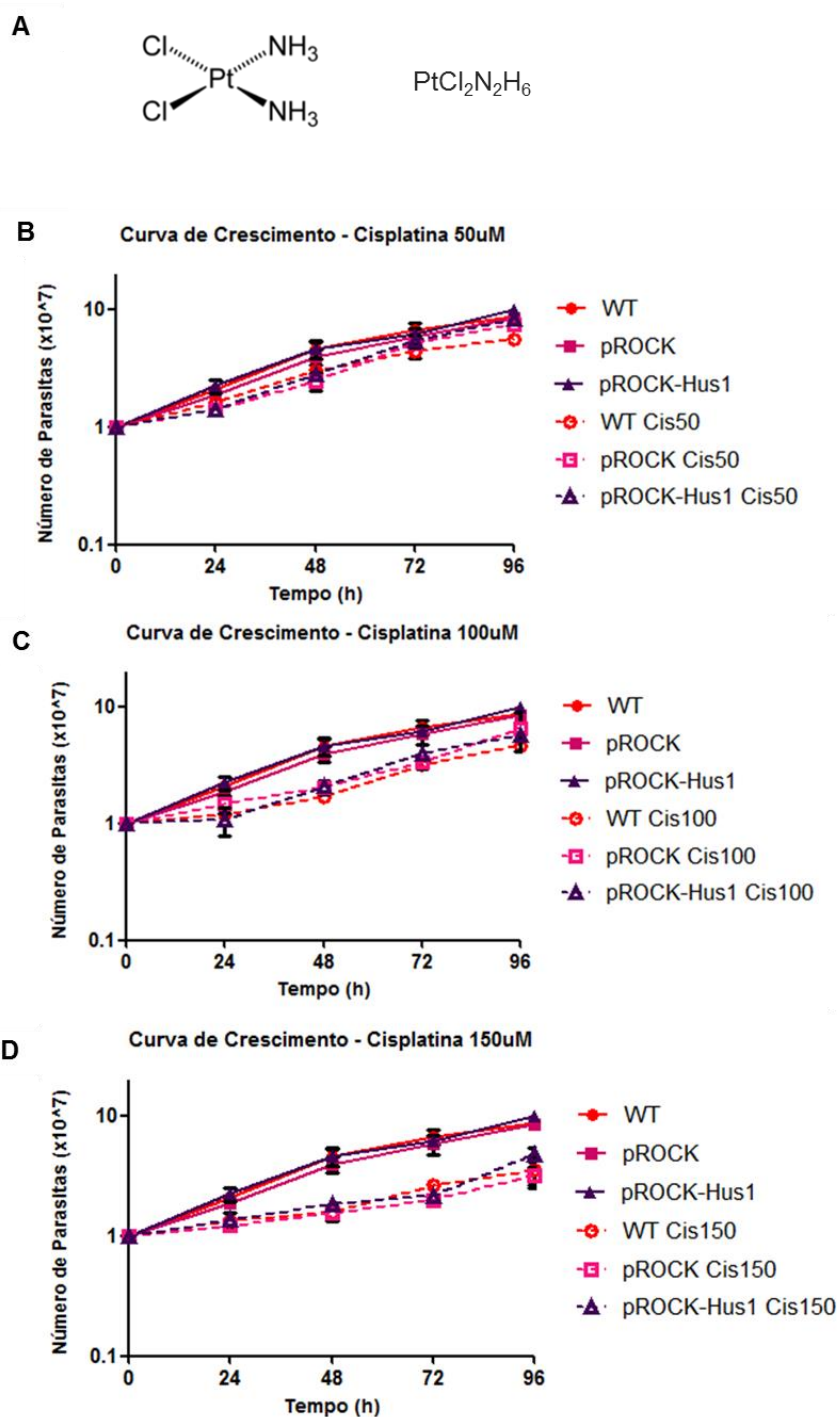


Figura 21: Curva de crescimento com cisplatina. A) Estrutura química e fórmula molecular da cisplatina. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) na presença de 50 μM (B), 100 μM (C) ou 150 μM (D) de cisplatina. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

A HU é uma droga bem documentada por causar estresse replicativo. Devido a sua citotoxicidade, o tratamento com HU foi realizado por 24 horas nas doses de 20 ou 30 mM em células na fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram contados diariamente em câmara citométrica para determinar o seu perfil de crescimento. Após 24 horas de incubação, a droga foi removida do meio de cultura e as células colocadas em meio LIT fresco, livre de drogas. Para ambas as doses analisadas, os parasitos permanecem parados na presença de HU (Figura 22 B e C). Porém, a remoção da droga permite a retomada de crescimento, sendo que os parasitos tratados atingem a mesma densidade celular na fase estacionária que os parasitos não tratados. De maneira similar aos outros tratamentos realizados, não foi possível observar diferenças na taxa de crescimento entre as culturas expostas a qualquer uma das doses de HU testadas (Figura 22).

O MMS também é considerado um agente genotóxico clássico no estudo de estresse replicativo. Todos os tratamentos apresentados até agora foram realizados em meio LIT. Todavia, o tratamento com MMS ocorreu em tampão PBS. Assim, parasitos com crescimento exponencial, ressuspendidos em PBS, foram expostos a 1,5 mM de MMS e incubados por 1 hora a 28°C. Após esse tempo, as células foram lavadas e transferidas para o meio LIT fresco, sem droga. A cada 24 horas o número de parasitos foi contado em câmara citométrica. Esse tratamento praticamente não influenciou na taxa de crescimento das células testadas, sem distinção no perfil apresentado pelas três cepas estudadas (Figura 23).

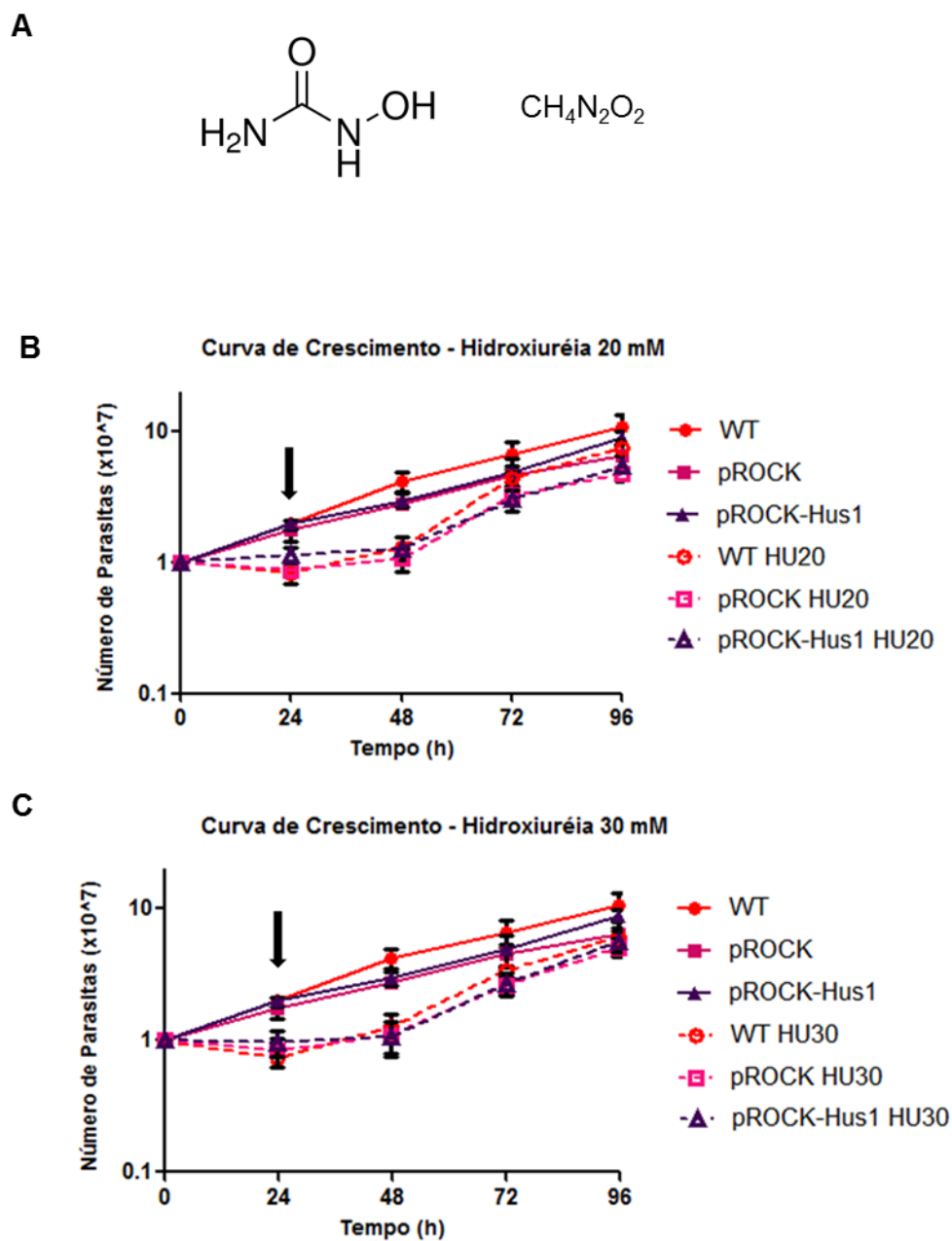


Figura 22: Curva de crescimento com hidroxiureia. A) Estrutura química e fórmula molecular da hidroxiureia. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) após o tratamento com 20 mM (B) ou 30 mM (C) de HU. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida. O experimento foi realizado em triplicata.

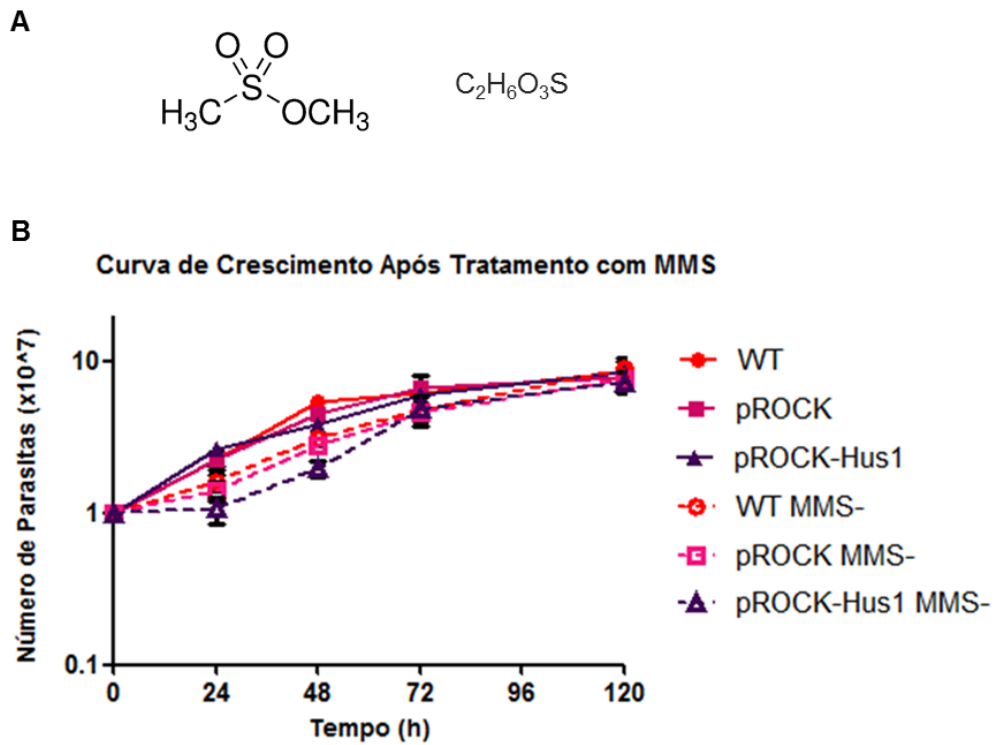


Figura 23: Curva de crescimento após o tratamento com MMS. A) Estrutura química e fórmula molecular do MMS. B) Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), transfectada com o vetor pROCK vazio (pROCK) e superexpressora de Hus1 (pROCK-Hus1) após o tratamento com 1,5 mM de MMS em PBS por 1h a 28°C. Depois do tratamento, os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6. Nível de transcrição de TcHus1 após tratamento com MMS

Os resultados obtidos das curvas de crescimento apresentadas anteriormente mostram que o perfil de crescimento das células WT, pROCK e pROCK-Hus1 é muito semelhante entre si para qualquer droga testada. Na tentativa de entender essa ausência de fenótipo dos parasitos superexpressores de TcHus1, 1 hora após o fim do tratamento com 1,5 mM de MMS as células foram preparadas para o RT-qPCR, a fim de verificar se o tratamento com esse agente genotóxico seria capaz de alterar o nível de mRNA de TcHus1. Como apresentado na figura 24, pROCK-Hus1 foi o único parasito capaz de responder ao estresse gerado aumentando significativamente o nível de transcritos desse gene.

4.7. Avaliação da progressão do ciclo celular de parasitos selvagens

A progressão do ciclo celular dos parasitos selvagens foi avaliada durante o tratamento com alguns agentes genotóxicos. Após o preparo das amostras e marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo, a progressão do ciclo celular foi avaliada a cada 24 horas por até 96 horas (Figura 25).

Em concordância com as curvas de crescimento apresentadas anteriormente, o histograma mostra que essas drogas alteram a progressão do ciclo celular de *T. cruzi*, quando comparado com as células que não receberam tratamento. Na presença de qualquer uma das drogas testadas é possível notar um acúmulo de células na fase S (representado pelo vale), compatível com o papel de causador de estresse replicativo atribuído a esses agentes genotóxicos.

Nível de expressão após tratamento com MMS

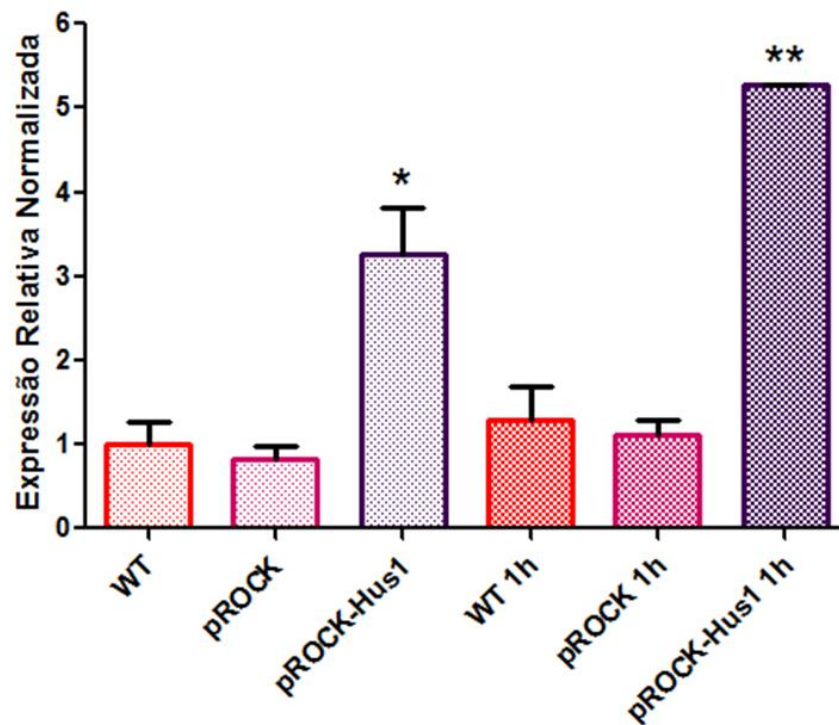


Figura 24: Nível de expressão de Hus1 após tratamento com MMS. Quantificação relativa da expressão gênica das células WT, pROCK e pROCK-Hus1 1 hora após o tratamento com MMS, mostrando que os níveis do gene TcHus1 são aumentados nas células superexpressoras na presença de estresse replicativo. Gráfico e estatística feitos no programa GraphPad Prism.

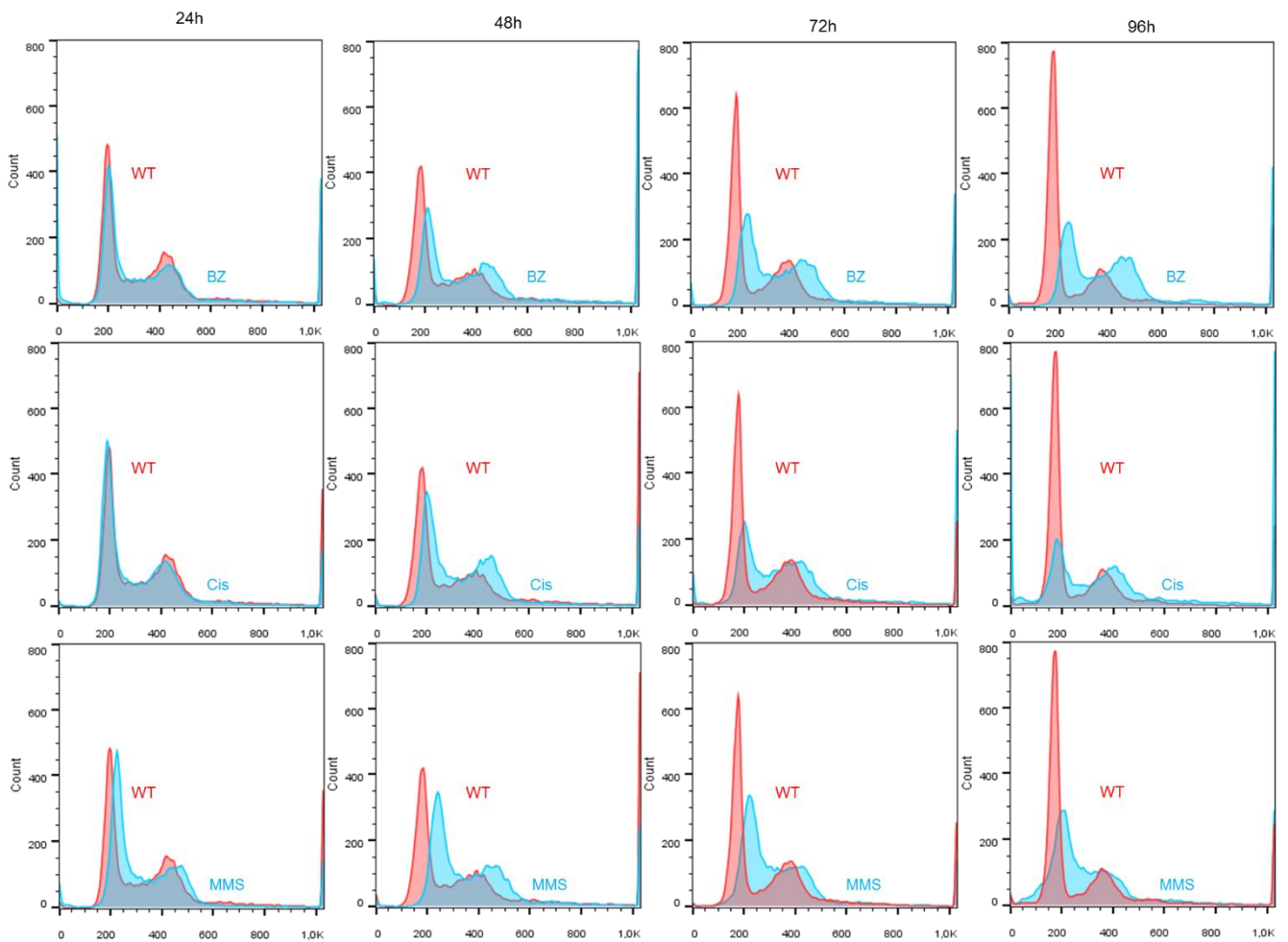


Figura 25: Progressão do ciclo celular de culturas selvagens (WT) na presença e ausência de agentes genotóxicos. As culturas foram analisadas através de FACS após serem marcadas com iodeto de propídeo. WT: Culturas sem tratamento; BZ: Culturas tratadas com 120 μM de BZ; Cis: Culturas tratadas com 150 μM de cisplatina; MMS: Culturas tratadas com 1 mM de MMS. Todas as células estavam na concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ células. mL^{-1} no tempo 0 h, quando as drogas foram adicionadas. As drogas foram mantidas no meio durante todo o período avaliado.

5. DISCUSSÃO

A proteína Hus1 interage com Rad1 e Rad9 para formar o grampo 9-1-1. Estudos em leveduras e mamíferos têm mostrado que a principal função desse complexo é promover a ativação da cinase de *checkpoint* ATR (Parrilla-Castelar *et al*, 2004). Na presença de ssDNA, originado principalmente por estresse replicativo, o carregador Rad17-RFC é responsável por trazer o grampo 9-1-1 para o sítio de dano (Bermudez *et al*, 2003). Nesta região, o complexo 9-1-1 recruta a proteína TopBP1 que, por sua vez, ativa a cinase ATR desencadeando a resposta ao dano de DNA (Lee *et al*, 2007).

A anotação do genoma da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed *et al*, 2005) mostrou que este parasito possui muitos dos genes envolvidos nos mecanismos de reparo. Nos últimos anos, a proteína LmHus1 e seu parceiro de interação, LmRad9, têm sido descritos em *Leishmania major* (Nunes *et al*, 2011; Damasceno *et al*, 2013). Como nos demais eucariotos, essas proteínas parecem interagir para formar um complexo que ajuda *L. major* a lidar com o estresse replicativo e manter a integridade de seu genoma. Dada a importância da via de ATR para a estabilidade genômica, o trabalho apresentado nesta dissertação teve como objetivo caracterizar o gene anotado como Hus1 em *T. cruzi* (TritrypDB: TcCLB.466823.10) a fim de entender melhor os mecanismos de reparo de ssDNA neste parasito.

O primeiro passo no estudo da função deste gene no protozoário *T. cruzi* foi a construção de uma linhagem transfectante que apresenta níveis aumentados de TcHus1. A análise do perfil de crescimento do parasito superexpressor sugere que a expressão elevada desse gene não compromete as funções básicas da célula, uma vez que a linhagem pROCK-Hus1 apresentou a mesma taxa de crescimento que a linhagens selvagem e transfectada com o vetor vazio. Essa ausência de variação na taxa de crescimento do parasito após a transfecção já foi documentado para outros genes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (Machado-Silva *et al*, 2008; Nunes *et al*, 2011; Furtado *et al*, 2012; Aguiar *et al*, 2013; Bertoldo, 2014). Para verificar os níveis de transcritos de TcHus1 nas células estudadas, foi realizada uma PCR quantitativa em tempo real com amostras de cDNA das células superexpressora e transfectada com o vetor vazio, o que confirmou o aumento da expressão de TcHus1 nas células

pROCK-Hus1. De forma semelhante, populações superexpressando os genes TcXPC, TcCSB e TcPol η apresentaram, respectivamente, níveis 2,8X, 3,5X e 5X maiores desses transcritos quando comparadas com o parasito selvagem (de Moura *et al*, 2009; Mendes, 2015).

Para investigar a participação de TcHus1 no reparo de DNA em *T. cruzi*, foram realizadas uma série de experimentos nos quais as células foram submetidas ao tratamento com agentes genotóxicos que causam estresse replicativo.

O benzonidazol (BZ) é a principal droga usada no tratamento da doença de Chagas. É sabido que, dentro do parasito, o BZ induz à formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa sugere que o BZ induz, principalmente, à oxidação do *pool* de nucleotídeos (Rajão *et al*, 2013).

A camptotecina (CPT) é uma droga inibidora da atividade da enzima topoisomerase I. Durante a replicação do DNA, a ação da DNA-helicase gera um acúmulo de supertorções no DNA fita dupla à frente da forquilha de replicação. As topoisomerases atuam removendo essas supertorções, permitindo a progressão da forquilha (Pommier, 2009).

Ao entrar na célula, a cisplatina é ativada, tornando-se um composto altamente reativo que pode se ligar a DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios de membrana. Contudo, o principal mecanismo citotóxico da cisplatina é a sua capacidade de formar adutos de DNA. Os *crosslinks* inter e intracadeias entre purinas alteram a estrutura da hélice de DNA, que é reconhecida pela cinase ATR e corrigida pelas vias de reparo (O'Grady *et al*, 2014).

A hidroxureia (HU) é uma droga que inibe a atividade da enzima ribonucleotideo redutase, cuja função é catalisar a redução dos ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Ao inibir essa enzima, a HU depleta o *pool* de nucleotídeos intracelular, funcionando como um agente citotóxico fase S-específico, impedindo a síntese de DNA (Hanft *et al*, 2000).

O metil metano sulfonato (MMS) é um agente alquilante capaz de metilar tanto DNA fita simples quando fita dupla, gerando, principalmente, 1-metiladenina, 3-metilcitosina, 7-metilguanina e 3-metiladenina. Ao encontrar essas lesões, as polimerases replicativas param e, assim, esses adutos bloqueiam a síntese de DNA (Shivange *et al*, 2014).

Em *L. major* a superexpressão de Hus1 fez com que as células fossem mais resistentes ao tratamento com HU e MMS. Contudo, durante o tratamento com fleomicina, um radiomimético que causa DSB, as células superexpressoras se comportaram como as células controle. Esses resultados evidenciam que LmHus1 atua no reparo de ssDNA causado por estresse replicativo (Nunes *et al*, 2011). Por outro lado, as células com LmHus1 depletado não tiveram uma parada de crescimento, como apresentado pelas células selvagens, após o tratamento com HU, MMS ou CPT. Isso sugere que a ausência de LmHus1 impede o mecanismo de parada do ciclo celular na presença de danos do DNA (Damasceno *et al*, 2013).

Diferente do descrito em *L. major*, a superexpressão de TcHus1 não conferiu maior resistência aos parasitos pROCK-Hus1 quando tratados com HU ou MMS. Após o tratamento com 20 ou 30 mM de HU por 24 horas, os parasitos tratados conseguiram atingir o mesmo número de células na fase estacionária que os não tratados. De forma semelhante, após o tratamento com 1,5 mM de MMS, as células conseguiram crescer atingindo a mesma concentração das células não tratadas, sem que pROCK-Hus1 mostrasse qualquer vantagem durante o processo de recuperação.

O tratamento realizado com BZ fez com que as células parassem seu crescimento, mas não permitiu observar diferenças entre as três culturas testadas. Da mesma forma, o tratamento com a cisplatina não permitiu diferenciar o perfil de crescimento da cultura superexpressora e das culturas controles em qualquer dose testada, apesar de as doses de 100 e 150 μ M terem retardado o crescimento das células, quando comparado com as células não tratadas.

Os dois tipos de tratamento realizados com CPT alteraram o perfil de crescimento das células, mas sem permitir distinção entre os parasitos superexpressores de TcHus1 e os parasitos controle. A presença constante de 5 μ M dessa droga impediu o crescimento das células. No entanto, após a sua remoção do meio de cultura, os parasitos são capazes de retomarem o crescimento. Comportamento semelhante foi observado ao tratar formas epimastigotas da cepa *T. cruzi* Y com CPT. Na presença de 1 μ M dessa droga as células param de crescer, bloqueiam seu ciclo celular no fim da fase S/início da fase G2 e apresentam alterações estruturais, como cromatina não compactada e dispersa no núcleo. A remoção da droga permite que o parasito retome a progressão do ciclo celular e o crescimento,

além de recuperar suas características morfológicas. Contudo, o tratamento realizado com doses mais altas de camptotecina impediu essa reversão, sugerindo que os mecanismos de reparo de DNA não são eficientes para lidar com o estresse replicativo gerado por altas concentrações de CPT (Zuma *et al*, 2014).

A análise da progressão do ciclo celular do parasito selvagem tratado com BZ, cisplatina e MMS sugere um acúmulo de células na fase S, o que é condizente com o perfil obtido nas curvas de crescimento. Foram encontrados resultados semelhantes ao avaliar o efeito do tratamento com camptotecina na progressão do ciclo celular de *T. cruzi*. O número de células na fase S/G2/M aumentou em uma maneira dose-dependente, indicando uma parada do ciclo celular causada pelo estresse replicativo (Zuma *et al*, 2014).

Na tentativa de entender essa ausência de fenótipo apresentada pela célula superexpressora de TcHus1, durante os tratamentos com agentes genotóxicos, outra PCR quantitativa em tempo real foi realizada. Uma hora após terem sido submetidas ao tratamento com 1,5 mM de MMS, as células foram preparadas para a extração de RNA total e posterior síntese de cDNA. Estas amostras de cDNA foram utilizadas na RT-qPCR para mensurar os níveis de transcritos desse gene na presença e ausência de tratamento. Apenas os parasitos pROCK-Hus1 foram capazes de aumentar a expressão como resposta ao estresse gerado pelo MMS. O uso de episomas ou de vetores de integração em um *locus* alvo padrão pode remover sequências reguladoras do seu contexto cromossômico normal, interferindo na regulação da expressão gênica (Clayton e Shapira, 2007). Dessa forma, o aumento de transcritos de TcHus1 apenas no parasito superexpressor pode ser devido à falta de controle na regulação da expressão gênica nessa célula.

Nos tripanossomatídeos as ORFs (em inglês, *open reading frames*) são transcritas como mRNAs policistrônicos precursores. A maturação de mRNAs individuais a partir desses pre-mRNAs policistrônicos ocorre via duas reações de processamento acopladas: o *trans splicing*, que consiste na adição do *spliced leader* (SL) na extremidade 5', e a clivagem seguida de poliadenilação na extremidade 3'. Devido a essa transcrição policistrônica e a ausência de promotores para a RNA polimerase II em genes que codificam proteínas, acredita-se que a regulação da

expressão gênica ocorra principalmente em nível pós-transcricional, nesses organismos (Haile e Papadopoulou, 2007).

As regiões 3' e 5'-UTR (em inglês, *untranslated regions*) estão envolvidas nos mecanismos de estabilização, desestabilização e regulação dos níveis de mRNA em *T. cruzi* (Kramer e Carrington, 2011). Por meio da interação com proteínas de ligação ao RNA (RBPs), elementos regulatórios presentes nestas regiões controlam a estabilidade e a tradução do mRNA alvo (Araújo e Teixeira, 2011). Diversos estudos têm mostrado que modificações nestas regiões regulatórias levam à alteração na expressão de vários genes em *T. cruzi* (Weston *et al*, 1999; Coughlin *et al*, 2000; Di Noia *et al*, 2000; da Silva *et al*, 2006; Jager *et al*, 2008; Rodrigues *et al*, 2010; Araújo *et al*, 2011; Bayer-Santos *et al*, 2012). O vetor pROCKhigro se integra no gene da β -tubulina, possui um promotor ribossômico e regiões 5'-UTR de TcP2 β e 3'-UTR de GAPDHII (DaRocha *et al*, 2004). Dessa forma, o uso desse vetor modifica as regiões 3' e 5'-UTR do gene TcHus1 no parasito transfectado causando descontrole na regulação da sua expressão, como pode ser visto a partir do resultado obtido da RT-qPCR após o tratamento com MMS. Além disso, esse dado sugere que a expressão do gene TcHus1 é bastante regulada em *T. cruzi*.

Em *L. major*, Hus1 está presente em menores níveis quando comparado com Rad9 e Rad1 sendo, portanto, a subunidade limitante para a formação do complexo 9-1-1 (Nunes *et al*, 2011). Por isso, a superexpressão apenas deste gene confere resistência ao tratamento com drogas que causam estresse replicativo (Damasceno *et al*, 2013). Provavelmente, em *T. cruzi* a expressão de cada uma dessas proteínas é bastante regulada. Sendo assim, o aumento dos níveis de apenas uma das subunidades não seria suficiente para gerar resistência ao estresse replicativo oriundo dos tratamentos testados neste trabalho. Pelo fato da regulação gênica, em tripanossomatídeos, ocorrer principalmente por meio de eventos pós-transcricionais, o aumento no nível de transcritos do gene TcHus1 detectado pela RT-qPCR não implica, necessariamente, em um aumento no nível da proteína Hus1. Assim, a ausência de fenótipo das células pROCK-Hus1 durante o estresse replicativo gerado pelas drogas descritas acima, não é suficiente para afirmar que TcHus1 não está envolvido na via de ativação da cinase ATR como descrito para outros eucariotos, incluindo a *L. major*. Algum mecanismo regulatório poderia estar impedindo a

conversão de todo esse mRNA em proteína e, dessa forma, os parasitos pROCK-Hus1 apresentariam os mesmos níveis da proteína Hus1 que os parasitos controle. Para confirmar essa hipótese, novos experimentos serão necessários, como por exemplo testar os extratos proteicos dessas células com o anticorpo anti-Hus1 a fim de determinar o nível dessa proteína nos parasitos superexpressores e selvagens. Além disso, é necessário determinar se todas as cópias de TcHus1 presentes no genoma de *T. cruzi* CL Brener são funcionais. Uma vez que o gene clonado no parasito pROCK-Hus1 não é igual a nenhuma das oito isoformas, a proteína codificada nestas células pode estar não funcional.

Ao anotar o genoma da cepa CL Brener, El- Sayed e colaboradores (2005) mostraram que a via de NHEJ não está presente nesses parasitos para reparar quebras de fitas duplas no DNA. Uma linhagem de CL Brener superexpressora do gene TcRad51, que codifica a principal proteína envolvida na recombinação homóloga, se mostrou mais resistente ao tratamento com altas doses de radiação gama do que as culturas selvagens (Regis-da-Silva *et al*, 2006). Já parasitos heminocautes para esse gene apresentam uma retomada do crescimento, após a irradiação, atrasada quando comparada com os parasitos selvagens (Passos-Silva, 2010). Esses resultados mostram a importância dessa via de reparo para o *Trypanosoma cruzi*.

Experimentos realizados no nosso laboratório mostram que a linhagem híbrida CL Brener, após o tratamento com radiação gama, consegue retomar o crescimento antes que cepas de *T. cruzi* tipo I ou tipo II. Entretanto, o mesmo comportamento não é observado quando essas células são tratadas com MMS. Neste caso, todas as linhagens testadas respondem de maneira similar ao estresse replicativo gerado por esta droga (Bruno Marçal Repolês, dados não publicados).

Neste contexto, seria possível sugerir que o *T. cruzi* CL Brener seria uma cepa mais eficiente em lidar com lesões que causam DSBs do que com lesões que levam à formação de ssDNA, tornando a via de ATR secundária no mecanismo de reparo deste parasito. Isto poderia explicar a razão das células superexpressoras de TcHus1 apresentarem a mesma taxa de crescimento que células selvagens quando submetidas a esse tipo de estresse. Aparentemente, *Leishmania* apresenta o comportamento oposto. Uma característica do genoma deste parasito é a sua

plasticidade, demonstrada pela variação no número de cópias de cromossomos, arranjos de genes duplicados em tandem e fenômeno da amplificação gênica (Sterkers *et al*, 2012). A amplificação é um marco de instabilidade genômica, sendo necessário a ocorrência de intermediários como DSB e ssDNA. Damasceno e colaboradores (2013) sugerem que as proteínas LmHus1, LmRad9 e LmRPA estão envolvidas nos mecanismos de amplificação neste protozoário. Por outro lado, uma linhagem de *L. major* superexpressora da LmExo1, uma exonuclease 5'→3' que participa do processamento das DBS durante a recombinação homóloga, não se mostrou mais resistente que a linhagem selvagem ao tratamento com o radiomimético zeocina (Bertoldo, 2014). Dessa forma, é possível especular que em *T. cruzi* a recombinação homóloga seria uma via preferencial, enquanto *Leishmania* optaria pela ativação de ATR para promover a amplificação gênica. Contudo, para verificar esta hipótese mais experimentos serão necessários. Como exemplo, seria de grande utilidade construir células com níveis aumentados e diminuídos de outros genes que codificam para proteínas envolvidas nessas duas vias, em ambos os parasitos, ou mesmo testar o efeito da superexpressão de TcHus1 e TcRad51 em outras linhagens de *Trypanosoma cruzi*.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho não foi possível concluir se a função do gene Hus1 em *Trypanosoma cruzi*, como descrito nos demais eucariotos, é responder ao estresse replicativo, por meio da formação do complexo 9-1-1 para promover a ativação da cinase de *checkpoint* ATR. Mais estudos serão necessários para compreender a função e a importância dessa via no mecanismo de reparo de DNA desse protozoário, o que poderá permitir a caracterização da proteína TcHus1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.H.N.; FURTADO, C.; REPOLÊS, B.M.; RIBEIRO, G.A.; MENDES, I.C.; PELOSO, E.F.; GADELHA, F. R.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.J.; TEIXEIRA, S.M.R.; VIEIRA, L.Q.; GUARNERI, A.A.; ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R. (2013). Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7, 6, p. 1-13, 2013.
- ARAÚJO, P.R.; BURLE-CALDAS, G.A.; SILVA-PEREIRA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; DAROCHA, W.D.; TEIXEIRA, S.M. (2011). Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. *Parasitology International*, 60, p. 161–169, 2011.
- ARAÚJO, P.R.; TEIXEIRA, S.M. (2011). Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, p. 257–266, 2011.
- AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.J.; MACHADO, C. R. (2003). Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, 164, p.117-126, 2003.
- BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, p.498-506, 2003.
- BAYER-SANTOS, E.; GENTIL, L.G.; CORDERO, E.M.; CORRÊA, P.R.C.; DA SILVEIRA, J.F. (2012). Regulatory elements in the 3'- untranslated region of the GP82 glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica*, 123, p. 230– 233, 2012.
- BERMUDEZ, V. P.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; CESARE, A. J.; MANIWA, Y.; GRIFFITH, J. D.; HURWITZ, J.; SANCAR, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex *in vitro*. *PNAS*, 100, 4, p. 1633-1638, 2003.
- BERTOLDO, W.R. (2014). Caracterização e expressão do suposto homólogo do gene Exonuclease I (Lm,Exol) de *Leishmania major*. *Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Uberaba, Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. (2010). Chagas Cardiomyopathy—Where Do We Stand After a Hundred Years?. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52, p. 300-316, 2010.

- BRENER, Z.; CHIARI, E. (1963). Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 5, p.220-224, 1963.
- BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. (2000a). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, 30, p. 35-44, 2000.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. (2000b). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111, p. 95–105, 2000.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, 31, p.1218-1226, 2001.
- BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*, 5, p.419-427, 2003.
- CASADEI, D (2010). Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 42, p.3354–3359, 2010.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention
Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
Acesso em: 25 de fevereiro de 2015.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, p.159-218, 1909.
- CHATELAIN, E (2014). Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *Journal of Biomolecular Screening*, p. 1-14, 2014.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 156, p. 93–101, 2007.
- COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275, p. 12051–12060, 2000.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115, p.5-13, 2010.

- DA SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; TEIXEIRA, S.M. (2006). Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Parasitology*, 36, p. 87–96, 2006.
- DAMASCENO, J. D.; NUNES, V. S.; TOSI, L. R.O. (2013). LmHus1 is required for the DNA damage response in *Leishmania major* and forms a complex with an unusual Rad9 homologue. *Molecular Microbiology*, 90, 5, p.1074–1087, 2013.
- DAROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; PIRES, S.F.; FREITAS, J.M.; MACEDO, A.M.; VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J.; TEIXEIRA, S.M.R. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitology Research*, 92, p. 113–20, 2004.
- DE BOER, J. G. (2002). Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutation Research*, 509, p. 201-210, 2002.
- DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2, 24, 2006.
- DE MOURA, M.B.; SCHAMBER-REIS, B.L.F.; PASSOS-SILVA, D.G.; RAJÃO, M.A.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.J.; TEIXEIRA, S.M.R.; MACHADO, C.R. (2009). Cloning and Characterization of DNA Polymerase η from *Trypanosoma cruzi*: Roles for Translesion Bypass of Oxidative Damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, p. 375-386, 2009.
- DE SOUZA, W (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 1, p. 89-100, 2009.
- DELACROIX, S.; WAGNER, J. M.; KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO K.; KARNITZ, L.M. (2007). The Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & Development*, 21, p.1472–1477, 2007.
- DERKS, K. W.J.; HOEIJMAKERS, J. H.J.; POTHOF, J. (2014). The DNA damage response: The omics era and its impact. *DNA Repair*, 19, p. 214–220, 2014.
- DI NOIA, J.M.; D'ORSO, I.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 275, p. 10218–10227, 2000.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, 3, p.251-261, 2005.

- DORÉ, A. S.; KILKENNY, M.L.; RZECHORZEK, N. J.; PEARL, L.H. (2009). Crystal Structure of the Rad9-Rad1-Hus1 DNA Damage Checkpoint Complex—Implications for Clamp Loading and Regulation. *Molecular Cell*, 34, p. 735–745, 2009.
- ELLISON, V.; STILLMAN, B. (2003). Biochemical Characterization of DNA Damage Checkpoint Complexes: Clamp Loader and Clamp Complexes with Specificity for 5' Recessed DNA. *Plos Biology*, 1, 2, p.231-243, 2003.
- EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; LENA, A; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; FRANCO, J.; JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; AKEN, S.V.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309, 5733, p. 409-415, 2005.
- FURTADO, C.; KUNRATH-LIMA, M.; RAJÃO, M.A.; MENDES, I.C.; MOURA, M.B.; CAMPOS, P.C.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.J.; TEIXEIRA, S.M.R.; HOUTEN, B.V.; MACHADO, C.R. (2012). Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 7, 8, p. 1-11, 2012.
- HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 10, p. 569–577, 2007.
- HANFT, V. N.; FRUCHTMAN, S. R.; PICKENS, C. V.; ROSSE, W.F.; HOWARD, T. A.; WARE, R.E. (2000). Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *BLOOD*, 95, 11, p. 3589- 3593, 2000.
- HARPER, J. W.; ELLEDGE, S.J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell Perspective*, 28, p. 739-745, 2007.

- HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246,4930, p.629-634, 1989.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, p.366-374, 2001.
- IYAMA, T.; WILSON III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12 p. 620– 636, 2013.
- JAGER, A.V.; MUJA, R.P.; CAMPETELLA, O. (2008). Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. *FEMS Microbiology Letters*, 283, p. 182–188, 2008.
- KRAMER, S.; CARRINGTON M. (2011) Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability, and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitology*, 27, p. 23–30, 2011.
- LEE, J.; KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, p. 28036–28044, 2007.
- LEWINSOHN, R. (2003). Prophet in His Own Country: Carlos Chagas and the Nobel Prize. *Perspectives in Biology and Medicine*, 46, 4, p.532-549, 2003.
- LI, G.M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18, p.85-98, 2008.
- LOPEZ-CONTRERAS, A.J.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. (2012). Signalling DNA Damage. In: Protein Phosphorylation in Human Health. *InTech - Open Science Open Minds*, p.233-262, 2012.
- MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S.D.J. (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, p.1-16, 2002.
- MACEDO, A. M.; MACHADO, C.R; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S.D.J. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 1, p.1-12, 2004.
- MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, p.7396-7401, 2001.
- MACHADO-SILVA, A.; TEIXEIRA, S.M.R.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; MCCULLOCH, R.; MACHADO, C.R. (2008). Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: Heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma*

- cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene*, 411, P. 19–26, 2008.
- MAJKA, J.; BURGERS, P. M. J. (2003). Yeast Rad17-Mec3-Ddc1: A sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *PNAS*, 100, 5, p.2249-2254, 2003.
- MANKE, I.A.; LOWERY, D.M.; NGUYEN, A.; YAFFE, M.B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, 302, p. 636–639, 2003.
- MARÉCHAL, A.; ZOU, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Research*, 25, p. 9-23, 2015.
- MAZOUZI, A.; VELIMEZI, G.; LOIZOUN, J.I. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*, 329, p. 85–93, 2014.
- MENDES, I.C. (2015). O papel dos genes TcCSB e TcXPC no metabolismo de DNA de *Trypanosoma cruzi*. *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MOMEN, H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94, 1, p.181-184, 1999.
- MORDES, D. A.; NAM, E. A.; CORTEZ, D. (2008). Dpb11 activates the Mec1–Ddc2 complex. *PNAS*, 105, 48, p. 18730–18734, 2008.
- NOUSPIKEL, T. (2009). DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cellular and molecular life sciences*, 66, 6, p. 994-1009, 2009.
- NUNES, V. S.; DAMASCENO, J. D.; FREIRE, R.; TOSI, L. R.O. (2011). The Hus1 homologue of *Leishmania major* encodes a nuclear protein that participates in DNA damage response. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 177, p. 65–69, 2011.
- O'GRADY, S.; FINN, S.P.; CUFFE, S.; RICHARD, D.J.; O'BYRNE, K.J.; BARR. M.P. (2014). The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung câncer. *Cancer Treatment Reviews*, 40, p. 1161–1170, 2014.
- PAHO/WHO – Pan American Health Organization/ World Health Organization
Disponível em:
<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Chagas.pdf>
Acesso em: 05 de janeiro de 2015.

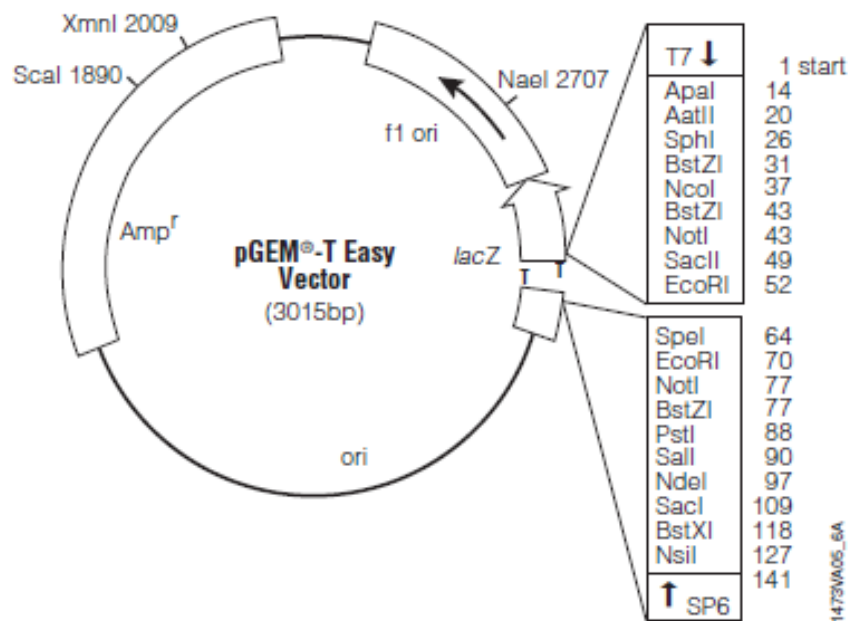
- PARRILLA-CASTELLAR, E. R.; ARLANDER, S.J.H.; KARNITZ, L (2004). Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. *DNA Repair*, 3, p. 1009–1014, 2004.
- PASSOS-SILVA, D.G. (2010). Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA. *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PATRONO, C.; STERPONE, S.; TESTA, A.; COZZI, R. (2014). Polymorphisms in base excision repair genes: Breast cancer risk and individual radiosensitivity. *World Journal of Clinical Oncology*, 10, 5(5), p.874-882, 2014.
- POMMIER, Y. (2009). DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition. *Chemical Reviews*, 109, p. 28-94-2902, 2009.
- RAJÃO, M. A.; FURTADO, C.; ALVES, C.L.; PASSOS-SILVA, D.G.; DE MOURA, M.B.; SCHAMBER-REIS, B.L.; KUNRATH-LIMA, M. ZUMA, A.A.; VIEIRA-DA-ROCHA, J.P.; GARCIA, J.B.F.; MENDES, I. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; SOUZA-PINTO, N. C.; MEDEIROS, M. H. G.; CRUZ, A. K.; MOTTA, M. C. M.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C.R. (2013). Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55, p. 309- 321, 2013.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, p. 275–291, 2012.
- RAUEN, M.; BURTELOW, M.A.; DUFAULT, V.M.; KARNITZ, L.M. (2000). The Human Checkpoint Protein hRad17 Interacts with the PCNA-like Proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 38, p. 29767–29771, 2000.
- REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J.M.; PASSOS-SILVA, D.G.; FURTADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L.; PEREIRA, M. T.; DAROCHA, W. D.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; HOFFMANN, J.S.; CAZAUX, C.; PENA, S.D.J.; TEIXEIRA, S.M.R.; MACHADO, C.R. (2006). Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 149, p. 191–200, 2006.
- ROBELLO, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; ALVAREZ-VALIN, F. (2000). Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene*, 246, p.331-338, 2000.

- RODRIGUES, D.C.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; URMENYI, T.P. (2010). *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Experimental Parasitology*, 126, p. 245–253, 2010.
- ROOS-MATTJUS, P.; HOPKINS, K.M.; OESTREICH, A.J.; VROMAN, B.T.; JOHNSON, K.L.; NAYLOR, S.; LIEBERMAN, H.B.; KARNITZ, L.M. (2003). Phosphorylation of human Rad9 is required for genotoxin-activated checkpoint signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, p. 24428–24437, 2003.
- SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, p. 39–85, 2004.
- SERRANO, D.; D'AMOURS, D. (2014). When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage. *Systems and Synthetic Biology*, 8, p.195–203, 2014.
- SHIVANGE, G.; KODIPELLI, N.; MONISHA, M.; ANINDYA, R. (2014). A role for *Saccharomyces cerevisiae* Tpa1 protein in direct alkylation repair. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 1-19, 2014.
- SRIVASTAVA, N.; GOCHHAIT, S.; DE BOER, P.; BAMEZAI, R.N.K. (2009). Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research*, 681, p. 180–188, 2009.
- STERKERS, Y.; LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; PAGES, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, 86, p. 15–23, 2012.
- TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6, 8, p. 1-13, 2012.
- VENCLOVAS, C.; THELEN, M.P. (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Research*, 28, p. 2481–2493, 2000.
- WESTON, D.; LA FLAMME, A.C.; VAN VOORHIS, W.C. (1999). Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 102, p. 53–66, 1999.
- YAO, Y.; DAI, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5, p. 1-17, 2014.

- YI, C.; HE, C. (2013). DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, p.1-18, 2013.
- YU, X.; CHINI, C.C.; HE, M.; MER, G.; CHEN, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, 302, p.639–642, 2003.
- ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, 16, 1, p. 1-8, 2014.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; *et al* (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, p.1051-1054, 2009.
- ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, p. 240-253, 2012.
- ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, 300, p.1542-1548, 2003.
- ZUMA, A.A.; MENDES, I.C.; REIGNAULT, L.C.; ELIAS, M.C.; DE SOUZA, W.; MACHADO, C.R.; MOTTA, M.C.M. (2014). How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 193, p. 93–100, 2014.

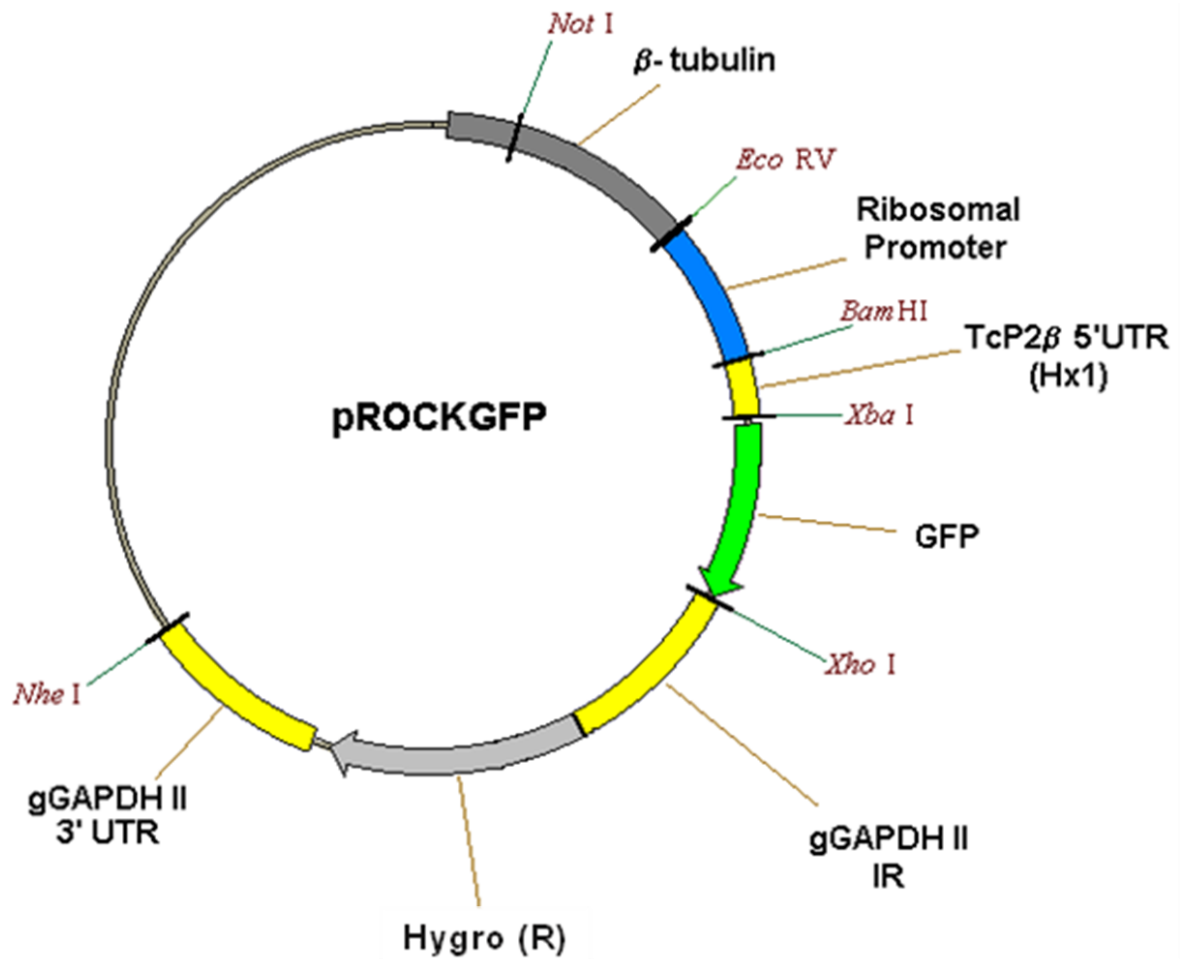
8. ANEXOS

8.1. ANEXO1: Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega)



Desenho esquemático do vetor pGEM-T Easy mostrando as características do vetor como a presença da origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência a ampicilina (Amp^R), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem que se localiza na região codificadora da enzima galactosidase. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>.

ANEXO 8.2: Mapa do vetor pROCKhigro



Desenho esquemático do vetor pROCKhigro. Esse plasmídeo possui região com homologia ao gene da β -tubulina, um promotor ribossômico e regiões 5' UTR de TcP2 β e 3' UTR de GAPDHII que auxiliam na expressão das proteínas de interesse, no caso, Hus1, e da resistência à higromicina (DaRocha *et al*, 2004).