

Viviane Grazielle da Silva

Dissertação de Mestrado

Estudo do papel das proteínas MSH2 e
MSH6 na resposta a danos no DNA
em *Trypanosoma cruzi*

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte, MG

2011

Viviane Grazielle da Silva

Estudo do papel das proteínas MSH2 e
MSH6 na resposta a danos no DNA
em *Trypanosoma cruzi*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ORIENTADORA: SANTUZA MARIA RIBEIRO TEIXEIRA

CO-ORIENTADOR: CARLOS RENATO MACHADO

PRISCILA CARNEIRO CAMPOS

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte, MG

2011



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 VIVIANE GRAZIELLE DA SILVA. Aos sete dias do mês de fevereiro de 2011 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, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Estudos sobre o duplo papel da proteína MSH2 na resposta a danos no DNA em *Trypanosoma cruzi*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, 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. Silvane Maria Fonseca Murta, do Centro de Pesquisa René Rachou, aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Priscilla Carneiro Campos, Coorientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Carlos Renato Machado, Coorientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada e Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2011.



Dra. Silvane Maria Fonseca Murta – CPqRR

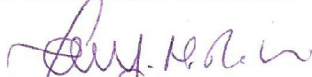


Dra. Fabiana Simão Machado – UFMG




Dra. Priscilla Carneiro Campos – Coorientadora - UFMG

Dr. Carlos Renato Machado – Coorientador - UFMG



Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira – Orientadora - UFMG


 Prof. Maria Elena de Lima Perez Garcia
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

À minha família: mamãe, papai e Felipe. Ser merecedora do orgulho de vocês é o meu maior objetivo

Agradecimentos

À profª Santuza por ter me recebido em seu laboratório desde a iniciação científica. Pela orientação e contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao prof. Carlos Renato (Nem) pelas idéias mirabolantes que no final estavam certas. Rs

À Pri, por ter me orientado desde os primeiros passos na bancada. Por tentar me acalmar nos momentos em que eu surto. Te admiro demais. Espero um dia ser minimamente parecida com você.

À Profª Patiu pelo bom humor e por sempre dar críticas construtivas.

À Profª Daniella Bartholomeu e seus alunos por toda a ajuda e dicas valiosas.

À Camila (Cá) e à Júlia (Ju), minhas alunas lindas. Vocês são brilhantes e vão crescer cada vez mais. Espero ter contribuído minimamente para isso. Muito obrigada por toda a ajuda.

À Clara Guerra e Fernanda Costal pela ajuda na imunização dos camundongos.

Ao Wanderson pelas ajudas lá do Paraná.

Aos colegas do laboratório pela convivência, pela ajuda, pela companhia nos almoços do bandeijão (rs), por tornarem os dias de estresse mais suportáveis: Ramon, Pati, Jarina, Juliano, Nina, Lu, Bá, Fernanda, Mari, Rita; À Gabi e à Nati (e baby) a amizade de vocês é fundamental para mim. Ao Elimar, por estar sempre disposto a ajudar.

À minha família, que sempre esteve por perto torcendo pelo meu sucesso. Mãe, sem a sua ajuda eu não seria nada. Obrigada por ser também a minha melhor amiga; Pai, por repetir para todos o título da minha monografia sem nem saber o que significa (rs); Felipe, Deus não poderia ter me dado um irmão melhor, meu amor por você é infinito. A todos os meus familiares que são a base do meu crescimento.

Ao Pedro, pelo amor e carinho dos últimos dois anos e meio. Por ter me apoiado desde o início, por suportar e entender os meus momentos de ausência. Pelos sorrisos roubados. Pelos abraços. Pelas broncas e puxões de orelha. Não digo que não teria conseguido sem você, mas você torna a minha vida muito mais doce. Te amo!!!

Às minhas amigas desde a época do colégio, por provar que amizades se mantêm mesmo com a distância, muito trabalho e raros encontros: Nati, Olívia, Mari, Taísa, Marcinha, Cândida.

Aos amigos da Biologia: “Um dia foram colegas e hoje são amigos” (Ju, 2008). Esses quatro anos não teriam deixado tanta saudade se não fosse o jeito especial de cada um de vocês. Saudades de todas as nossas festas e de estudar até morrer na véspera das provas. Renêêêêê (lixo), no way vc ficar livre de mim; Ju; Ricardo; Dê; Lígia; Ju Ladeira; Robson; Má; Lice...

Ao pessoal do laboratório de Micologia e Micotoxinas da Funed pela minha primeira experiência em laboratório: Jovita (chefe querida), Vanessa, Guilherme, Mabel, Aninha...

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Aos colegas de Bases. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, apresenta uma estrutura populacional altamente heterogênea, caracterizada pela ocorrência de diferentes cepas com características morfológicas e bioquímicas distintas. Essa estrutura populacional complexa pode estar relacionada às diferentes manifestações clínicas da doença, à capacidade do parasito de infectar diferentes hospedeiros e à distribuição geográfica apresentada pelas cepas. A variabilidade intra-específica é resultante de um balanço entre a manutenção da estabilidade genômica e a geração de variabilidade genética. Diversos mecanismos estão envolvidos na manutenção deste equilíbrio, entre eles, o sistema de reparo de DNA por erros de pareamento ou MMR. Estudos iniciais sobre o MMR em *T. cruzi* levaram à descoberta de que o MSH2 – a principal proteína do MMR – existe em três isoformas diferentes no parasita, denominadas TcMSH2 A, B e C, de acordo com os dados de seqüências de *Tcmsh2* presente no genoma de diferentes cepas. Evidências experimentais indicam que cepas apresentando a isoforma TcMSH2 A apresentam um MMR mais eficiente quando comparadas a cepas que possuem as isoformas TcMSH2 B e/ou C. Essas observações nos levaram a especular que as diferenças na atividade do MMR poderiam ser responsáveis pela menor variabilidade genética encontrada em cepas pertencentes aos haplogrupos de MSH2-A. Com o objetivo de investigar o papel da proteína MSH2, foi planejada a obtenção de parasitas nocautes para este gene. Análises dos parasitas heminocautes de *Tcmsh2* demonstraram que, apesar destes não apresentarem diferenças frente ao tratamento com agentes mutagênicos, estes são mais susceptíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio e acumulam mais 8-oxoguanina no DNA mitocondrial do que parasitas selvagens. Para verificar o papel de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo, no presente trabalho foram feitos experimentos buscando elucidar a localização da proteína no parasita. Para tal, anticorpos produzidos em camundongos contra uma forma recombinante de TcMSH2 foram utilizados em ensaios de imunolocalização e *western blot*. Esses experimentos mostraram que os soros produzidos reconhecem proteínas nativas de *T. cruzi* apresentando massas moleculares diferentes, e ainda que essas proteínas

apresentam localização subcelular distintas. Isso nos levou a propor que a forma de menor massa molecular, localizada em extrato protéico correspondente à fração citoplasmática, estaria envolvida no reparo do DNA mitocondrial. Paralelamente, para avaliar se o papel de TcMSH2 na resposta a danos oxidativos dependia de outras proteínas da via de MMR, iniciamos a caracterização das mesmas. Para tal, foram geradas construções para deleção do gene *Tcmsh6*. Como estratégia adicional, a fim de elucidar o papel de TcMSH6, demos início, também, a experimentos tentando determinar a sua localização subcelular, através da sua expressão em fusão com RFP.

Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease, presents a highly heterogeneous population structure, characterized by the occurrence of different strains with different biochemical and morphological characteristics. This complex population structure may be correlated with different clinical manifestations of disease, parasite's ability to infect different hostages and geographical distribution presented by the strains. Intra-specific variability can be a result of a balance between genomic stability and generation of genetic variability. Several mechanisms can be involved in maintaining this balance, for example, DNA mismatch repair – MMR. Initial studies on the MMR in *T. cruzi* led to the discovery that MSH2 - the main protein of the MMR - exists in three isoforms in the parasite, named TcMSH2 A, B and C, according to *Tcmsh2* data sequences present in the genome of different strains. Experimental evidence indicates that strains presenting the isoform TcMSH2 A have a more efficient MMR when compared to strains that have TcMSH2 B and/or C isoforms. These observations led us to speculate that differences in MMR activity could account for a lower genetic variability found in strains belonging to MSH2-A haplogroup. In order to investigate the role of the MSH2 protein, we tried to obtain knockout parasites for this gene. Single knockouts parasites are more susceptible to hydrogen peroxide treatment and accumulate more 8-oxoguanine in mitochondrial DNA than wild type parasites, despite the fact that there are no differences after treatment with mutagenic agents. With the aim to better investigate the role of MSH2 in response to oxidative stress, in the present work we investigated MSH2 cellular localization. Antibodies raised against a recombinant form of MSH2 produced in mice were used in immunolocalization and western blot assays. Those experiments have shown that the serum produced in mice is able to recognize the native protein in two different molecular weight proteins, with different subcellular localization. Based on that, we have speculated that the lower molecular weight protein, which is localized at extract fraction correspondent to the cytoplasm, could be involved in mitochondrial DNA repair. Simultaneously, to investigate if TcMSH2 role in response to oxidative damage is

dependent of other MMR proteins, we began to characterize them. Two different strategies were used to knockout *Tcmsh6*. And we also tried to elucidate TcMSH6 subcellular localization after its over-expression in fusion with RFP.

Figura 1: Representação das principais formas ao longo do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3: Distribuição geográfica das diferentes linhagens de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 4: Transcrição e processamento de mRNA em Tripanosomatídeos.....	9
Figura 5: O Sistema de Reparo de Erros de Pareamento em procariotos e eucariotos..	13
Figura 6: Plasmídeo para expressão da proteína TcMSH2B truncada.....	32
Figura 7: Expressão da proteína TcMSH2B recombinante em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS e avaliação de sua solubilidade..	34
Figura 8: Purificação de TcMSH2B por cromatografia de afinidade..	35
Figura 9: Quantificação da proteína TcMSH2B recombinante purificada e resultado da imunização em camundongos.....	37
Figura 10: Reatividade de TcMSH2B recombinante e nativa com soro de camundongos imunizados.....	38
Figura 11: Proteínas reconhecidas pelo soro anti-MSH2 no extrato celular de <i>T. cruzi</i> apresentam localização celular em compartimentos distintas.....	40
Figura 12: Expressão de TcMSH2 em CL Brener selvagem e parasitos heminocautes <i>Tcmsh2^{+/-}</i>	41
Figura 13: Plasmídeo para localização subcelular da proteína TcMSH6 em fusão com RFP.....	43
Figura 14: Seqüência do vetor pTREX_Neo_MSH6:RFP.....	44
Figura 15: Transfecção de epimastigotas de CL Brener selvagem com pTREXRFP.....	45
Figura 16: Estratégias para deleção gênica em <i>T. cruzi</i>	48
Figura 17: Caracterização de parasitas transfectados com a construção para deleção de TcMSH6	49
Tabela 1: Descrição de seqüência e sentido dos iniciadores utilizados no trabalho	30

- ATP** – adenosina trifosfato
- BER** – reparo de excisão de base, do inglês *base excision repair*
- BSA** – soro albumina bovina
- cDNA** – DNA complementar
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- dNTP** – 2'-desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato
- DTU** – Unidade Discreta de Tipagem
- EXO I** – exonuclease I
- GAPDH** – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GFP** – proteína fluorescente verde, do inglês *green fluorescent protein*
- gp** – glicoproteína
- IDL** – alça de inserção/deleção
- IPTG** – isopropil tio-β-galactosídeo
- IR** – região intergênica, do inglês *intergenic region*
- Kb** – quilobases
- KDa** – quilodaltons
- kDNA** – DNA de cinetoplasto
- kV** – quilovolts
- M** – molar
- Mb** – Mega bases
- mg** – miligrama
- mL** – mililitro
- MLH** – homólogo de MutL em Eucariotos
- mM** – milimolar
- MMR** – reparo de erros de pareamento, do inglês *mismatch repair*
- mRNAs** – RNAs mensageiros
- ms** – milisegundos
- MSH** – homólogo de mutS em Eucariotos
- mtDNA** – DNA mitocondrial
- MutH** – proteína H do MMR de Procariotos
- MutL** – proteína L do MMR de Procariotos

- MutL α** – heterodímero formado por MLH1 e PMS2 em eucariotos
- MutL β** – heterodímero formado por MLH1 e PMS1 em eucariotos
- MutL γ** – heterodímero formado por MLH1 e MLH3 em eucariotos
- MutS** – proteína S do MMR de procariotos
- MutS α** – heterodímero formado por MSH2 e MSH6 em eucariotos
- MutS β** – heterodímero formado por MSH2 e MSH3 em eucariotos
- NER** – reparo de excisão de nucleotídeo, do inglês *nucleotide excision repair*
- nm** – nanômetro
- OD** – densidade óptica
- pb** – pares de bases
- PBS** – tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*
- PCNA** – antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*
- PCR** – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
- pH** – potencial hidrogeniônico
- PM** – peso molecular
- PMS** – homólogo de MutL em Eucariotos
- pPy** – polipirimidina
- RNA** – ácido ribonucléico
- ROS** – espécie reativa de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*
- q.s.p.** – quantidade suficiente para
- RFP** – proteína fluorescente vermelha, do inglês *red fluorescent protein*
- RPA** – proteína de replicação A, do inglês *replication protein A*
- rpm** – rotações por minuto
- SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SL** – *spliced leader*
- SNP** – polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphism*
- SSB** – proteína de ligação do DNA de fita simples, do inglês *single strand binding*
- U** – unidades
- UTR** – região não traduzida, do inglês *untranslated region*

UV – ultravioleta

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	1
1.2	A variabilidade genética intra-específica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.3	Genoma e expressão gênica em <i>T. cruzi</i>	6
1.4	Manipulação gênica em Tripanosomatídeos.....	10
1.5	Os Sistemas de Reparo de DNA	12
1.6	O MMR e a geração de variabilidade genética em <i>T. cruzi</i>	16
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Purificação de DNA Plasmidial.....	21
3.2	Reações de digestão enzimática.....	21
3.3	Purificação de fragmentos obtidos por PCR ou digestão enzimática e ligação em plasmídeos.....	22
3.4	Transformação bacteriana	22
3.5	Seleção de clones bacterianos por PCR de colônia.....	23
3.6	Produção de proteína recombinante e anticorpos policlonais.....	23
	3.6.1- Construção de vetor para expressão de TcMSH2Bt em fusão com poli-histidinas C-terminal	23
	3.6.2- Expressão da proteína TcMSH2Bt recombinante.	24
	3.6.3- Purificação da proteína TcMSH2Bt recombinante por cromatografia de afinidade	25
	3.6.4- Imunização de camundongos Balb/C com MSH2Bt recombinante.....	26
3.7	Western blot	26
3.8	Preparação de extratos protéico de <i>T. cruzi</i>	26
3.9	Construção de vetor para localização de TcMSH6	27
3.10	Construção de vetores para deleção gênica	27
3.11	Transfecção de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
3.12	Análise por microscopia de fluorescência de parasitas transfectados.....	29
4.	RESULTADOS.....	31
4.1	Expressão TcMSH2 recombinante e produção de anticorpos policlonais anti-TcMSH2	31
4.2	Localização subcelular de TcMSH6	42
4.3	Deleção gênica de outros genes da via de MMR.....	46

5.3	DISCUSSÃO	50
5.1	O MMR e o papel da proteína TcMSH2	50
5.2	O papel de outras proteínas da via de MMR em <i>T. cruzi</i>	55
6.	PERSPECTIVAS	58
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Os estudos sobre a Doença de Chagas iniciaram-se em 1909, quando Carlos Chagas publicou suas descobertas sobre uma nova doença, uma tripanossomíase, que veio a receber seu nome (Chagas C., 1909). Desde então, vários grupos de pesquisa estiveram envolvidos na caracterização da doença e de seu agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, à qual pertencem outros parasitas causadores de doenças como o *Trypanosoma brucei*, causador da Doença do Sono (ou Trypanosomíase Africana), além de várias espécies do gênero *Leishmania*, causadoras de diferentes formas clínicas de Leishmaniose. Dentre as características comuns a esses parasitas estão a presença de um único flagelo e de uma organela exclusiva, o cinetoplasto, onde está concentrado o genoma mitocondrial (kDNA). No aspecto biológico, uma característica marcante é que todos têm a capacidade de se diferenciar ao longo do seu ciclo de vida. As mudanças mais marcantes ocorrem quando mudam de hospedeiro (Souza *et al.*, 2010).

Ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* são encontradas três formas morfológicas distintas (**Figura 1**): (a) tripomastigota: forma sangüínea encontrada nos hospedeiros vertebrados. É infectante e incapaz de divisão. Caracterizada pela presença de flagelo e membrana ondulante ao longo de toda a extensão lateral do corpo. O cinetoplasto está situado na região posterior; (b) amastigota: forma intracelular que se divide por fissão binária no hospedeiro vertebrado. É arredondada e apresenta um flagelo vestigial; (c) epimastigota: forma alongada que se divide no interior do trato gastro-intestinal do hospedeiro invertebrado. Apresenta cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo emergindo na região anterior. A diferenciação das formas pode ser feita através de microscopia óptica, na qual é observada a posição do flagelo e do cinetoplasto (Brener, 1973; Souza, 1999). Acredita-se que as diferenças morfológicas e funcionais estejam intimamente relacionadas às interações entre hospedeiro e vetor (Gull, 2001).

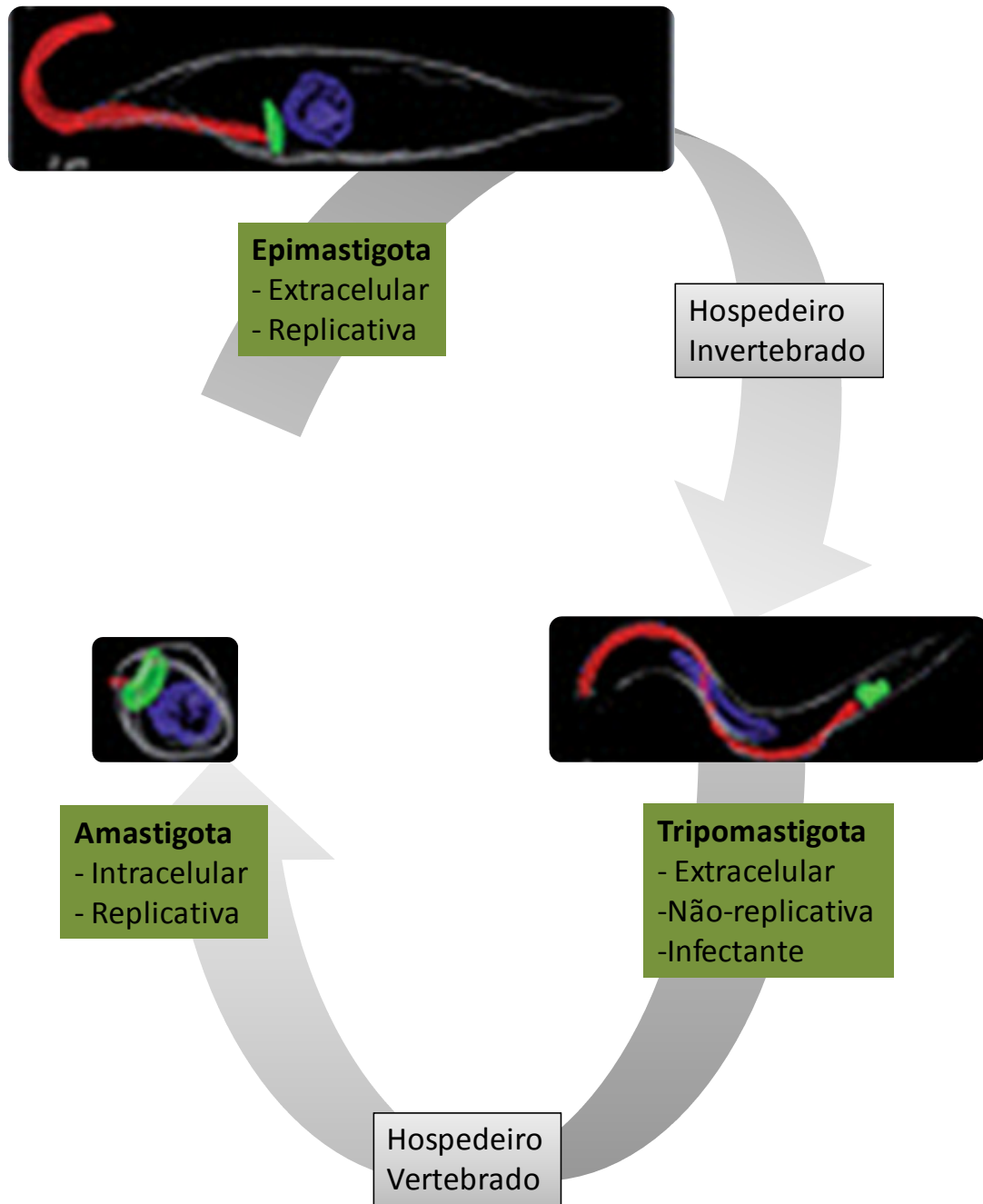


Figura 1: Representação das principais formas ao longo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A epimastigota é a forma extracelular replicativa encontrada no inseto vetor, apresenta cinetoplasto (representado em verde) anterior ao núcleo (azul) e flagelo (vermelho) emergindo da região anterior. A tripomastigota é a forma extracelular, não-replicativa, encontrada no sangue de indivíduos infectados ou no interior do barbeiro. Apresenta cinetoplasto na região posterior e membrana ondulante ao longo de toda a extensão do corpo. Amastigota é a forma replicativa encontrada no interior de células infectadas – principalmente células musculares e macrófagos. É arredondada e possui flagelo vestigial (Adaptado de Elias *et al.*, 2009).

Dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde estimam que haja 10 milhões de pessoas ao redor do mundo infectadas com a Doença de Chagas. Em 2008, foram reportadas 11000 mortes decorrentes da doença (WHO, 2010). No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No período de 2000 a 2010 foram registrados 1007 casos da forma aguda da doença (Brasil, 2010).

A infecção é iniciada no momento do repasto sanguíneo, quando as fezes do hospedeiro invertebrado, um hemíptero hematófago da família Reduviidae, subfamília Triatominae, contendo formas tripomastigotas do parasita, entram em contato com a mucosa dos olhos, nariz, boca ou com a pele lesionada permitindo que as tripomastigotas atinjam a corrente sanguínea. Dentro do hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas infectam células e, em seguida, diferenciam-se em formas amastigotas replicativas que se dividem por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, esses parasitas se diferenciam em tripomastigotas não replicativas que emergem do tecido e atingem a corrente sanguínea, onde circulam por um tempo antes de penetrar em uma nova célula e reiniciar o ciclo de infecção. O hospedeiro invertebrado adquire a forma tripomastigota circulante após repasto sanguíneo de animais (ciclo silvestre) ou homem (ciclo doméstico) infectados. No interior do trato digestivo do inseto, as tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas replicativas que, em seguida, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que ao serem eliminados com as fezes podem dar início a um novo ciclo (**Figura 2**) (Brenner, 1973).

Outras formas de contágio incluem a transfusão com sangue contaminado; transmissão congênita; transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados como carnes, sucos de cana-de-açúcar ou açaí (Barbosa, 2006); contaminação acidental durante trabalho em laboratório; transplante de órgãos (rins, coração, medula óssea e outros) (Prata, 2001). Além da transmissão para o homem, formando o ciclo doméstico da Doença de Chagas, também ocorre a infecção por *T. cruzi* em animais silvestres. Entre os animais que são hospedeiros vertebrados para o parasita, no ciclo silvestre, estão os marsupiais, bicho-preguiça, capivara, castores e mico-leão-dourado (**Figura 2**) (Jansen *et al.*, 1999).

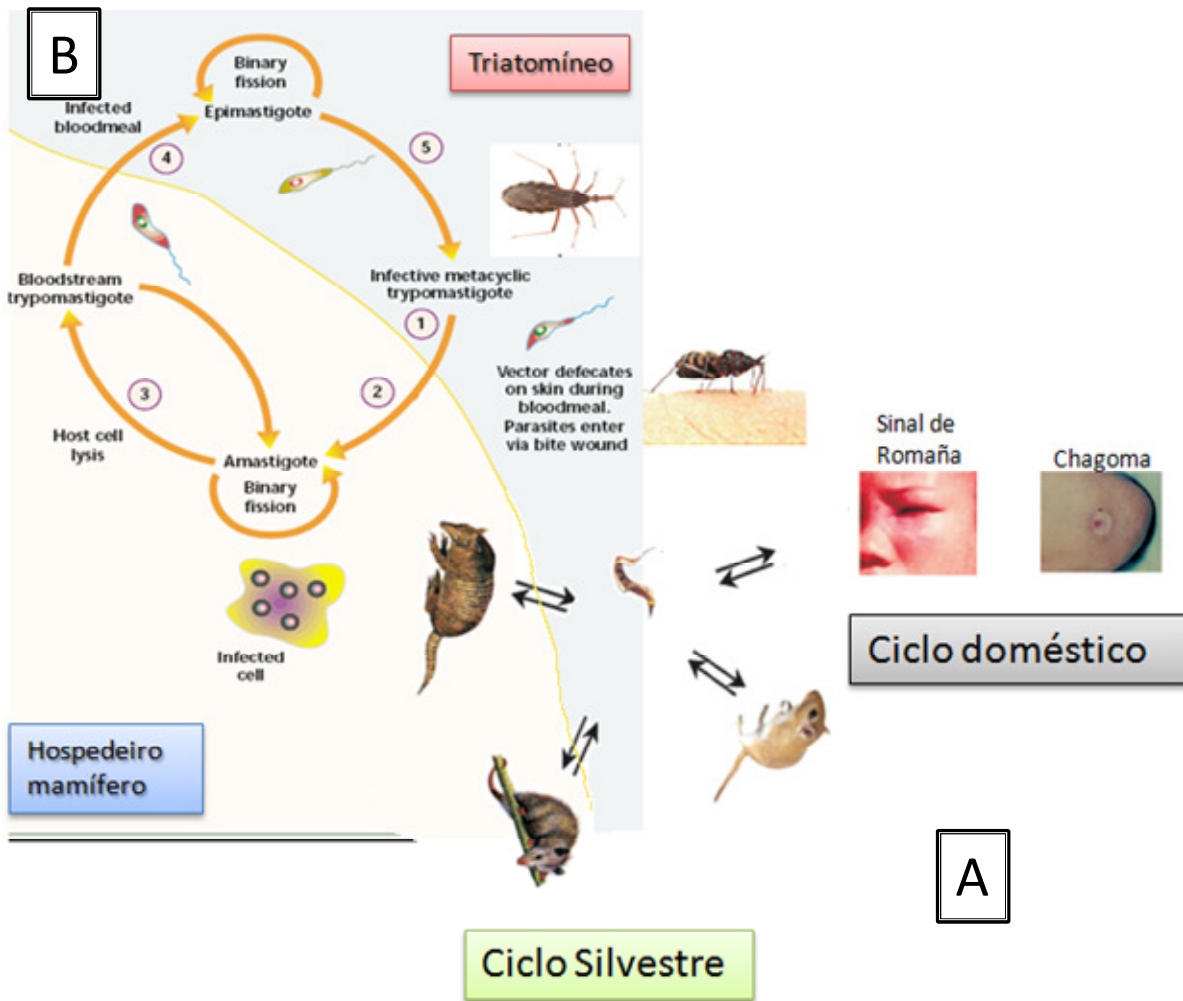


Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A – O ciclo é caracterizado pela infecção de um hospedeiro invertebrado - barbeiro triatomíneo - que no momento do repasto sangüíneo pode infectar um hospedeiro vertebrado: roedores ou marsupiais (ciclo silvestre) ou o homem (ciclo doméstico). B – A infecção ocorre quando (1) formas tripomastigotas metacíclicas liberadas com as fezes do triatomíneo penetram na pele. No interior do novo hospedeiro, as tripomastigotas podem (2) invadir diferentes tecidos e no interior da célula infectada, transformam-se em amastigotas e se dividem por fissão binária. (3) Dentro da células, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sangüíneas que levam à ruptura da célula infectada. (4) As tripomastigotas sangüíneas podem ser ingeridas pelo vetor triatomíneo, onde se transformam em epimastigotas e multiplicam por divisão binária. No trato digestivo do invertebrado, as epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas. (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2006; Kelly, 2000).

A primeira fase da Doença de Chagas (fase aguda) é caracterizada pela entrada do parasita no organismo, podendo levar a inflamações na pele e formação de chagomas. Quando a entrada ocorre pelos olhos é produzido um sinal característico chamado sinal de Romaña. Após o desaparecimento das manifestações clínicas da fase aguda inicia-se a fase crônica, na qual órgãos como coração, esôfago, cólon e o sistema nervoso podem ser afetados. Na fase crônica também são encontrados pacientes assintomáticos que apresentam a forma indeterminada da doença (Prata, 2001).

Atualmente, são utilizados dois medicamentos para o tratamento da Doença, o nifurtimox e o benzonidazole. Porém, intensos debates têm sido realizados a cerca de sua toxicidade e eficácia. Como ainda não existem vacinas eficazes, o controle da doença baseia-se principalmente na eliminação dos triatomíneos com inseticidas. Melhores condições de higiene e habitacionais, como a substituição de casa de pau a pique por alvenaria, também constituem medidas profiláticas em áreas endêmicas (Maya *et al.*, 2007). Maior entendimento da biologia do parasita é necessário para o desenvolvimento de novas drogas.

1.2 A variabilidade genética intra-específica em *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional altamente heterogênea caracterizada pela ocorrência de diferentes cepas. Essas cepas apresentam tropismo tecidual diferenciado, o que pode estar relacionado às diferentes manifestações clínicas da doença. Além disso, também é observado que algumas cepas predominam em determinadas regiões geográficas. A forma digestiva, por exemplo, predomina no Chile e na região central do Brasil, porém é praticamente inexistente em outras regiões endêmicas e na América central. Acredita-se o principal fator envolvido na geração de diferentes formas clínicas da Doença de Chagas seja diversidade genética presente tanto na população humana afetada quanto no parasita (Macedo & Pena, 1998).

A divisão da população do *T. cruzi* em diferentes linhagens baseada em sua diversidade genética é relevante, pois permite correlacionar a estrutura populacional a dados epidemiológicos. Sendo assim, a diversidade genética observada entre as diferentes cepas de *T. cruzi*, levou um grupo de especialistas a propor, em 1999, a classificação do táxon em duas linhagens principais denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, baseada em

diferenças bioquímicas, moleculares e graus de infectividade, usados em classificações anteriores (Momen, 1999). Foi possível observar que as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I estão associadas ao ciclo silvestre do parasita, enquanto as cepas pertencentes ao grupo II geralmente estão associadas ao ciclo doméstico da doença, sendo mais frequentemente encontradas em amostras isoladas de pacientes com a Doença de Chagas (Zingales *et al.*, 1998, Freitas *et al.*, 2005). Em 2006, Freitas e colaboradores propuseram a existência de uma terceira linhagem denominada *T. cruzi* III agrupando cepas que não puderam ser classificadas como *T. cruzi* I ou II (Freitas *et al.*, 2006). Porém, até o momento não existem dados que correlacionem cepas da linhagem *T. cruzi* III ao ciclo doméstico ou silvestre. Na tentativa de uniformizar as diferentes nomenclaturas que incluíam vários subgrupos denominados: zymodemas (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1981, Romanha *et al.*, 1979); schizodemas (Morel *et al.*, 1980); biodemas (Andrade & Magalhães, 1997); clonets (Tibayrenc & Ayala, 1991); linhagens (Souto *et al.*, 1996); cladós (Kawashita *et al.*, 2001); unidades discretas de tipagem (DTUs) (Tibayrenc, 1998); haplotipos (Freitas *et al.*, 2006, Herrera *et al.*, 2007); foi proposto na XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia em 2009 a uniformização para a nomenclatura intra-específica de *T. cruzi*. De acordo com esse consenso, as cepas e isolados de *T. cruzi* devem ser divididas em seis DTUs (*T. cruzi* I-VI), sendo as cepas classificadas como *T. cruzi* V e VI aquelas de caráter híbrido (Zingales *et al.*, 2009). A distribuição geográfica de cada uma das linhagens, assim como exemplos de representantes de algumas linhagens que são comumente estudadas podem ser observados na **Figura 3**.

1.3 Genoma e expressão gênica em *T. cruzi*

A publicação das seqüências completas dos genomas do *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, também conhecidos como Tri-Tryp genomas, revelou várias características comuns aos três tripanosomatídeos, além de uma grande sintenia gênica. Os genes codificadores estão, de forma geral, arranjados em longos clusters de dezenas a centenas de genes na mesma fita de DNA (El-Sayed *et al.*, 2005a). O genoma do *T. cruzi*, um genoma haplóide de aproximadamente 55 Mb, contendo cerca de 12.000 genes, apresenta como principal característica o fato de possuir uma grande porção (50%) de seqüências repetitivas. Essas seqüências repetitivas correspondem a grandes

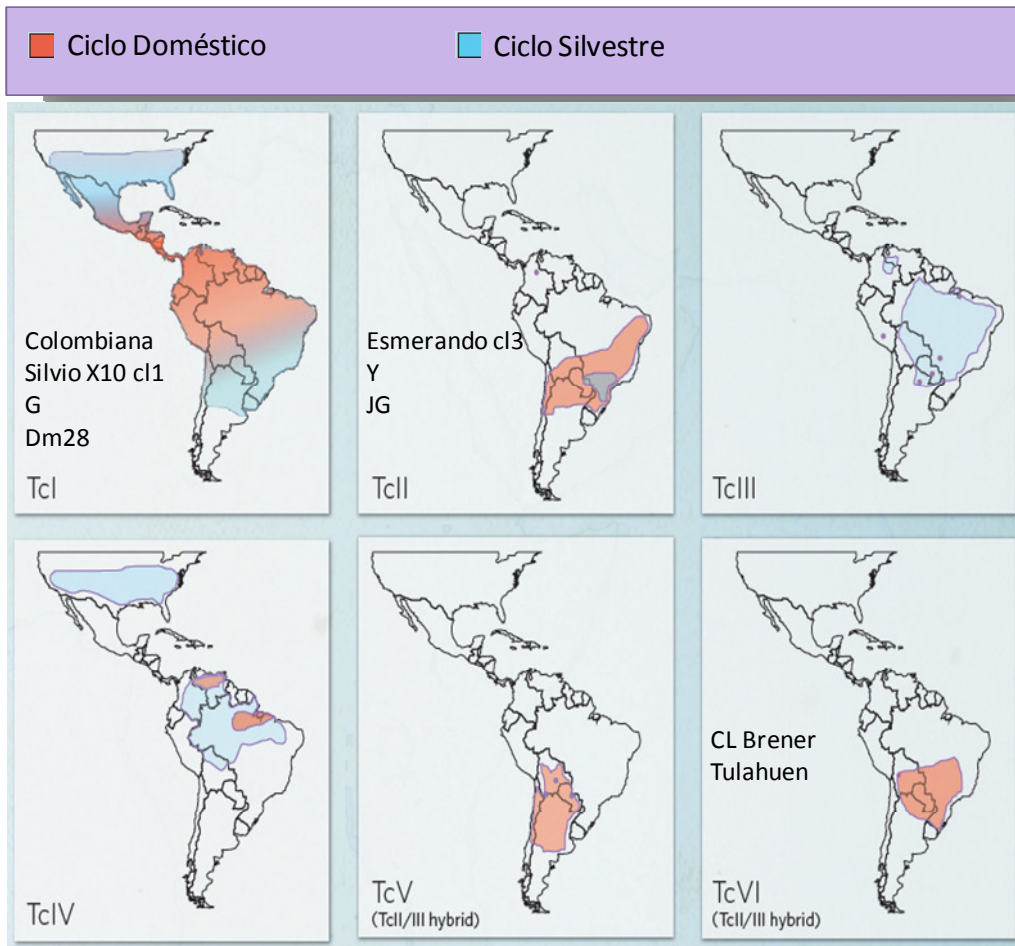


Figura 3: Distribuição geográfica das diferentes linhagens de *T. cruzi*. As cepas pertencentes a TcI são mais predominantes no ambiente silvestre quando comparadas com cepas pertencentes a TcII e cepas híbridas, que predominam no ciclo doméstico. Em destaque exemplos de algumas cepas comumente estudadas, sua classificação e distribuição geográfica. Adaptado de Who, how, what and where? Mapping Chagas disease, 2010.

famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed *et al.*, 2005b).

A expressão gênica em tripanosomatídeos apresenta várias peculiaridades em relação ao que é comumente observado em outros organismos eucariotos. Ao contrário da maioria dos eucariotos nos quais a regulação gênica ocorre principalmente ao nível transcricional, em tripanosomatídeos a regulação ocorre especialmente ao nível pós-transcricional. Um forte indício de que a regulação ocorre ao nível pós-transcricional foi dado a partir da observação de que muitos genes, apesar de apresentarem transcrição constitutiva, têm seus mRNAs diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi* (Ávila & Goldenberg, 2010). Vários grupos de pesquisa demonstraram que o acúmulo diferencial de um mRNA durante o desenvolvimento estágio específico é causado por mudanças na sua estabilidade e não pelo aumento ou diminuição da taxa de transcrição (Teixeira *et al.*, 1999; Coughlin *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2006).

A expressão gênica é regulada através de *trans*-splicing do RNA, poliadenilação, meia-vida do RNA, síntese protéica e estabilidade da proteína. Enquanto em eucariontes a RNA Polimerase II reconhece e atua em promotores específicos, para a grande maioria dos genes codificadores de proteínas de tripanosomatídeos ainda não foram identificadas seqüências típicas de promotores (Teixeira & DaRocha, 2003). Como consequência, os transcritos são formados por longas seqüências de mRNA policistrônicos, nas quais os genes são separados por pequenas seqüências intergênicas. Apesar de pertencerem a uma mesma unidade gênica transcricional, genes diferentes podem apresentar padrões de expressão diferentes graças aos vários mecanismos de controle pós-transcricional citados (Vanhamme & Pays, 1995).

A clivagem do pré-mRNA policistrônico ocorre no núcleo para produzir os mRNAs monocistrônicos (**Figura 4**). As seqüências intergênicas contêm motivos de polipirimidinas (pPy) que acredita-se serem necessárias para o processamento do transcrito primário. Durante o processamento são adicionados na porção 5' terminal uma seqüência de 39 nucleotídeos chamada *miniexon* ou *spliced leader* (SL) contendo um resíduo de 7-metil guanosina (em inglês *cap*). Na porção 3' terminal ocorre a adição de uma cauda poli (A) para cada mRNA. A adição do SL e a poliadenilação não são eventos independentes. Acredita-se que eles ocorram concomitantemente ou logo após a

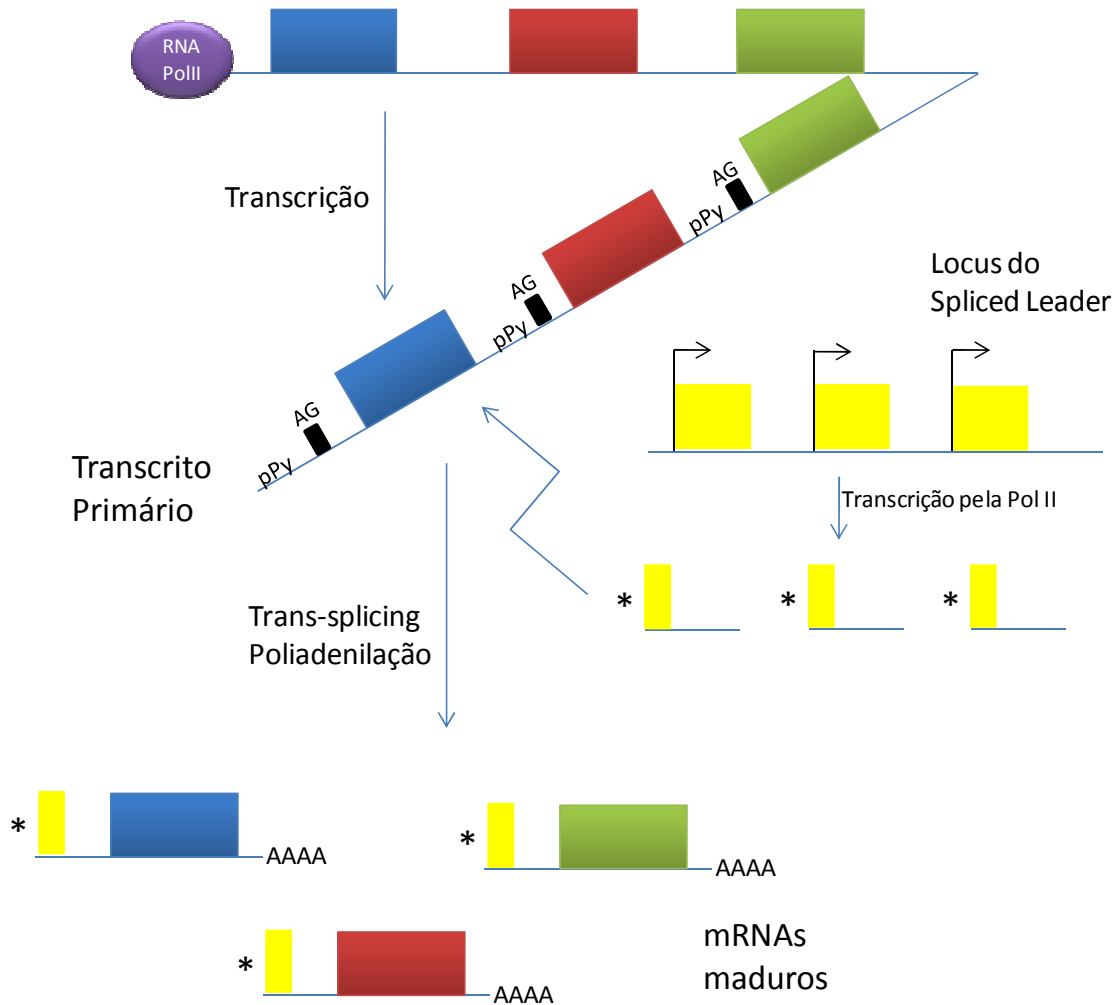


Figura 4: Transcrição e processamento de mRNA em Trypanosomatídeos. No genoma do parasito são observados longos clusters contendo genes *in tandem*. A transcrição ocorre com a formação de um longo transcrito policistrônico que será processado com a adição de uma seqüência de 39 nt chamada *spliced leader* (SL), que apresenta um *cap* metilado (*) na sua porção 5'. O sítio de adição do SL é um AG localizado na região intergênica a determinada distância de um traço de polipirimidinas (pPy). O sítio de adição do SL também fornece evidências sobre onde deverá ser adicionada a cauda poli(A). A seta no *locus* do *spliced leader* indica a região promotora, que é bem caracterizada para esse gene.

transcrição. A SL é adicionada ao mRNA por uma reação intermolecular de *trans*-esterificação chamada *trans*-splicing, no qual o RNA do SL funciona como espécie doadora e mRNA que está sendo sintetizado como espécie aceptora. O sítio de adição do SL é um dinucleotídeo AG conservado que se situa na região acima do motivo de polipirimidinas na região 5' intergênica. Já a seleção do poli(A) ocorre devido à posição do sítio de adição de SL do gene situado logo abaixo no transcrito primário policistrônico (Vanhamme & Pays, 1995; Donelson *et al.*, 1999; Teixeira & DaRocha, 2003).

1.4 Manipulação gênica em Tripanosomatídeos

Dentre os mecanismos utilizados para estudar a função de um gene estão a deleção gênica, super-expressão, silenciamento, complementação de mutantes, inserção de gene repórter e a determinação da localização sub-celular da proteína que este codifica por meio da fusão com seqüências codificadoras de proteínas fluorescentes. O desenvolvimento de protocolos de transfecção foi fundamental para que a função de genes pudesse ser estudada em tripanosomatídeos, a partir de estratégias de manipulação gênica. Conforme descrito no item anterior, dentre os elementos necessários para o adequado processamento do mRNA primário, e que conseqüentemente um vetor de transfecção deve possuir, estão os sinais de adição de SL acima da região codificadora do gene exógeno para *trans*-splicing e sinais de poliadenilação inseridos abaixo da região codificadora. Apesar de não haver no genoma seqüências promotoras reconhecidas pela RNA polimerase II, a seqüência de rRNA, reconhecida pela RNA polimerase I é capaz de aumentar enormemente a eficiência de transcrição do gene exógeno (Teixeira & DaRocha, 2003).

Em 2004 DaRocha e colaboradores avaliaram o papel de diferentes regiões 5' não traduzidas (UTR) e região intergênica (IR), contendo sítio de adição para SL, na expressão do gene repórter de luciferase. Quando colocados após a seqüência promotora de rRNA, seqüências derivadas da 5' UTR mais IR de GAPDH, TcP2 β e α - e β - tubulina aumentam consideravelmente o nível de expressão de luciferase em epimastigotas, enquanto a região correspondente do gene de amastina diminuiu a expressão do repórter (DaRocha *et al.*, 2004a). Em trabalho similar, Nozaki e Cross (1995) e Araújo e colaboradores (*in press*) avaliaram o efeito das regiões 3' UTR e IR de vários genes estágio – específicos e constitutivos de *T. cruzi* na expressão do gene repórter luciferase de vaga – lume. Dentre as

regiões estudadas estão as 3' UTRs dos genes glicoproteína 72 (*gp72*), glicoproteína 85 (*gp85*), gliceraldeído 1-fosfato desidrogenase (*gapdh*) e amastina (*ama*).

Para introduzir o DNA exógeno dentro do parasita são realizados procedimentos de transfecção. Essa pode ser transiente, o que permite análises em até 48 horas, ou transfecções permanentes. No segundo caso, as células transformadas são selecionadas por apresentarem um plasmídeo que contém um marcador de seleção, por exemplo, um gene de resistência a droga. Para que o plasmídeo seja inserido no genoma, tornando a transfecção permanente, é necessário que este possua uma sequência idêntica à região alvo para a integração. O plasmídeo é, então, linearizado com uma enzima de restrição e a inserção se dá por recombinação homóloga entre as sequências do plasmídeo e a sequência alvo no genoma. No caso de uma deleção gênica, as regiões 5' e 3' UTR ou parte da codificadora de um gene de interesse são inseridas em um vetor, flanqueando um marcador de seleção. Se o gene não for essencial haverá deleção por recombinação homóloga, inicialmente do primeiro alelo e, em uma segunda etapa de transfecção, do segundo alelo do gene (Clayton, 1999). A expressão do gene de resistência pode ser aumentada com a inclusão de sequências de adição de SL e poliadenilação, como por exemplo, a região 3' UTR de GAPDH (Xu *et al.*, 2009).

Apesar de ser amplamente utilizado para silenciamento gênico em *Trypanosoma brucei*, o silenciamento por interferência de RNA (RNAi) não pode ser utilizado para a diminuição da expressão gênica em *T. cruzi*. Quando avaliado o nível de expressão de amastina, após transfecção com o RNA dupla-fita (dsRNA) de amastina, este não foi processado gerando os pequenos RNAs de interferência de 21 nt (siRNAs) e o nível do mRNA de amastina permaneceu inalterado (DaRocha *et al.*, 2004b). A publicação da sequência do genoma mostrou que *T. cruzi* e *L. major* não possuem os componentes da maquinaria de RNAi. Apenas *T. brucei* apresenta o gene de Ago1, bem como o ortólogo da Dicer (Shi *et al.*, 2006a ,b). Recentemente, foi demonstrado que *L. braziliensis* apresenta uma via de RNAi ativa que é capaz de reduzir a expressão de um gene alvo (Lye *et al.*, 2010). Apesar de *T. cruzi* não possuir maquinaria de RNA ativa foi identificado uma ORF de uma proteína que apresenta domínios típicos de membros da sub-família das Argonautas (Garcia-Silva *et al.*, 2010).

Os protocolos de transfecção e manipulação de genes em *T. cruzi* permitiram, portanto, o desenvolvimento de inúmeros estudos investigando vias metabólicas que são essenciais para o conhecimento de aspectos importantes da biologia desse parasita. Dentre essas vias metabólicas, estão as vias de reparo de DNA, cujos estudos em *T. cruzi* foram iniciados pelo nosso grupo em 2001, com o objetivo de entender, entre outras questões, os mecanismos responsáveis pela geração da enorme variabilidade genética observada na sua população.

1.5 Os Sistemas de Reparo de DNA

Em qualquer organismo, o balanço entre as taxas de mutação e de reparo leva ao equilíbrio entre instabilidade e estabilidade genômica e à conseqüente evolução adaptativa dos organismos (Elena & Lenski, 2003). A manutenção da estabilidade genômica é uma conseqüência direta dos mecanismos que asseguram a fidelidade da replicação e da eficiência dos sistemas de reparo do DNA, como o BER (Reparo de Excisão de Base), NER (Reparo de Excisão de Nucleotídeo) e MMR (Reparo de Erros de Pareamento). Por apresentarem papel decisivo na manutenção genômica, os sistemas de reparo podem contribuir para a geração de diversidade genética de uma espécie (Machado *et al.*, 2006; Li, 2008).

O MMR é a via encontrada em procariotos e eucariotos para correção de erros de pareamento de bases e alças de inserção/deleção (IDLs) gerados durante a replicação e recombinação do DNA. Conforme ilustrado na **Figura 5**, em procariotos a via é iniciada com a presença das proteínas MutS, MutL (ambas ATPases) e MutH (endonuclease metil-dependente), que apresentam atividade específica para determinadas seqüências (Junop *et al.*, 2003). O reconhecimento do erro se dá através de um dímero MutS. Em seguida, o dímero MutL interage fisicamente com MutS e recruta MutH. A proteína MutH ativada pelo dímero MutL será capaz de reconhecer a fita recém sintetizada devido à presença de seqüências GATC não metiladas e dará origem à excisão da base não pareada através de um corte na fita não metilada (Golyasnaya & Tsvetkova, 2006). Juntamente com a ação de outras proteínas como a UvrD (helicase II) e a SSB (proteína que se liga a DNA de fita única) a base incorreta será excisada e, através da ação da DNA polimerase III a base correta será acoplada e o corte selado pela DNA Ligase.

Reparo de Erros de Pareamento (MMR)

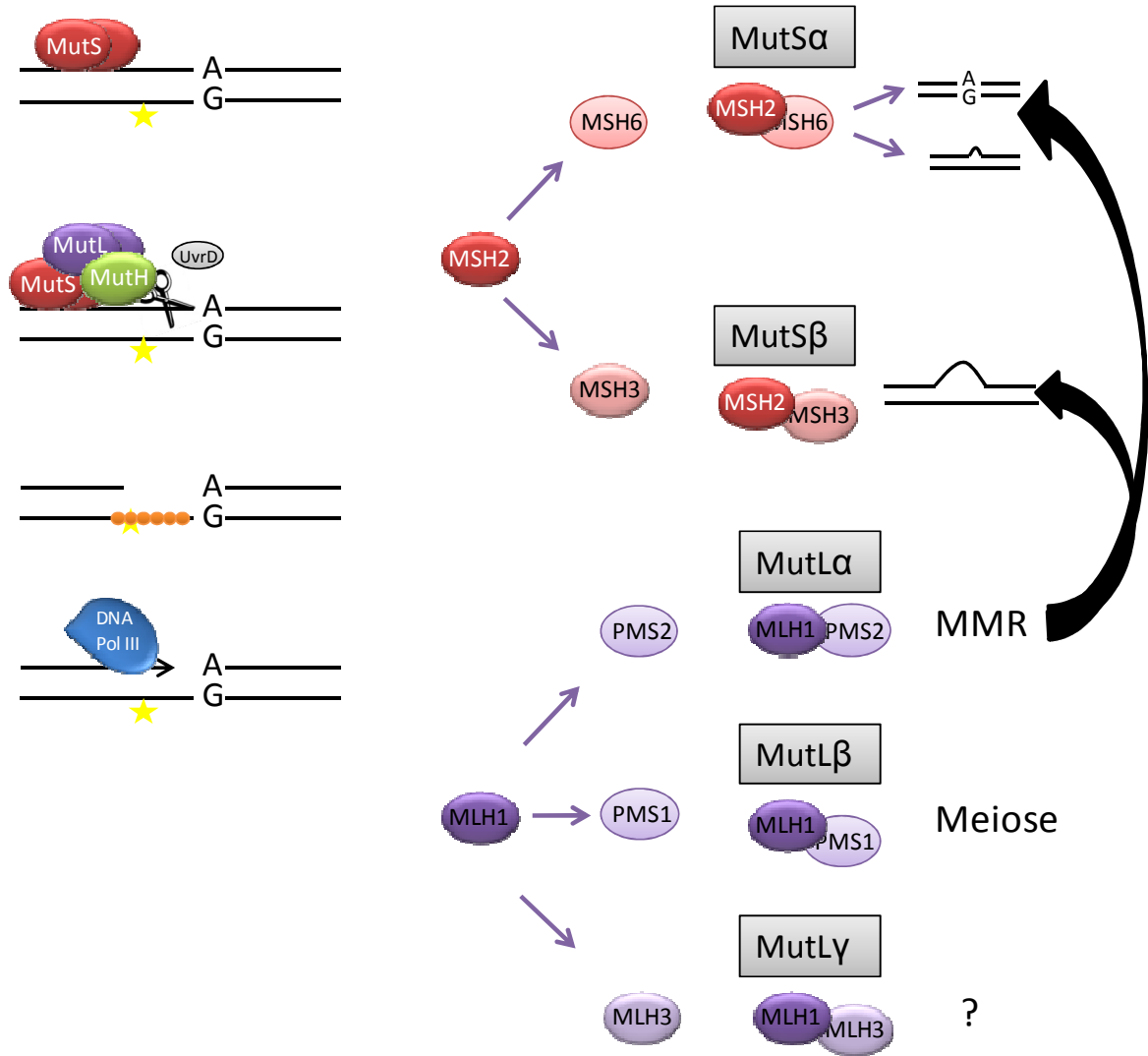


Figura 5: O Sistema de Reparo de Erros de Pareamento em procariotos e eucariotos. Em procariotos, o homodímero MutS se liga ao erro de pareamento e recruta o homodímero MutL, que ativa a endonuclease MutH. A proteína MutH corta a fita não metilada que contém a base incorreta. Este fragmento é clivado e degradado. O DNA é então re-sintetizado e ligado. Em eucariotos, a proteína MutH não é encontrada e as proteínas MSH e MLH interagem formando heterocomplexos que reparam tanto erros de pareamento quanto alças de inserção/deleção (IDLs).

O entendimento do MMR em procariotos permitiu a elucidação de grande parte desse mecanismo em eucariotos. Contudo, apesar das semelhanças entre os mecanismos, são observadas diferenças significativas entre os dois modelos. Um exemplo disso, é que em eucariotos, a atuação das proteínas do complexo ocorre com a formação de heterodímeros ao invés de homodímeros. Em eucariotos, os homólogos para MutS e MutL são chamados MSH e MLH, respectivamente. As proteínas MSH ocorrem em seis isoformas (MSH 1-6), sendo o MSH1 presente apenas na mitocôndria de leveduras (Reenan & Kolodner, 1992).

A proteína MSH2 faz parte de todos os heterodímeros que podem ser formados para o reconhecimento do erro e é necessária para a correção de todos os erros de pareamento do DNA nuclear. Deste modo, o heterodímero formado por MSH2 e MSH6, também chamado MutS α , atua no erro de pareamento base-base e em pequenas alças de inserção/deleção (IDLs), enquanto o heterodímero formado por MSH2 e MSH3, chamado MutS β , atua principalmente no reparo de alças de inserção/deleção (IDLs) maiores. O MutL possui quatro homólogos: MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2, de modo que os heterodímeros formados são: MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) e MutL γ (MLH1/MLH3). O MutL α é necessário para o MMR, enquanto o MutL β apresenta papel durante a meiose. Porém, não se sabe a função biológica do MutL γ . Em eucariotos, não são encontrados homólogos para MutH e UvrD (Jun *et al.*, 2006; Li, 2008).

Além das proteínas supracitadas, outras proteínas homólogas àquelas encontradas em procariotos atuam no MMR: como a EXOI, RPA (proteína de ligação ao DNA de fita única), PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), DNA Polimerase δ e DNA Ligase I (Jun *et al.*, 2006; Li, 2008).

O MMR atua principalmente no reparo pós-replicação, corrigindo os erros que escapam da atividade revisora da DNA Polimerase. Um MMR defectivo leva a um aumento da taxa de mutação, o que tem sido correlacionado a diferentes fenótipos, como a predisposição a câncer em células humanas – câncer de cólon hereditário e uma variedade de cânceres esporádicos (Li, 2008). Além disso, outros papéis estão relacionados às proteínas do MMR, como: atividade anti-recombinante entre sequências divergentes; tolerância a danos no DNA; apoptose; recombinação meiótica e mitótica; mudança de

classe e hipermutação somática em imunoglobulinas e expansão de repetição de trinucleotídeo (Li, 2008; Jiricny, 2006).

Um dos indicadores da eficiência com que uma célula é capaz de reparar seus erros de pareamento – conseqüentemente uma medida da eficiência do MMR – é a estabilidade de seqüências repetitivas simples, como os microsátélites. Na presença de seqüências repetitivas, a DNA Polimerase freqüentemente incorpora nucleotídeos a mais ou então deixa de incorporar alguns nucleotídeos. Esses erros geram alças contendo uma ou mais repetições. O reparo dessas lesões ocorre pela via de MMR. Porém, mutações em proteínas da via levam a um reconhecimento e reparo ineficiente dessas pequenas alças. A desestabilização dos microsátélites é chamada instabilidade de microsátélites (Sia *et al.*, 2001). A instabilidade de microsátélites, em células humanas, tem sido correlacionada à ocorrência de câncer (Leung *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1995; Thibodeau *et al.*, 1996; Peltomäki, 2001).

A via de MMR também está relacionada à tolerância a danos causados no DNA após tratamentos com determinadas drogas. A cisplatina é uma droga amplamente utilizada para tratamento de alguns tipos de câncer. Sua toxicidade baseia-se na ligação ao DNA, formando adutos que distorcem a hélice. O dano é reconhecido pelo MSH2, que juntamente com outras proteínas do MMR tentam repará-lo. Ciclos fúteis de reparo acabam levando à parada do ciclo celular em G2 e conseqüente sinalização para apoptose (Mello *et al.*, 1996). Em células MMR-deficientes a parada em G2 não acontece, portanto essas células tornam-se mais resistentes aos danos gerados pela cisplatina e acumulam mais mutações decorrentes dos adutos (Lin *et al.*, 1999; Fink *et al.*, 1997; Clodfelter *et al.*, 2005).

Agentes alquilantes como o *N*- metil- *N*- nitrosourea (MNNG) e a temozolamida metilam guaninas dando origem à O⁶-metilguanina (O⁶-MeG). Esse erro pode levar ao pareamento incorreto da guanina com uma timina e pode ser reparado por metiltransferase ou pela maquinaria do MMR (Schofield & Hsieh, 2003). Células que apresentam deficiência no MMR são mais tolerantes aos danos gerados por agentes alquilantes (de Wind *et al.*, 1995). Existem evidências de que proteínas do MMR estejam envolvidas no reparo de lesões oxidativas no DNA, como a oxidação da guanina formando 8-oxo-guanina (Schofield & Hsieh, 2003).

1.6 O MMR e a geração de variabilidade genética em *T. cruzi*

Devido ao seu papel central na via de MMR, a caracterização do gene *msh2* de *T. cruzi* foi iniciada em 2001 pelo nosso grupo (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Através de amplificação do DNA genômico de *T. cruzi* com iniciadores degenerados, foi obtido um fragmento utilizado como sonda na busca em uma biblioteca de cDNA de *T. cruzi*. A seqüência obtida contém uma janela de leitura aberta de 2889 pb que codifica uma proteína de 962 aminoácidos. Os resultados mostraram que este gene está presente como cópia única no genoma, sendo expresso em todas as fases do ciclo de vida do parasita, porém em menor quantidade na forma tripomastigota (Augusto-Pinto *et al.*, 2001).

Em seguida, foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *Tcmsh2* de várias cepas, o que permitiu a sua classificação em três haplogrupos distintos, chamados A, B e C, relacionados a três isoformas da proteína: TcMSH2a, TcMSH2b e TcMSH2c. A análise das cepas pertencentes a cada haplotipo permite correlacioná-las às linhagens *T. cruzi* I e II proposta por Momen (1999), de modo que os haplogrupos A e C estão relacionados às linhagens I e II, respectivamente. O haplogrupo B é formado por algumas cepas de características híbridas e por cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* III, como proposto por Freitas e colaboradores (2006). O mesmo estudo mostra evidências que sugerem que as cepas pertencentes aos diferentes haplogrupos apresentam variação quanto à eficiência do sistema de reparo MMR. Essas evidências foram obtidas a partir de análises de instabilidade de microsátélites em culturas crescidas na presença de peróxido de hidrogênio e de testes de resistência à cisplatina (Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

Estudos revelam que, em vários organismos, um MMR menos eficiente pode levar a uma maior taxa de mutação, o que conseqüentemente aumentaria a diversidade genética da população (Schofield & Hsieh, 2003; Iyer *et al.*, 2006). No caso de *T. cruzi*, pode-se especular que cepas que apresentam maior diversidade genética teriam maior sucesso para conquistar o ciclo doméstico e infectar o homem, uma vez que teriam mais recursos do ponto de vista genético para escapar à ação do sistema imune. Por outro lado, um MMR mais eficiente levaria a uma menor taxa de mutação, com conseqüente diminuição da diversidade genética. Assim, de acordo com os dados de Augusto-Pinto *et al.* (2003) e, mais recentemente, de Campos *et al.* (2010), foi formulada a hipótese de que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II e caracterizadas como pertencentes ao haplogrupo C

apresentariam um MMR menos eficiente, o que teria resultado em uma maior variabilidade genética desse grupo. Por outro lado, cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, com parasitas apresentando MSH2 característico do haplogrupo A, teriam MMR mais eficiente e, portanto menor variabilidade genética (Machado *et al.*, 2006). Dados sobre análises de seqüências de famílias multigênicas corroboram essa hipótese, pois revelaram que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II e cepas híbridas apresentam uma maior variabilidade nas seqüências analisadas quando comparadas a seqüências ortólogas de cepas da linhagem *T. cruzi* I (Cerqueira *et al.*, 2008).

Com o seqüenciamento do genoma completo do *Trypanosoma cruzi* foi possível buscar outros ortólogos de MutS. Foram encontrados, além de MSH2: MSH3 (Tc00.1047053507915.19 e Tc00.1047053508277.180), MSH4 (Tc00.1047053509967.20 e Tc00.1047053507233.110), MSH5 (Tc00.1047053509617.30 e Tc00.1047053506237.10) e MSH6 (Tc00.1047053510187.430). Em relação aos ortólogos de MutL, são encontrados MLH1 (Tc00.1047053504035.140 e Tc00.1047053507991.60) e PMS1 (Tc00.1047053510761.10), enquanto PMS2, MLH2 e MLH3 aparentemente estão ausentes (El-Sayed *et al.*, 2005b; Passos-Silva *et al.*, 2010). Não foi encontrado nenhum ortólogo a MSH1, o qual em *Saccharomyces cerevisiae* está relacionado ao reparo e estabilidade do DNA mitocondrial (Reenan & Kolodner, 1992).

Estudos em células tronco embrionárias de camundongos contendo um ou dois alelos de MSH2 defectivos mostram que estas acumulam mais bases oxidadas como consequência a exposição a baixos níveis de radiação (DeWeese *et al.*, 1998). Camundongos duplo-nocautes para MSH2 apresentam ligeiro aumento de danos oxidativos no DNA de vários órgãos (Russo *et al.*, 2009). Além do seu papel no MMR e possível relação com a diversidade genética em *T. cruzi*, acredita-se que a proteína TcMSH2 também possa estar relacionada às respostas a danos oxidativos sofridos pelas células. Em *Trypanosoma brucei*, foi observado por Machado-Silva e colaboradores (2008) que cepas duplo nocaute para o gene *msh2* ($\Delta Tbms2^{-/-}$) são mais sensíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do que parasitas selvagens, sugerindo que a proteína MSH2 esteja envolvida na resposta ao estresse oxidativo no parasita. Esse fenótipo é revertido com a complementação de *msh2* de *T. cruzi* e *T. brucei* nos mutantes. Porém, após análises de instabilidade de microsátélites e de resistência a MNNG (*N-methyl-N'-nitro-N-*

nitrosoguanidine), concluiu-se que o gene *msh2* de *T. cruzi* expresso em *T. brucei* não é capaz de complementar o MMR. Além disso, a deleção do gene que codifica MLH1 não afeta a sensibilidade das células a H₂O₂, indicando que o papel do MSH2 na resposta ao dano oxidativo ocorre de maneira independente dos outros componentes do MMR.

Recentemente, Campos e colaboradores (2010) demonstraram que cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I são mais susceptíveis ao tratamento com agentes alquilantes, como a cisplatina e MNNG, e também são mais resistentes ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Foi demonstrado ainda que, cepas do grupo *T. cruzi* I apresentam um menor acúmulo de 8-oxoguanina em seu genoma quando comparadas às cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* II. Para averiguar o papel do MMR nas diferenças observadas, parasitas foram transfectados com o objetivo de deletar a principal proteína da via de MMR: TcMSH2. Várias linhagens heminocautes ($\Delta Tcmsh2^{+/-}$) foram geradas no clone CL Brener (uma cepa híbrida contendo os alelos *Tcmsh2* B/C). Apesar de não apresentarem diferenças frente ao tratamento com cisplatina, todas as linhagens $\Delta Tcmsh2^{+/-}$ se mostraram mais sensíveis ao tratamento com H₂O₂, além de acumularem maiores níveis de 8-oxoguanina no DNA do cinetoplasto. Parasitas duplo-nocautes para ambos os alelos de *Tcmsh2* não foram viáveis, o que seria um indício de que a proteína apresenta um papel essencial para o parasita, o que poderia ser explicado pelo fato do parasita sofrer constantes exposições a agentes oxidantes no interior das células (Campos *et al.*, 2010).

Esses dados, juntamente com estudos de complementação de linhagens duplo nocautes para *Tbcmsh2* ($\Delta Tbcmsh2^{+/-}$) em *T. brucei* com *Tcmsh2* de *T. cruzi* – capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade ao H₂O₂, mas não o MMR (Machado-Silva *et al.*, 2008) – sugerem que a proteína MSH2 apresenta um papel adicional, MMR-independente, na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção da estabilidade do genoma mitocondrial em tripanossomatídeos.

Diante da possibilidade de um papel adicional para a proteína MSH2 em *T. cruzi*, foi determinada a sua localização subcelular. Para tal, MSH2 foi expresso em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP) na sua porção C-terminal. Os resultados obtidos sugerem que a proteína apresenta uma localização citoplasmática não usual (Campos, 2009). Como alternativa para avaliar a localização subcelular de MSH2 e a sua possível

localização mitocondrial, esse trabalho propõe a realização de experimentos de imunolocalização. Para isso, foi necessária a obtenção da forma recombinante da proteína TcMSH2 expressa em bactérias, a qual foi utilizada na imunização de camundongos para produção do soro que foi utilizado em ensaios de imunolocalização e *western blot*.

Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que a translocação de MSH2 para o núcleo é dependente da pré-formação do heterodímero MSH2-MSH6 no citoplasma (Hayes *et al.*, 2009). Para avaliar essa hipótese em *T. cruzi*, frente aos dados não usuais de sua localização citoplasmática, nesse trabalho tentamos expressar a proteína TcMSH6 em fusão com a proteína fluorescente vermelha (RFP) para verificar uma possível co-localização com TcMSH2 no núcleo.

E finalmente, para verificar se em *T. cruzi* o papel extra de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo envolveria outras proteínas do MMR, foram geradas construções para deletar outra proteína da via: MSH6. *Tcmsh6*, assim como *Tcmsh2*, é um gene de cópia única, o que torna possível a deleção de ambos os alelos através da utilização de marcadores de seleção constituídos de gene de resistência a diferentes drogas. Uma vez obtidas linhagens nocautes para esses genes, a resposta dos mutantes aos danos oxidativos será avaliada após tratamento com agentes genotóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterização das proteínas TcMSH2 e TcMSH6 na resposta a danos oxidativos no DNA em *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a localização da proteína MSH2 em *T. cruzi* utilizando anticorpos policlonais gerados contra a proteína recombinante expressa em *Escherichia coli*;
- Determinar a localização do heterodímero MSH2/MSH6 em *T. cruzi* através da expressão dessas proteínas em fusão com RFP e GFP;
- Gerar construções para obtenção de linhagens nocautes para outras proteínas da via de MMR, tais como TcMSH6;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação de DNA Plasmidial

Para purificação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) colônias transformadas foram inoculadas em 3 mL de meio 2xYT (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, água q.s.p. 1 L) contendo 100 µg/mL de ampicilina e crescidas a 180 rpm, 37° C por 16 horas. A extração de DNA foi feita com o kit GFX *Micro* Plasmid Prep (GE Healthcare), conforme instrução do fabricante.

Como alternativa para purificação foi utilizado protocolo baseado no método de lise alcalina de acordo com Sambrook *et al.*, 1989. O inóculo foi centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos. O pellet obtido foi ressuspenso em solução I (Glicose 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM, EDTA 10 mM, RNase I 50 µg/mL). Em seguida, as bactérias foram lisadas com solução II (NaOH 200 mM, SDS 1%) após tratamento por 5 minutos à temperatura ambiente. A lise foi bloqueada com solução III (acetato de potássio pH 5.5 5 M, ácido acético 34,5 mL, água q.s.p. 300 mL) por 15 minutos a 4° C. O DNA foi precipitado com isopropanol e o pellet lavado com etanol 70 %. Para obtenção de maiores quantidades de DNA foi realizada extração em grande escala (maxiprep) com o kit Qiagen Plasmid Maxi de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e quantificado através de leitura de densidade óptica (OD) por análise espectrofotométrica a 260 nm.

Antes da purificação, 900 µL das culturas de interesse foram adicionadas a 100 µL de glicerol estéril, homogeneizados em agitador mecânico e estocados a - 80° C.

3.2 Reações de digestão enzimática

As clivagens de DNA com endonuclease de restrição foram realizadas com enzimas específicas para os sítios de restrição utilizados em cada reação de clonagem. Para tal, 20 µL de produto de PCR purificado ou 3 µg de plasmídeo foram incubados com 1 µL da enzima de restrição (10 U/µL), tampão 10 x específico para a enzima, BSA (10 µg/mL) 10x e água suficiente para completar uma reação para 40 µL. A reação era incubada a 37° C (exceto quando especificado pelo fabricante) por pelo menos quatro horas. Ao final, as enzimas de restrição eram inativadas após serem incubadas a 75° C por 15 minutos. O

produto da digestão era analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL.

3.3 Purificação de fragmentos obtidos por PCR ou digestão enzimática e ligação em plasmídeos

Uma vez confirmada a PCR ou digestão, a solução foi submetida à purificação em coluna com o Kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante. O método baseia-se na absorção do DNA por uma coluna de sílica.

Os DNAs purificados foram utilizados em reação de ligação com T4 DNA Ligase (Fermentas) seguindo a proporção 5:1 de inserto:vetor e levando em consideração o tamanho de cada fragmento. A reação foi incubada por 1 hora a 16° C e por 16 horas a 22° C. Em seguida, foram utilizadas na transformação de bactérias competentes.

3.4 Transformação bacteriana

Nesse trabalho foram utilizadas *E. coli* pertencentes à linhagem X11- Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^dZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*) e BL21 (DE3) pLysS (*F⁻, ompT, hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cm^r*)

As transformações utilizando bactérias termocompetentes foram feitas com bactérias estocadas a -80° C, após essas terem sido incubadas em gelo por cinco minutos para descongelamento. Em condições de esterilidade foi adicionado à bactéria o plasmídeo a ser incorporado. A bactéria foi, então, incubada no gelo por trinta minutos, exposta a 42° C por sessenta segundos e imediatamente colocada no gelo, gerando o choque térmico que permitiu a entrada do DNA exógeno. Após cinco minutos de incubação em gelo adicionou-se, sob esterilidade, 500 µL de meio de cultura 2xYT (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, 15 g ágar, água q.s.p. 1 L), de modo a permitir a recuperação e crescimento da cultura transformada através de agitação a 180 rpm a 37° C por uma hora. Em seguida, 100 µL da cultura foram plaqueados em placa de Petri contendo 2xYT ágar (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, 15 g Agar, água q.s.p. 1 L) e 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37° C por dezesseis horas.

3.5 Seleção de clones bacterianos por PCR de colônia

Com o objetivo de verificar a presença do DNA de interesse nas bactérias transformadas, essas foram submetidas à PCR de colônia. Para tal, colônias foram aleatoriamente selecionadas e lisadas em 30 μ L de tampão de lise (10 mM Tris pH 8,0, 0,1 mM EDTA, Tween 20 a 0,1%). Em seguida, a solução foi incubada a 95° C por dez minutos e centrifugada por um minuto a 14000 rpm, para que o DNA ficasse suspenso em solução. Um volume de 4 μ L da suspensão foram utilizados em reação de PCR contendo 0,2 μ g/mL de dNTP, tampão de amostra 5x, 5 U/ μ L de Taq DNA Polimerase e 5 μ M dos iniciadores. As reações foram feitas em termociclador PTC-100TM (MJ Research Inc) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 94° C por 3 minutos; 31 ciclos de 94° C por 1 minuto, anelamento a uma temperatura dependendo da seqüência do iniciador utilizado por 1 minuto e extensão a 72° C por tempo dependente do tamanho do amplicon a ser obtido (1 minuto a cada 1000 pares de bases); 72° C por 10 minutos.

3.6 Produção de proteína recombinante e anticorpos policlonais

3.6.1- Construção de vetor para expressão de TcMSH2Bt em fusão com polihistidinas C-terminal

A seqüência codificadora do gene *Tcmsh2*, correspondente ao alelo que codifica a isoforma B, encontrada no banco de dados TriTryp sob o número de acesso Tc00.1047053509643.80, foi previamente amplificada com iniciadores que adicionavam sítios de restrição para as enzimas *XbaI* e *NotI* e clonado no vetor pCR TOPO 2.1 (Invitrogen). O DNA obtido foi purificado por miniprep (item 3.1) e submetido à digestão enzimática com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* (Promega) a 37° C. O fragmento de interesse, correspondente aos aminoácidos 1- 431 da porção amino terminal da proteína, foi purificado a partir da excisão do fragmento de DNA correspondente em gel de agarose 1%. Paralelamente, o vetor pET21a(+) (Novagen) foi clivado com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII* (Promega). Os produtos de digestão purificados foram utilizados em reação de ligação com T4 DNA ligase (Promega), uma vez que as digestões enzimáticas com *XbaI* e *NheI* geram extremidades compatíveis. O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias XL1-Blue termocompetentes.

As colônias obtidas na transformação foram primeiramente analisadas por PCR de colônia utilizando os iniciadores Xba0 e 7442R (**Tabela 1**). Aquelas que apresentavam resultado positivo após análise em gel de agarose 1% foram inoculadas em meio de cultura 2xYT (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, água q.s.p. 1 L) contendo ampicilina (100 µg/mL) e crescidas por dezesseis horas a 37° C a 180 rpm. O DNA plasmidial foi extraído por miniprep (item 1) e submetido à digestão enzimática com *XhoI*.

Após verificar a clonagem por PCR de colônia e digestão enzimática, aquelas que se mostraram positivas foram utilizadas na transformação da bactéria para expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

3.6.2- Expressão da proteína TcMSH2Bt recombinante.

Os transformantes foram selecionados em placa de 2xYT ágar (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, 15 g ágar, água q.s.p. 1 L) contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL).

Algumas colônias foram escolhidas para o experimento de indução, no qual foi feito pré-inóculo em 3 mL de meio 2xYT (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, água q.s.p. 1 L) contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) crescido por dezesseis horas em agitador (37° C a 180 rpm). Na manhã seguinte, foi feito repique (diluído 1:20) em meio 2xYT (16 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl, água q.s.p. 1 L) contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). O crescimento ocorreu sob agitação (37° C, 180 rpm) até que foi atingida densidade óptica (OD) de 0,4 a 0,6 a 600 nm. Um volume de 1 mL de cultura foi coletado e o pellet congelado a -20° C para análise de amostra de culturas não induzidas. Neste momento, a expressão foi induzida com a adição de IPTG (isopropil tio-β-galactosídeo) na concentração final de 1mM. Novas amostras foram coletadas em intervalos de 2 e 4 horas de modo que o número de células foi sempre mantido. As amostras foram lisadas em água e tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), fervidas por cinco minutos e armazenadas a -20° C, até serem analisadas em SDS-PAGE ou por *western blot* utilizando anticorpos comerciais α- histidina.

3.6.3- Purificação da proteína TcMSH2Bt recombinante por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante produzida foi analisada quanto à sua solubilidade. Para tal, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos e o pellet ressuspendido em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7.4. A lise foi feita a partir de repetidos ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37° C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante corresponde à fração solúvel, enquanto no pellet estão concentradas as proteínas insolúveis. O pellet foi, então, ressuspendido em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7.4 em volume correspondente ao que foi obtido para o sobrenadante. As frações solúvel e insolúvel foram analisadas em gel de poliacrilamida 12,5 % corado com azul de comassie e por *western blot*.

Para tentativa de solubilização da proteína recombinante expressa na forma de corpúsculos de inclusão foi aplicado o mesmo processo descrito acima. Porém, à solução de tampão fosfato de sódio 20 M pH 7.4 foi adicionado sarkozyl 1,5% e triton 4% ou diferentes concentrações de uréia (2 M, 4 M ou 8 M).

A purificação da proteína recombinante com cauda de histidina foi realizada por cromatografia de afinidade no cromatógrafo ÄKTA PrimePlus, ao qual foi acoplado uma coluna com resina em níquel (HisTrap HP- Amersham Biosciences). Antes de aplicar a amostra no cromatógrafo, à solução de proteína solubilizada foi adicionado NaCl 0,5 M e imidazol 40 mM. A eluição da proteína da coluna foi feita com tampão de eluição contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, uréia 4 M pH 7.4. As frações eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 12,5 % corado com solução de nitrato de prata.

As amostras que continham a proteína recombinante foram dialisadas para que a uréia fosse retirada antes de serem utilizadas na imunização de camundongos. A diálise foi feita após aplicar toda as amostras no cassette Slide-A-Lyzer® Dialysis 2,000 MWCO (Pierce) e colocá-lo em tampão PBS (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2) contendo uréia 4 M sob agitação magnética por 2 horas a 4° C. Em seguida, o tampão foi trocado por PBS acrescido de uréia 2 M e continuou sendo agitado por mais 2 horas. E finalmente, o tampão foi trocado por PBS e agitado por 16 horas.

Após a diálise eram obtidos por volta de 40 mL de proteína purificada. Para concentrar a solução, a amostra foi centrifugada a vácuo no speed vac (Eppendorf) até que fosse atingido o volume e concentração ideal para injetar nos camundongos.

3.6.4- Imunização de camundongos Balb/C com MSH2Bt recombinante

Para produção de anticorpos policlonais anti-MSH2 foram imunizadas quatro fêmeas de camundongos Balb/C com 5 doses de 20 µg de proteína recombinante. As doses foram inoculadas por via intraperitoneal. Três semanas após a primeira dose a imunização foi reforçada. O reforço foi repetido por mais três vezes em intervalos de duas semanas, após as quais os animais foram sacrificados e o soro retirado.

3.7 Western blot

Os ensaios de *western blot* foram realizados em membrana de nitrocelulose de acordo com protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

3.8 Preparação de extratos protéico de *T. cruzi*

Epimastigotas no início da fase log foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS e lisadas com tampão A (Hepes 10 mM pH8.0, NaCl 50 mM, EDTA 1mM, MgCL₂ 5 mM, NP 40 %, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/mL, Triton X-100 0,25 %, glicerol 5 %) após tratamento por 15 minutos a 4° C. A solução foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante, contendo proteínas citoplasmáticas, foi transferido para outro tubo e armazenado a -20° C até o momento do uso. O pellet, contendo proteínas nucleares, foi lavado com tampão B (Hepes 10 mM pH8.0, NaCl 50 mM, EDTA 1mM, MgCL₂ 5 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/mL, glicerol 5 %) com incubação a 4° C por 10 minutos. O pellet obtido após centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C foi ressuscitado em tampão A e também estocado a -20° C. Para obtenção de extrato total, após serem lavadas com PBS as células foram ressuscitadas em tampão A.

Antes de serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, as amostras foram tratadas com tampão de amostra 4x (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%;

SDS 2%; β -Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), transferidas para uma seringa com agulha gauge 18 e submetidas a repetidas passagens na seringa para fragmentação do DNA. Em seguida, foram fervidas por cinco minutos e armazenadas a -20° C.

3.9 Construção de vetor para localização de TcMSH6

Como estratégia para imunolocalização de TcMSH6 foi construído o vetor pTREX_Neo_MSH6::RFP, o qual permite a expressão de proteínas em fusão com a proteína fluorescente vermelha. O vetor pTREXRFP (DaRocha *et al.*, 2004a) foi linearizado com a enzima de restrição *XbaI*. Simultaneamente, a região codificadora do gene *Tcmsh6* (Tc00.1047053510187.430) foi amplificada por PCR do gDNA de CL Brener com os iniciadores MSH6LocFor e MSH6LocRev (**Tabela 1**), os quais adicionam sítios para a enzima de restrição *XbaI* nas duas extremidades. MSH6LocRev possui uma mutação no stop códon. O amplicon correspondente a 3036 pb foi digerido com *XbaI* e utilizado em reação de ligação com pTREXRFP também digerido. As colônias obtidas foram analisadas quanto à orientação do inserto através de reação de digestão enzimática com *NotI*, a qual liberou fragmentos de 6307 pb e 3637 pb. O inserto na orientação invertida levaria à linearização do vetor, devido à proximidade dos sítios. A região de fusão entre as proteínas TcMSH6 e RFP foi seqüenciada utilizando os iniciadores MSH6LocSeq e RFPLocSeq (**Tabela 1**) com reações em triplicata.

3.10 Construção de vetores para deleção gênica

As regiões 5' e 3' UTR dos genes *Tcmsh6* e *Tcmlh1* foram amplificadas por PCR com os iniciadores *Kpn0-5UTRmsh6*, *Spe1-5UTRmsh6*, *EcoRV0-3UTRmsh6*, *Xho1-3UTRmsh6*, *Kpn0-5UTRmlh1*, *Spe1-5UTRmlh1*, *EcoRV0-3UTRmlh1* e *Xho1-3UTRmlh1* (**Tabela 1**). Esses iniciadores adicionam sítio de restrição para as enzimas *KpnI* e *SpeI* na 5' UTR e para *EcoRV* e *XhoI* na 3' UTR. Os amplicons obtidos foram clonados no vetor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A seqüência correspondente ao gene de neomicina fosfotransferase foi previamente clonada em pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Em um primeiro momento, os vetores contendo as regiões 5' dos genes *Tcmsh6* e *Tcmlh1* foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *SpeI*. A

clivagem foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos correspondentes a cada gene (5'UTR *msh6*: 502 pb, 5'UTR *mlh1*: 517 pb) foram excisados dos géis e purificados (seção 3.3). Paralelamente, o vetor pCR 2.1 TOPO_Neo foi digerido com as mesmas endonucleases de restrição. O vetor e os insertos purificados foram utilizados em reação de ligação com T4 DNA Ligase (Fermentas) e na transformação de *E. coli* XL1-blue termocompetente. Em seguida, os vetores contendo as regiões 3' dos genes *Tcmsh6* e *Tcmlh1* foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRV* e *XhoI*. Paralelamente, o vetor pCR 2.1 TOPO 5'UTR_Neo foi digerido com as mesmas enzimas. Os DNAs foram purificados, ligados e utilizados na transformação de *E. coli* XL1-Blue.

A clonagem dos fragmentos correspondentes às regiões 5' ou 3' UTRs foram avaliados por PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para cada gene. A construção pCR2.1 TOPO 5'UTR_Neo_3'UTR foi analisada, também, por digestão enzimática com *PvuII*.

Como estratégia adicional foi construído um vetor contendo as seqüências regulatórias HX1 e GAPDH chamado pCR2.1TOPO_5'UTR_HX1_Neo_GAPDH_3'UTR. Para tal, a seqüência correspondente a HX1_Neo_GAPDH foi amplificada por PCR com os iniciadores HX1 e GAPDHRevEcoRV (**Tabela1**) a partir de um plasmídeo previamente construído e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Wanderson D. DaRocha da Universidade Federal do Paraná. O amplicon obtido foi clonado no vetor pGEM T-easy (Promega). Os vetores pCR2.1TOPO_5'UTR_Neo_3'UTR e pGEM T-easy_ HX1_Neo_GAPDH (com o inserto na orientação invertida) foram digeridos com as enzimas de restrição *SpeI* e *EcoRV*. Os fragmentos correspondentes a pCR2.1TOPO_5'UTR_3'UTR e a HX1_Neo_GAPDH foram purificados e ligados com T4 DNA Ligase (Fermentas), de modo que o gene de Neo na construção pCR2.1 TOPO 5'UTR_Neo_3'UTR foi substituído por HX1_Neo_GAPDH. O vetor construído foi avaliado por PCR de colônia com os iniciadores HX1 e GAPDHRevEcoRV (**Tabela1**) e por digestão enzimática com *PvuII*. As construções foram amplificadas com os iniciadores *Kpn0-5UTRmsh6* e *Xho1-3UTRmsh6* ou *Kpn0-5UTRmlh1* e *Xho1-3UTRmlh1* antes das transfecções.

3.11 Transfecção de epimastigotas de *T. cruzi*

Para os experimentos de transfecção foram utilizados 10^7 células/mL de parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento. A quantidade de DNA foi

dependente do objetivo da transfecção. Nos experimentos de deleção gênica foram utilizados 100 µg de DNA, já nas transfecções para localização foram utilizados 100 µg do vetor pTREXRFP e 200 µg do pTREX_Neo_MSH6::RFP. As culturas foram coletadas do meio LIT por centrifugação a 3000 rpm por dez minutos a 4° C e lavadas duas vezes em tampão PBS (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2). Em seguida, foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por dez minutos a 4° C e ressuspensas em 900 µL de tampão de eletroporação [tampão CITOMIX (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 25 mM HEPES; pH 7,4) e tampão Sacarose (277 mM sacarose; 7 mM KH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; pH 7,4), na proporção 3:1]. Em cada cuvette de eletroporação de 0,2 cm (Gene Pulser BioRad) foram adicionados 400 µL da suspensão e o DNA a ser incorporado. As cuvetas foram mantidas no gelo por quinze minutos, após os quais foram acopladas ao eletroporador BioRad Gene Pulser (Hercules, CA) ajustado para pulsos de 0,3 kV / 500 µF / 2 pulsos com 10 s de intervalo entre eles / constantes de tempo entre 3 e 6 ms. Em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente por dez minutos, após os quais o seu conteúdo foi transferido para 5 mL de meio LIT (Camargo, 1964) completo (10% soro fetal bovino + penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL).

3.12 Análise por microscopia de fluorescência de parasitas transfectados

Vinte e quatro e quarenta e oito horas após a transfecção foram preparadas lâminas contendo 20 µL da cultura de parasitas lavados e ressuspensos em PBS (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2). Para fixação dos parasitas foi utilizado paraformaldeído 4%. As lâminas fixadas e seladas foram levadas ao microscópio de fluorescência e observadas em objetiva de 60 x.

Tabela 1 – Descrição de seqüência e sentido dos iniciadores utilizados no trabalho

Iniciador	Sentido	Seqüência (5' → 3')
XbaO	Direto	TCTAGAATGACTGATGAACGGGACG
7442R	Reverso	CCCACCCTGATTTCCTTGCCCG
MSH6LocFor	Direto	CCCTCTAGACCTACGGGAATGGATGAC
MSH6LocRev	Reverso	AAGTCTAGACGACGACTTCTTTTTCTT
MSH6LocSeq	Direto	TCGTGCACATGGCAGCCATC
RFPLocSeq	Reverso	CTTCCATACTGAAATTGTGG
Kpn0-5UTRmsh6	Direto	TGGTACCGGGAATATGCCTCAGTGTGGA
Spe1-5UTRmsh6	Reverso	GGTACTAGTCGTAGGAAGAGCCCAACCA
EcoRV0-3UTRmsh6	Direto	GTGATATCTGCACACAGCTTCGTTTA
Xho1-3UTRmsh6	Reverso	ACTCGAGAGTAACTTAACAAGTAAATGA
Kpn0-5UTRmlh1	Direto	GTGGTACCTTGAGAGTGTATTTGGGTG
Spe1-5UTRmlh1	Reverso	ACACTAGTCCAGCAGTTCCTTCAGCGC
EcoRV0-3UTRmlh1	Direto	GTGATATCGAAGGAGTGGAGTCGCTTTCA
Xho1-3UTRmlh1	Reverso	CCCTCGAGTTTTTGTGTTGTTTGTGCTGT
HX1	Direto	TTCTTCAAATATGCAGCGG
GAPDHRevEcoRV	Reverso	CCGATATCCCGAGGGTCGCTCG
MSH6 5'ko	Direto	ATTTGAGGTTATTATTATTATTTATGC
MSH6For	Direto	CTAGTTGACTGTGCGGACGTTTACCGC
MSH6Rev	Reverso	TGAAGGAACTGTCGTATGGTATGAATG
NeoFor	Direto	CGACCCTGCAGCCAATATGGGATCG
NeoRev	Reverso	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG

4. RESULTADOS

4.1 Expressão TcMSH2 recombinante e produção de anticorpos policlonais anti-TcMSH2

O clone CL Brener, usado como referência para o projeto genoma de *Trypanosoma cruzi*, contém 2 alelos que apresentam seqüências distintas para o gene *Tcmsh2*, denominados *Tcmsh2B* e *Tcmsh2C*, resultado do seu caráter híbrido (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). A seqüência primária de aminoácidos indica que duas isoformas da proteína, com massas moleculares preditas de 110 e 106 KDa, são expressas no clone CL Brener.

Devido às dificuldades inerentes à clonagem e à expressão do gene completo em vetores de expressão, optamos por expressar uma versão truncada da proteína correspondente ao domínio de ligação ao DNA e reconhecimento de erros de pareamento, a partir de seqüência parcial do alelo *Tcmsh2B* (veja em Material e Métodos, seção 3.6.1). A seqüência de interesse foi clonada no vetor pET21a(+) que adiciona uma seqüência de poli-histidinas na porção C-terminal. Após a transformação de *E. coli* BL21pLysS, a expressão da proteína recombinante foi feita mediante adição de IPTG. De acordo com a seqüência primária, uma proteína de peso molecular de 49 KDa, correspondente a 431 aminoácidos da extremidade N-terminal da isoforma B de TcMSH2 seria produzida.

A clonagem do fragmento gênico que gerou a proteína truncada foi confirmada por PCR de colônia, digestão enzimática e seqüenciamento do plasmídeo. Na **Figura 6 A** está a representação esquemática do vetor pET21a(+) após a clonagem de seqüência parcial do gene *Tcmsh2B*, o qual foi denominado pET21a_MSH2Bt. Em destaque, está a localização dos sítios para a enzima de restrição *XhoI* no vetor. Essa enzima foi utilizada na digestão enzimática do vetor pET21a(+) com e sem a seqüência parcial de *Tcmsh2B*. O resultado da reação de digestão foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1% (**Figura 6 B**). É possível observar que os dois plasmídios apresentam diferentes perfis de digestão enzimática frente à mesma endonuclease de restrição. Na presença da seqüência de *Tcmsh2Bt* são liberados fragmentos de 5781, 502 e 395 pb, enquanto o vetor pET21a(+) vazio é apenas linearizado, dando um fragmento de 5,4 Kb.

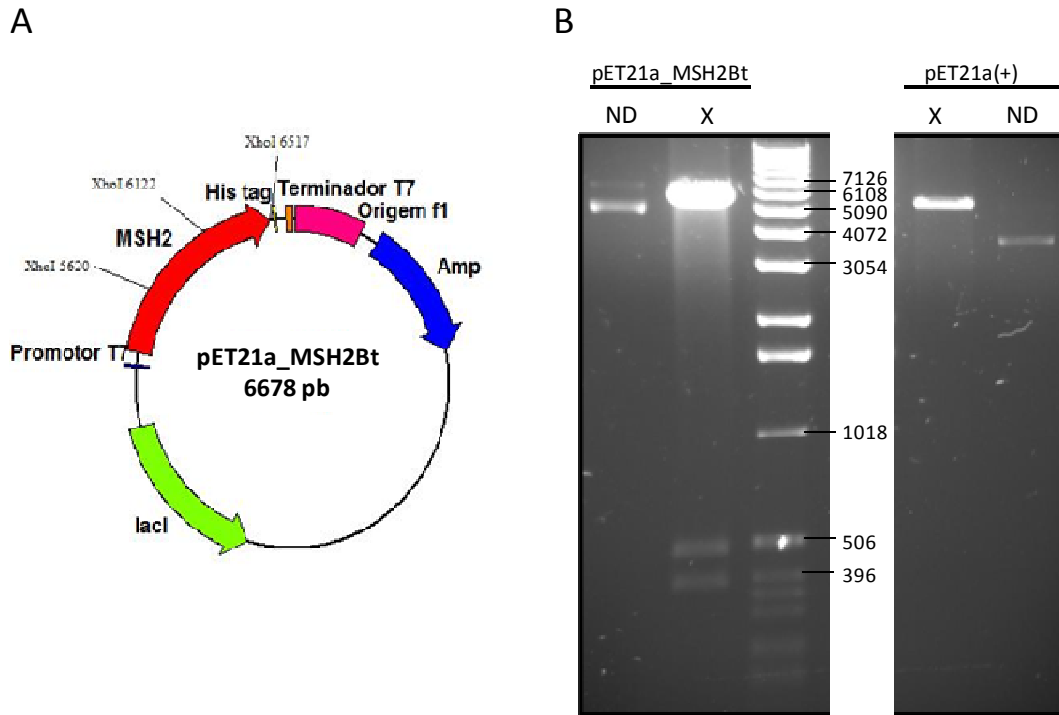


Figura 6: Plasmídeo para expressão da proteína TcMSH2B truncada. **A)** Representação esquemática do vetor pET21a_MSH2Bt. Em destaque a localização dos sítios para a enzima de restrição *Xho*I. **B)** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) com os produtos de digestão com *Xho*I (X) dos vetores pET21a_MSH2Bt e pET21a(+), bem como dos mesmos vetores não digeridos (ND). Na presença de sequência parcial do gene *msh2B* são liberados fragmentos de tamanhos 5781, 502 e 395 pb. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1Kb Ladder (Invitrogen).

Uma vez confirmada a clonagem, o vetor contendo o gene de interesse foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. A expressão da proteína de interesse ocorreu 4 horas após a adição de 1mM de IPTG, como mostrado no gel de poliacrilamida 12,5% (**Figura 7 A**), no qual foram avaliadas frações coletadas antes e depois da adição de IPTG.

Os extratos protéicos totais de bactérias obtidos após a indução com IPTG foram avaliados quanto à solubilidade da proteína recombinante. Após a lise das bactérias por ciclos de congelamento-descongelamento, foi observado que a proteína recombinante encontrava-se na forma insolúvel, formando corpúsculos de inclusão. Para solubilização da proteína, os extratos protéicos foram submetidos a dois tipos de tratamentos: (a) Sarkozyl 1,5% + Triton 4% ou (b) Uréia (4M ou 8M). Após a adição desses reagentes, os extratos foram centrifugados e o pellet (fração insolúvel - I) e o sobrenadante (fração solúvel - S) foram analisados por gel de poliacrilamida 12,5 %. Conforme observado na **Figura 7 A**, apenas o tratamento com uréia 8M foi capaz de reverter a insolubilidade da proteína para a forma solúvel. Através de ensaio *western blot* (**Figura 7 B**), foi possível confirmar que a proteína observada após a indução com IPTG e após os tratamentos para solubilização é uma proteína com cauda de histidina. Como controle positivo foi utilizado uma proteína da família das MASPs, que são proteínas de superfície em *T. cruzi*. A expressão heteróloga dessa proteína com cauda de histidina apresenta peso molecular predito de 60 KDa. (**Figura 7 B**).

Após a indução da expressão de TcMSH2B truncada, os extratos contendo a proteína solubilizada em uréia foram diluídos em tampão fosfato de sódio e submetidos à cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel (Material e Métodos, seção 3.6.3). Na **Figura 8 A** pode ser observado um dos cromatogramas obtidos durante as purificações. Às frações de número ímpar foi adicionado tampão de amostra de proteína e elas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% (**Figura 8 B**). A visualização das bandas foi feita após a coloração do gel com nitrato de prata, o que mostrou a eluição de apenas uma proteína, de tamanho predito de 49 KDa, correspondente a TcMSH2B.

A purificação de TcMSH2B por cromatografia de afinidade envolveu a eluição em tampão contendo 8M de uréia. Para eliminar a uréia antes da imunização, todas as frações

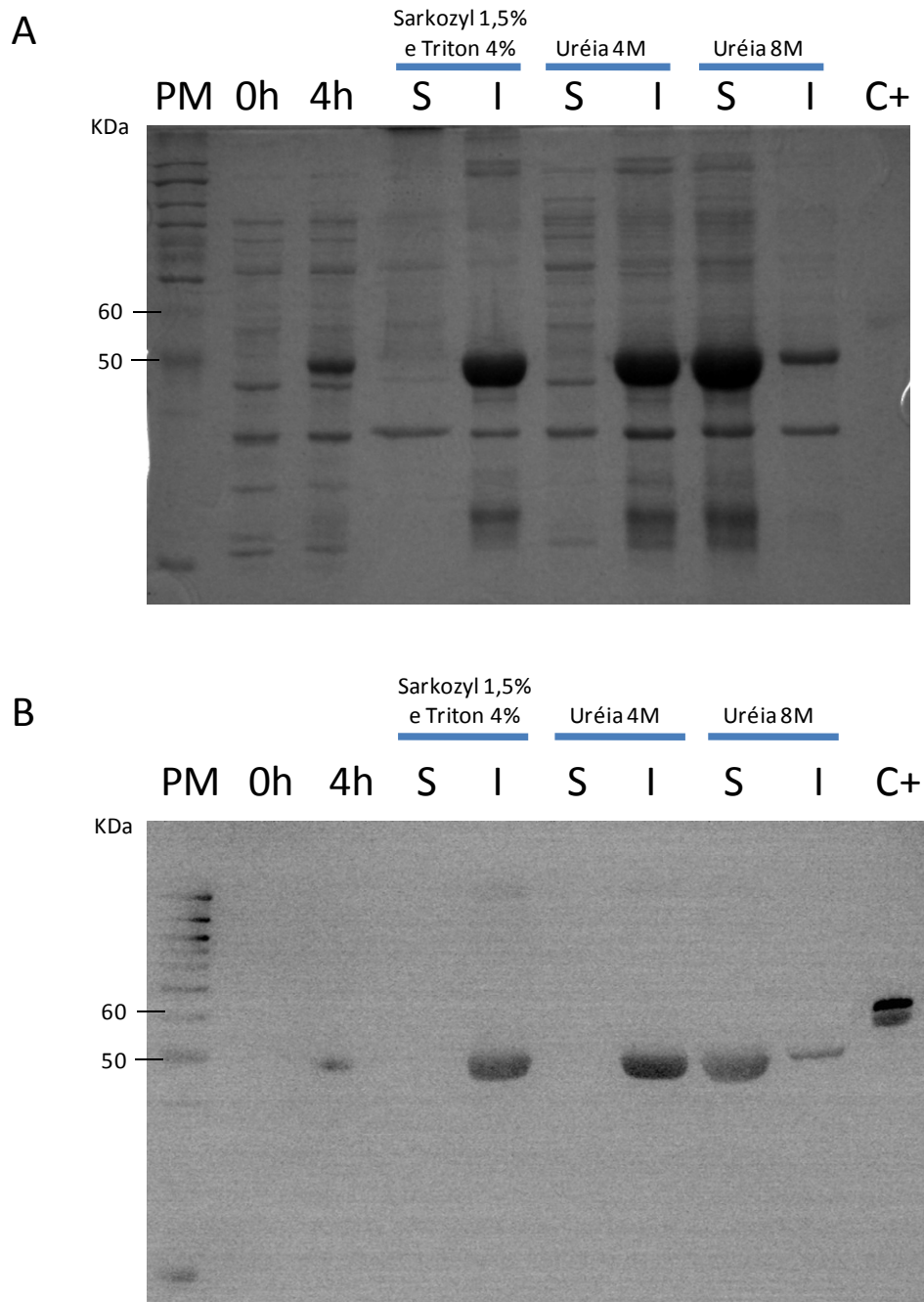


Figura 7: Expressão da proteína MSH2B recombinante em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e avaliação de sua solubilidade. **A)** Gel de Poliacrilamida 12,5% corado com Azul de Coomassie. Extrato protéico total da bactéria antes (0h) e quatro horas depois (4h) da adição de 1mM de IPTG. Frações solúvel (S) e insolúvel (I) após tratamentos com Sarkozyl 1,5% e Triton 4%, Uréia 4M ou 8M. Como controle positivo (C+) foi aplicado uma forma recombinante de MASP. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen). **B)** *Western blot* com as mesmas amostras da Figura A utilizando anticorpo anti-Histidina 1:1000 por 2h e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (conjugado à peroxidase) 1:2000 por aproximadamente 2h.

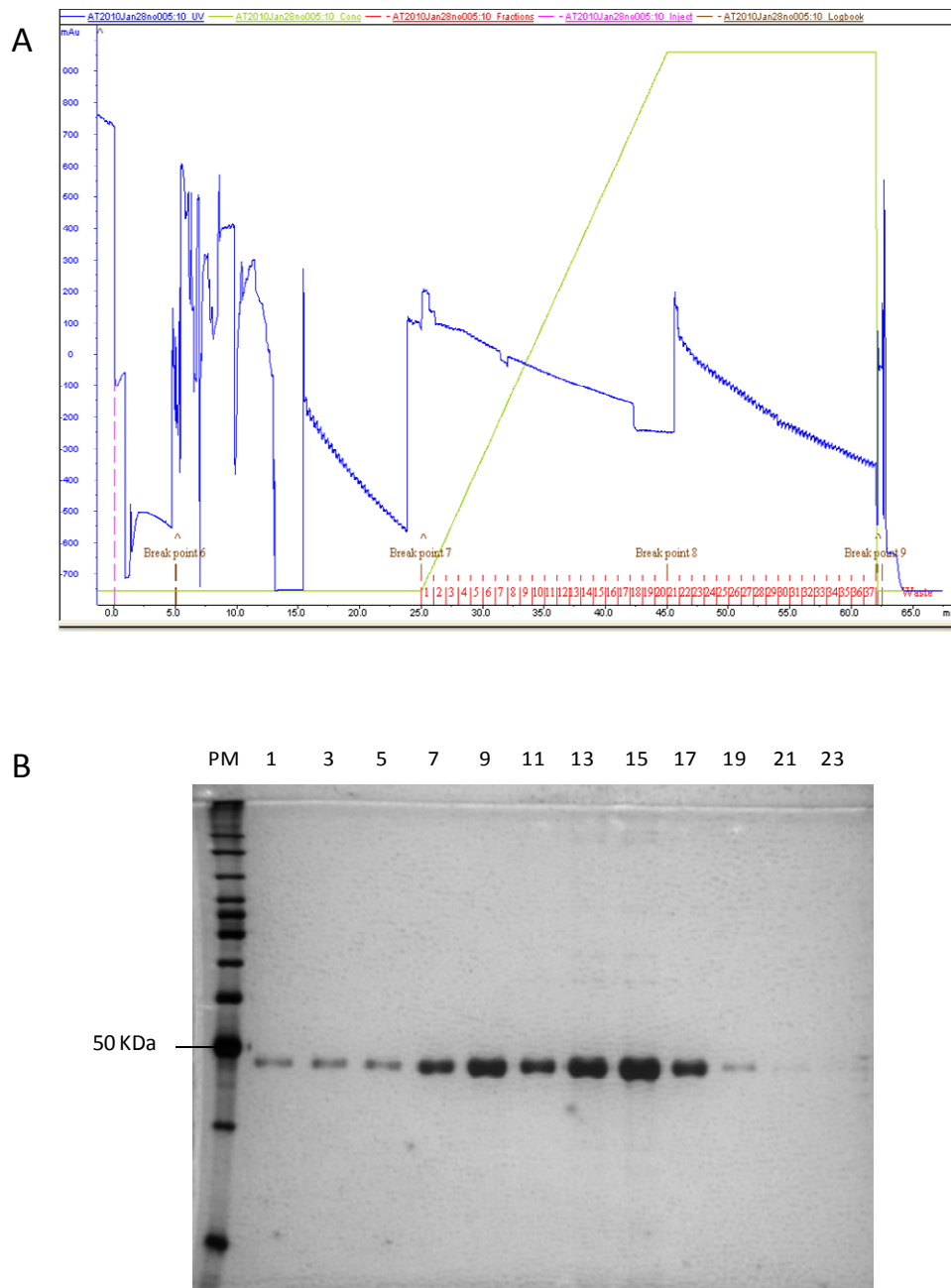


Figura 8: Purificação de TcMSH2B por cromatografia de afinidade. A) Cromatograma obtido após a purificação de 5mL de solução de proteína. A linha tracejada em rosa representa o momento em que a amostra foi adicionada. Em azul é representada a absorvância a 280 nm. A linha verde representa o gradiente do tampão de eluição: a concentração do imidazol no tampão de eluição começa a aumentar 25 min após a adição da amostra, até que atinge 100%. Nesse intervalo, são coletadas as frações no volume de 1mL. B) 5 μ L das frações de números ímpares de 1 a 23 foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. A proteína TcMSH2B truncada apresenta tamanho predito de 49 KDa. Como padrão de peso molecular (PM) foi utilizado *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen).

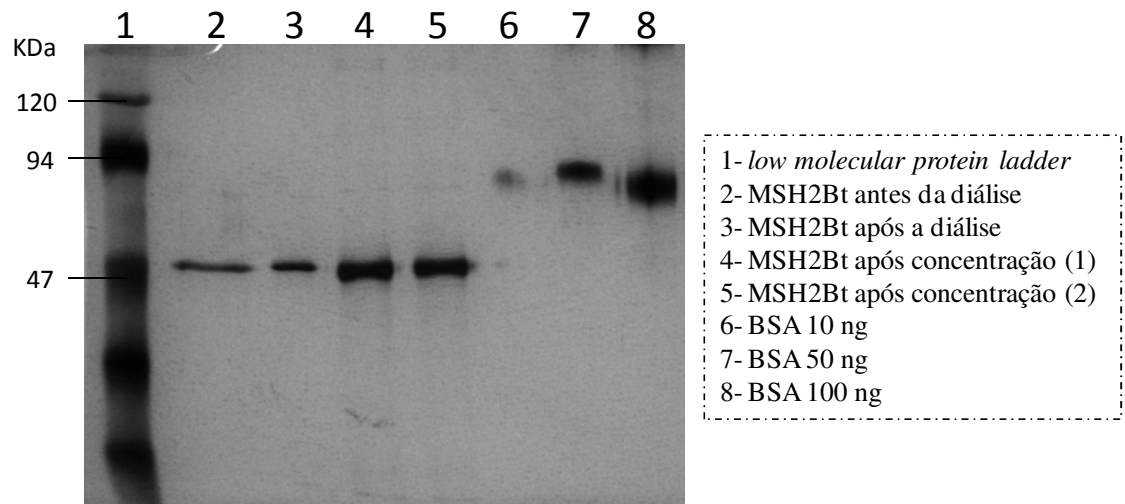
contendo proteína (**Figura 8 B**) foram dialisadas. Após a diálise, a solução de proteínas foi concentrada por centrifugação a vácuo no Speed Vac (Eppendorf). Na **Figura 9 A** está representado um gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata no qual pode ser observado as quantidades de proteína presentes em 20 μ L de solução de proteína purificada antes e depois da diálise. A intensidade das bandas no gel indica que não houve perda significativa de proteína durante a diálise.

Ao final da diálise um volume total de solução de proteína, com cerca de 40 mL, foi concentrado em dois tubos contendo 1 mL cada. O volume de 1 μ L de solução de proteína concentrada foi aplicada no mesmo gel. Diferentes concentrações de BSA (10, 50 e 100 ng) foram aplicadas como referência. Antes de ser inoculada a proteína foi quantificada por ensaio de Bradford. Várias purificações foram realizadas, com obtenção de 0,8 mg totais de proteína recombinante.

A proteína TcMSH2Bt recombinante purificada foi utilizada na imunização de quatro fêmeas de camundongos BALB/c. O soro obtido foi titulado por ELISA e em todos os animais o soro estava com título de 1:100 para o reconhecimento de 5 μ g de proteína recombinante. Na **Figura 9 B** pode ser observada uma membrana de *western blot* no qual 40 ng de proteína recombinante purificada foram incubadas com soro de um dos animais imunizados (anti-MSH2) e de um animal não imunizado (1:500).

Para avaliar se soros de animais imunizados eram capazes de reconhecer a proteína nativa em *T. cruzi*, foram feitos novos experimentos de *western blot* (**Figura 10**). Amostras contendo a proteína recombinante gerada em *E. coli*, assim como extratos protéicos totais de epimastigotas, foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com soros de animais imunizados e não imunizados. Como mostrado na **Figura 10**, enquanto a proteína TcMSH2Bt recombinante apresenta peso molecular predito de 49 KDa, duas bandas correspondentes à proteína nativa no parasito foram detectadas. A **Figura 10** mostra, portanto, que os soros obtidos possuem anticorpos que reconhecem tanto a proteína recombinante quanto a proteína nativa. Porém, apesar de reconhecer a proteína nativa com o tamanho esperado 110 KDa, também é reconhecida uma proteína de peso molecular menor, de 45 KDa presente no extrato de epimastigotas. Já o soro de animal não imunizado não reconhece a proteína recombinante ou a nativa. Os soros dos quatro animais imunizados apresentaram perfil de reconhecimento semelhante.

A



B

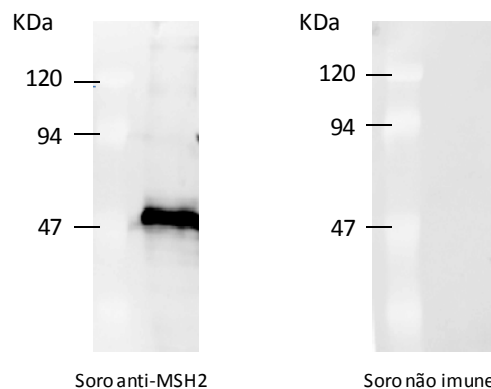


Figura 9: Análise da proteína TcMSH2Bt recombinante purificada e dos soros obtidos após imunização. **A)** Gel de poliacrilamida 10% contendo linha 1: marcador de peso molecular (BlueStep™ Protein Molecular Weight Marker - Amresco); linha 2: 20µl de solução de proteína MSH2Bt recombinante antes de ser dialisada e após ser dialisada (linha 3). Linhas 4 e 5: 1µL proveniente de dois tubos diferentes da solução de proteína MSH2Bt recombinante que foi concentrada no Speed Vac (Invitrogen). Linhas 6, 7 e 8: Diferentes concentrações de BSA (67KDa). **B)** *Western blot* no qual 10 µL de proteína recombinante foi incubado com soro anti-MSH2 (1:500) e soro não imune (1:500) por duas horas. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (GE).

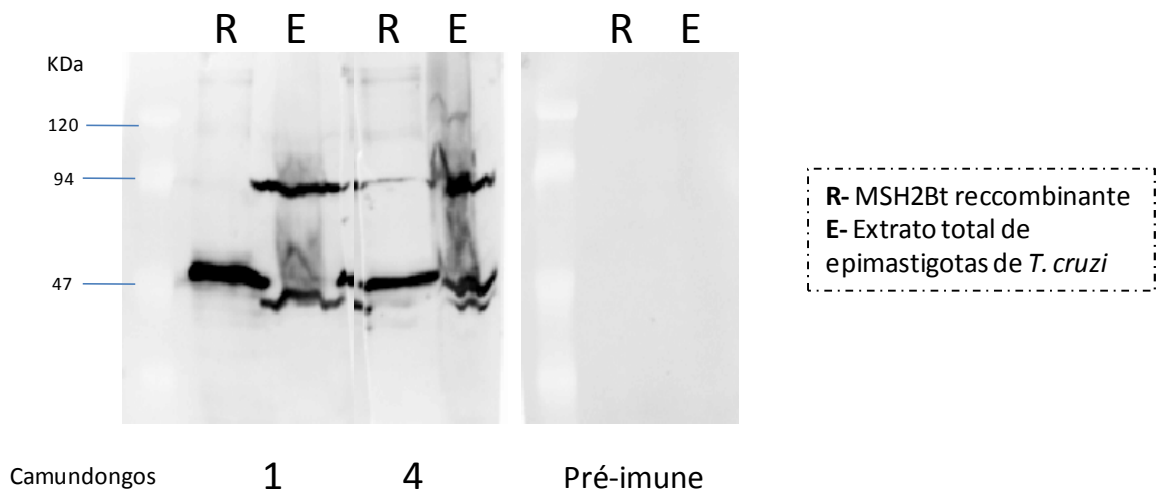


Figura 10: Reatividade de MSH2Bt recombinante e TcMSH2 nativa com soro de camundongos imunizados. 500 ng de proteína recombinante (R) e extrato protéico total de $3,0 \times 10^7$ epimastigotas de *T. cruzi* (E) foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com soro de dois animais imunizados ou de um animal não imunizados com MSH2Bt recombinante, na diluição 1:500, por duas horas. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:1000) por duas horas e meia.

De posse desses anticorpos, diversas tentativas foram feitas para obter a localização subcelular da proteína TcMSH2 por imunofluorescência, utilizando os soros dos quatro animais imunizados com TcMSH2Bt. Porém, em todos os experimentos os resultados foram inconclusivos, possivelmente devido ao baixo nível de expressão da proteína. Como estratégia alternativa, foram realizados experimentos de fracionamento celular do parasita e detecção da proteína por *western blot*. Na **Figura 11 A**, pode ser observada uma membrana de nitrocelulose para a qual foram transferidos: extrato protéico total correspondente a $2,0 \times 10^7$ epimastigotas e extratos protéicos das frações nucleares e citosólicas, correspondentes $1,2 \times 10^7$ epimastigotas, incubados com soro anti-MSH2. É possível observar que as proteínas de diferentes massas moleculares apresentam localização celular distintas em *T. cruzi*: a proteína com massa molecular de 110 KDa está presente exclusivamente na fração nuclear, enquanto a proteína com massa molecular de 45 KDa está presente exclusivamente na fração citosólica. Como controle membranas contendo os mesmos extratos foram incubadas com anticorpo anti-PEPCK (1:250), uma proteína citoplasmática (**Figura 11 B**), e anti-Pol β (1:250), uma proteína associada do cinetoplasto (**Figura 11 C**).

Como estratégia para avaliar o papel de MSH2 em *T. cruzi*, Campos e colaboradores (2010) geraram linhagens heminocautas desse gene no clone CL Brener ($\Delta Tc msh2^{+/-}$). Para verificar se nos parasitas $\Delta Tc msh2^{+/-}$ haveria uma diminuição na produção da proteína, foram realizados ensaios de *western blot* com os soros dos camundongos imunizados e extratos protéicos totais de epimastigotas de *Tc msh2* heminocautas. No *western blot* mostrado na **Figura 12** pode-se observar que, ao contrário dos extratos de parasitas selvagens, apenas a proteína que corresponde ao tamanho predito de 110 KDa é reconhecida nos extratos de três clones derivados de culturas que tiveram o alelo C de *msh2* deletado.

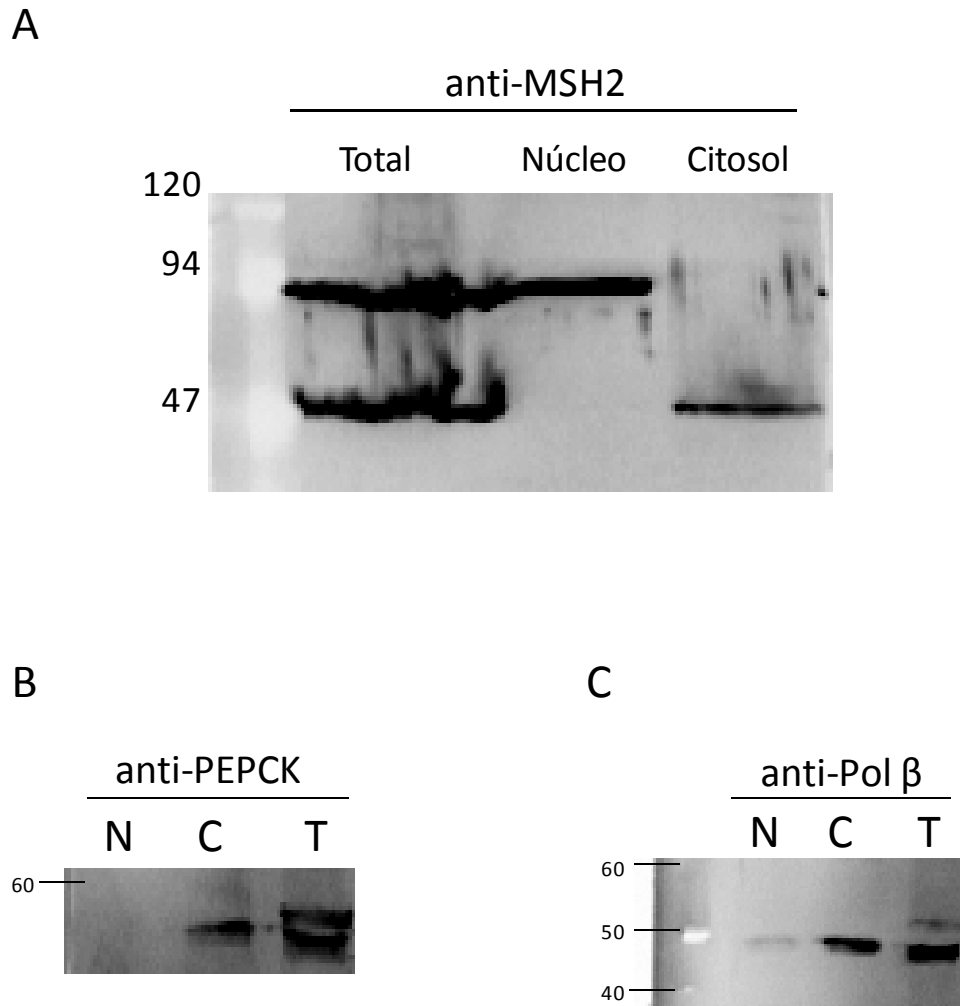


Figura 11: Proteínas reconhecidas pelo soro anti-MSH2 no extrato celular de *T. cruzi* apresentam localização subcelular distintas. **A)** Membrana de nitrocelulose com extrato total (T) de $2,0 \times 10^7$ epimastigotas e extratos nuclear (N) e citosólico (C) de $1,2 \times 10^7$ epimastigotas incubada com soro anti-MSH2 (1:500). **B)** Membrana de nitrocelulose contendo os mesmos extratos: total (T), nuclear (N) e citosólico (C) incubada com anticorpo anti-PEPCK (1:250) e **C)** anti-Pol β (1:250). Em B e C foi utilizado anti-IgG de coelho (1:500) como anticorpo secundário.

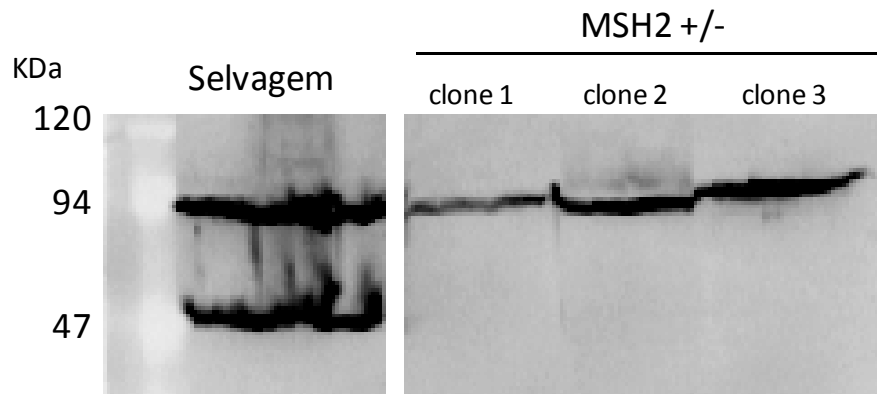


Figura 12: Expressão de TcMSH2 em CL Brener selvagem e em parasitos heminocautes $\Delta Tcmsh2$ /-. Extrato protéico total correspondente a $3,0 \times 10^7$ epimastigotas de CL Brener selvagem e de diferentes clones de heminocautes foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com soro anti-MSH2 (1:500) por 16 horas. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo por duas horas. Como padrão de peso molecular foi aplicado o BlueStepTM Protein Molecular Weight Marker (Amresco).

4.2 Localização subcelular de TcMSH6

Como estratégia para avaliar se TcMSH2 apresenta um papel MMR-independente na resposta aos danos oxidativos, decidimos caracterizar outras proteínas da via de MMR em *T. cruzi*. Como um dos heterodímeros que podem ser formados com MSH2 é o MSH6, e esse heterodímero é o responsável pelo reparo de erros de pareamento e pequenas alças de inserção e deleção (Li, 2008), decidimos investigar a localização subcelular de MSH6. Para tal, a região codificadora do gene *Tcmsh6* foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico da cepa CL Brener. O fragmento amplificado (**Figura 13 A**) foi clonado no vetor pTREXRFP (DaRocha *et al*, 2004a) de modo que a proteína TcMSH6 fosse expressa em fusão com RFP na região C-terminal. Dessa forma, pretendíamos transfectar parasitas com as duas construções, de maneira a verificar se na presença de MSH6 em fusão com RFP e MSH2 em fusão com GFP, o heterodímero MSH2/MSH6 apresentaria localização nuclear. O vetor construído para expressão de MSH6 em fusão com RFP foi denominado pTRES_Neo_MSH6::RFP (**Figura 13 B**). A clonagem foi verificada por PCR de colônia das bactérias transformadas, digestão enzimática do vetor e seqüenciamento da região de fusão entre as duas proteínas. Na **Figura 13 B** pode ser observada a localização dos sítios de restrição para a enzima *NotI*, bem como o tamanho esperado em pares de base para cada fragmento. Gel de agarose 1% da digestão enzimática com essa enzima indicou que duas colônias apresentavam o perfil esperado (**Figura 13 C**). Na **Figura 14** está representado o resultado do seqüenciamento de uma das colônias utilizadas. Como iniciador direto foi utilizado o MSH6LocSeqFor que alinha no final da região codificadora de *msh6* e como iniciador reverso MSH6LocSeqFor que alinha no início da codificadora do gene *rfp*. A seta vermelha indica o nucleotídeo do códon de terminação que foi mutado e a seta verde o códon de iniciação do gene *rfp*.

A construção obtida foi utilizada, então, na transfecção transiente de formas epimastigotas de CL Brener. Após várias tentativas não foi possível observar a expressão da proteína MSH6 em fusão com RFP, apesar de ser possível observar a fluorescência em parasitas transfectados com o vetor pTREXRFP sem o gene MSH6 em fusão (**Figura 15**).

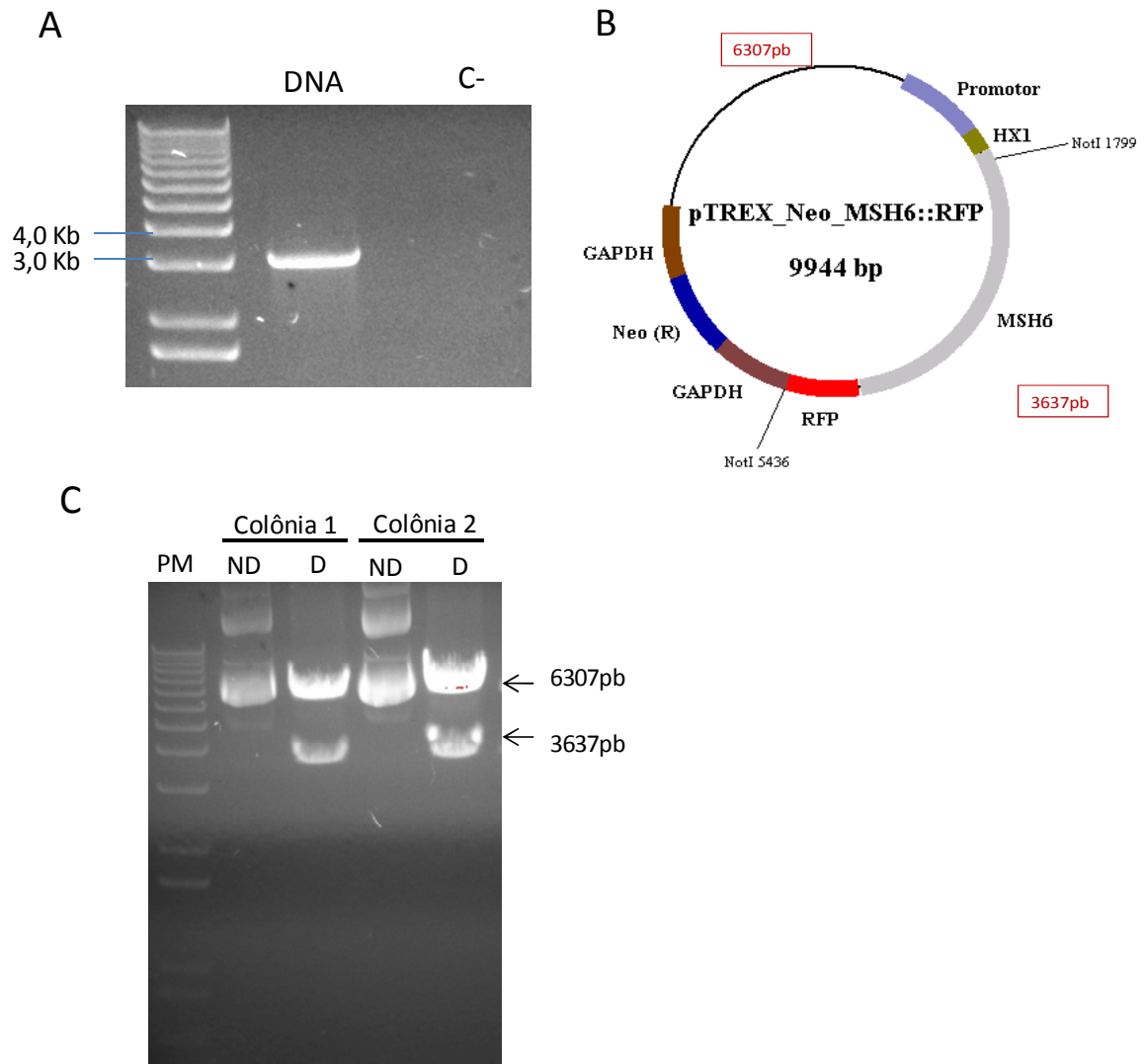


Figura 13: Vetor para localização subcelular da proteína TcMSH6 em fusão com RFP. **A)** Gel de agarose 1% com o produto de PCR correspondente à região codificadora de *Tcmsh6* que apresenta 3009 pares de base. Como controle negativo da reação (C-) foi feito o mix de PCR com todos os componentes exceto o DNA. **B)** Representação esquemática do vetor pTREXRFP com o gene *Tcmsh6* em fusão com RFP na região C-terminal. Em destaque estão os sítios de restrição para a endonuclease *NotI* e o tamanho dos fragmentos liberados com a digestão enzimática. **C)** Gel de agarose 1% no qual pode ser observado o perfil de digestão com *NotI* de duas colônias diferentes de pTREX_Neo_MSH6::RFP. ND: DNA não digerido; D: DNA Digerido. Como padrão de peso molecular, em A e C, foi utilizado o 1Kb Plus (Invitrogen).

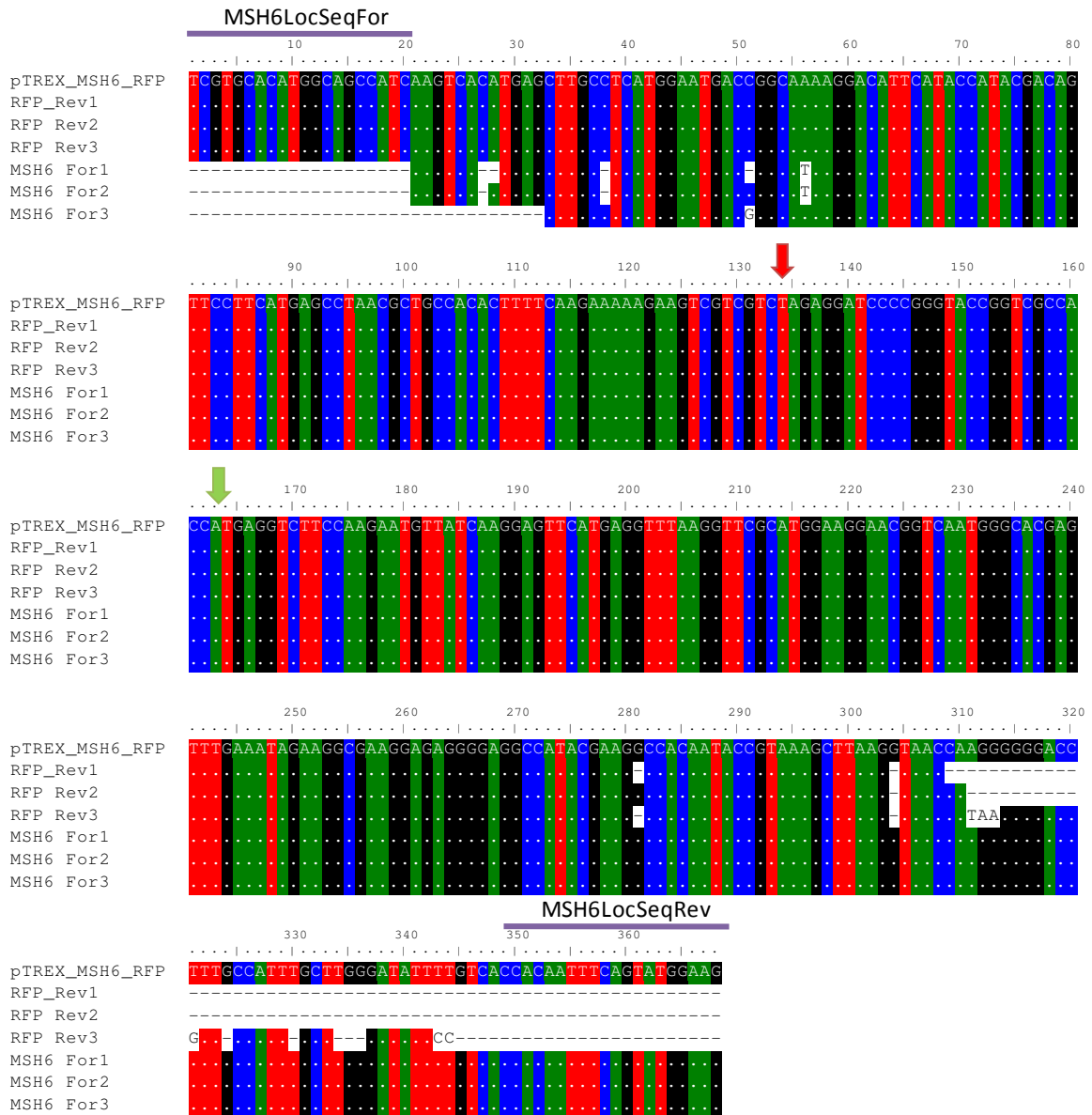


Figura 14: Sequenciamento do vetor pTREX_Neo_MSH6:RFP. A região de fusão entre os genes *Tcmsh6* e *rfp* foi sequenciada utilizando-se os iniciadores MSH6LocSeqFor e MSH6LocSeqRev, que anelam no local indicado. A reação foi feita em triplicata para cada iniciador. A seta em vermelho indica o local de mutação do códon de terminação de MSH6 e a seta verde o códon de iniciação da proteína RFP. Como referência está a seqüência montada *in silico* do vetor pTREX_MSH6_RFP.

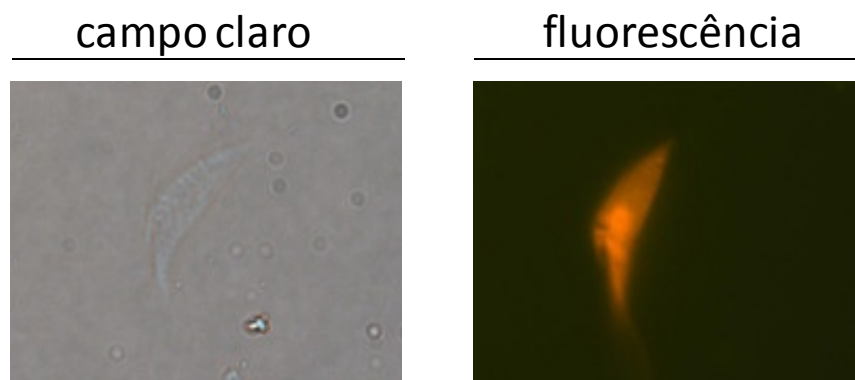


Figura 15: Transfecção de epimastigotas de CL Brener selvagem com pTREXRFP. As células foram transfectadas com 100 μ g do vetor e passaram a expressar proteína fluorescente vermelha 48 horas após a transfecção. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência.

4.3 Deleção gênica de outro gene da via de MMR

Duas estratégias diferentes foram utilizadas para deleção de outro gene da via de MMR: MSH6 (**Figura 16 A**). Inicialmente, foram geradas construções nas quais um gene de resistência a um antibiótico – neomicina fosfotransferase, por exemplo – era flanqueado por regiões 5' não traduzidas (UTR) e 3' UTR dos genes de interesse. Por recombinação homóloga, o gene de interesse é substituído pelo gene de resistência ao antibiótico, o qual poderá ser transcrito e o seu mRNA processado de acordo com os sinais de adição de *Spliced leader* (SL) e poliadenilação existentes nas seqüências *upstream* e *downstream* ao gene que foi deletado.

Várias tentativas de transfecção foram realizadas com a intenção de deletar TcMSH6 seguindo a estratégia descrita acima. Porém, em nenhuma delas foram obtidos parasitas resistentes a G418 (geneticina). Como estratégia alternativa, decidimos gerar construções em que os genes de resistência eram flanqueados por seqüências contendo sinais de processamento, sabidamente eficientes para adição de SL e cauda poli-A ao RNA mensageiro. Para tal, utilizamos as seqüências intergênicas de HX1 e GAPDH clonadas nos vetores pTREX e pROCK (Vazquez & Levin, 1999; DaRocha *et al*, 2004a). Nessas construções, as seqüências contendo os sinais de processamento são flanqueadas pelas regiões 5' e 3' UTRs dos genes de interesse, de maneira que esse cassete contendo o gene de resistência será inserido, por recombinação homóloga, no lugar da região codificadora do gene a ser deletado. A metodologia utilizada na construção dos vetores de deleção está descrita em detalhes no Material e Métodos (seção 3.10). Na **Figura 16 B** está a representação esquemática do vetor utilizado seguindo a estratégia 2. Em destaque estão os sítios de restrição para a enzima *PvuII*, bem como o tamanho dos fragmentos liberados durante a digestão enzimática com essa enzima. A clonagem do vetor para deleção de MSH6 foi verificada por clivagem com *PvuII* e analisada em gel de agarose 1% (**Figura 16 C**). Pode ser observado que apenas as colônias 2 e 3 liberaram fragmentos com os tamanhos esperados.

Após transfecção utilizando as construções descritas na **Figura 16 C**, contendo seqüências regulatórias flanqueadas por 5' UTR e 3' UTR do gene de MSH6, foram obtidos parasitas resistentes a geneticina (G418). Clones gerados a partir da população transfectada com a construção para deleção de *Tcmsh6* foram analisados por PCR (**Figura**

17). Para essas PCRs, foram desenhados iniciadores que anelam em regiões internas e externas ao gene *msh6* bem como iniciadores que anelam nas seqüências codificadoras do gene de resistência a G418. Os resultados de amplificações utilizando várias combinações de iniciadores, conforme indicado na **Figura 17 B**, mostram que apesar de apresentarem resistência a G418, para nenhum dos clones analisados foram obtidas evidências da integração do gene de resistência no locus de *Tcmsh6*.

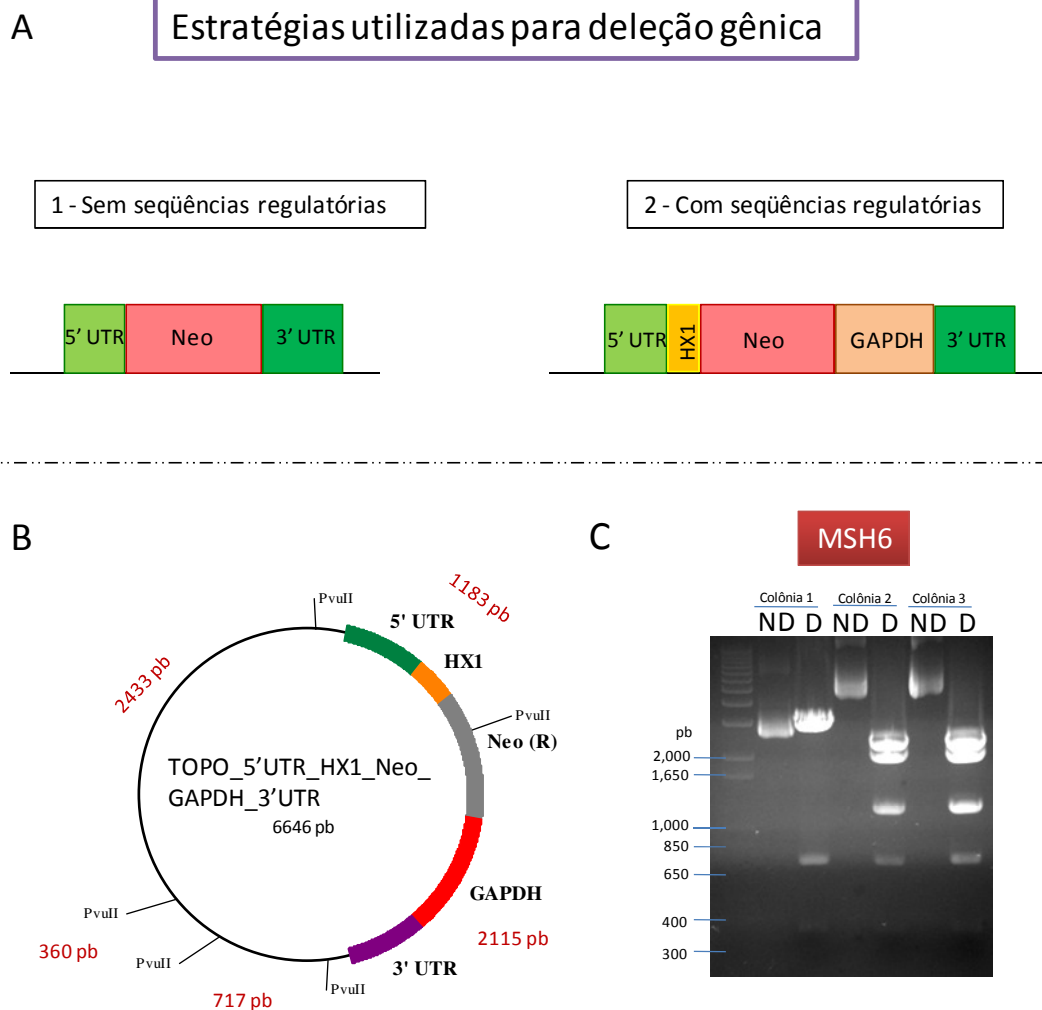


Figura 16: Deleção gênica em *T. cruzi*. A) Duas estratégias diferentes foram utilizadas para deletar genes em *T. cruzi*. Na primeira o gene de interesse é substituído por recombinação homóloga por um cassete contendo um gene de resistência a antibiótico (Neo) flanqueado por regiões 5' e 3' UTRs do gene de interesse. Na segunda estratégia o gene de resistência é flanqueado por seqüências regulatórias, representados aqui por HX1 e GAPDH. B) Representação esquemática da construção utilizada para deletar o gene MSH6 seguindo a estratégia 2. Em destaque estão os sítios de restrição para *PvuII*, bem como o tamanho dos fragmentos liberados. C) Gel de agarose 1% em que foram aplicados os produtos de digestão enzimática com *PvuII* das construções utilizadas para deletar MSH6.

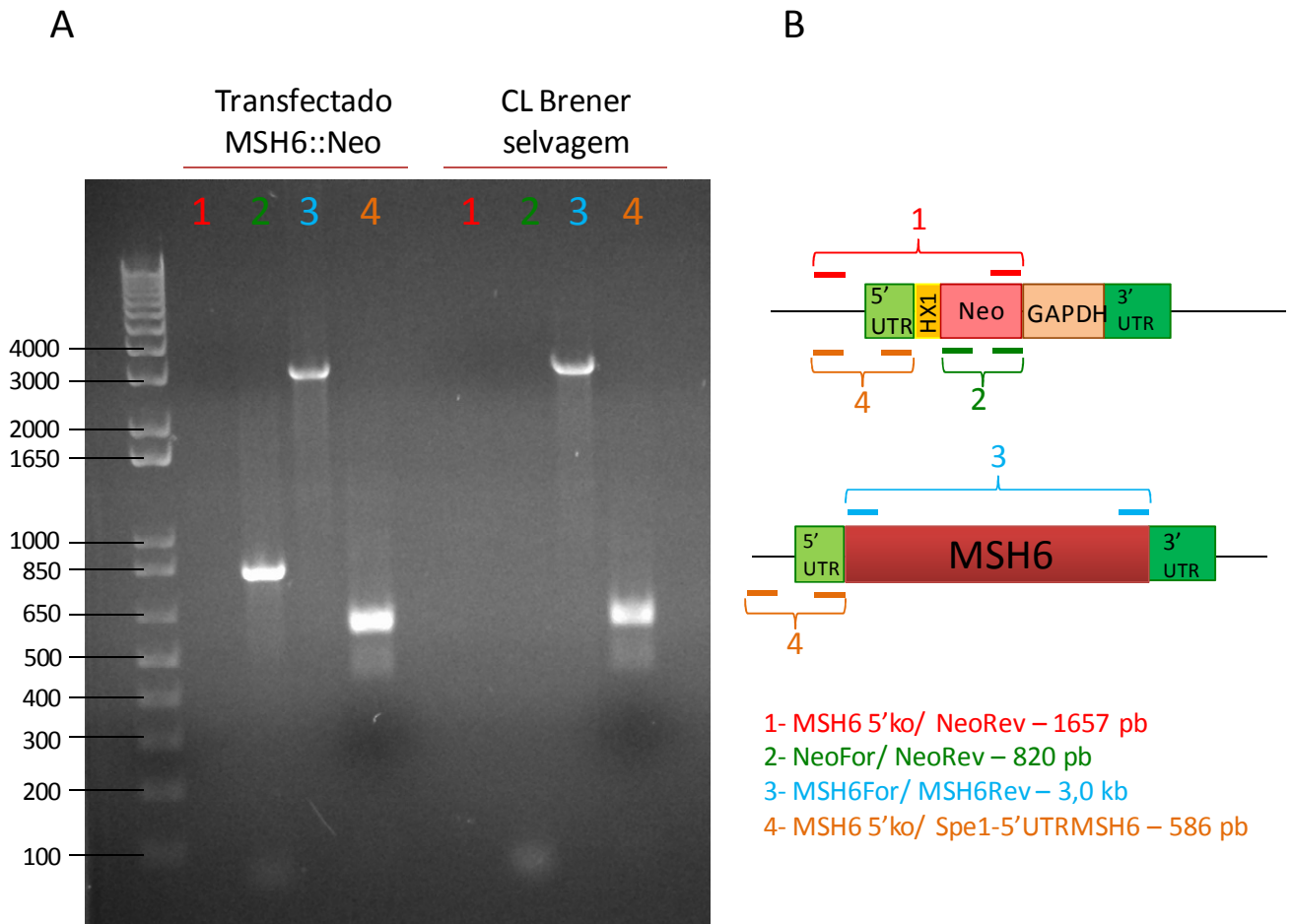


Figura 17: Caracterização de parasitas transfectados com a construção para deleção de TcMSH6 seguindo a estratégia 2. A) Gel de agarose a 1% da PCR. Como DNA molde foram utilizados gDNAs de clone resistente a G418 e de CL Brener selvagem. B) Sítios de anelamento dos iniciadores utilizados (Tabela 1), bem como o tamanho esperado para os fragmentos.

5.3 DISCUSSÃO

5.1 O MMR e o papel da proteína TcMSH2

Os estudos sobre a via de reparo de erros de pareamento (MMR) em *T. cruzi* iniciaram-se com a clonagem e caracterização do gene ortólogo ao gene *msh2* eucariótico (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Conforme descrito na Introdução, não foram identificadas no genoma do *T. cruzi* seqüências ortólogas ao gene *msh1*. Essa proteína tem sido relacionada à manutenção e reparo de danos acumulados no DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae*. Foi observado que mutantes *msh1* têm mutagênese aumentada no mtDNA, com rearranjos e deleções em larga escala. Este fenótipo não pôde ser revertido com a complementação de plasmídeo contendo o gene *msh1* (Reenan & Kolodner, 1992). A manutenção da estabilidade do mtDNA em *S. cerevisiae* está, portanto, relacionada à capacidade de reparar danos oxidativos por uma via dependente de MSH1 (Dzierzbicki *et al.*, 2003).

Na ausência de MSH1, levantamos a hipótese de que em *T. cruzi* a proteína MSH2 poderia atuar tanto na resposta a danos oxidativos no mtDNA quanto no reparo de erros de pareamento (MMR) no DNA nuclear, porém através de mecanismos independentes. Trabalhos realizados com outros organismos também sugerem papéis adicionais para MSH2. Drotschmann e colaboradores (2004) demonstraram que a função de reparo do MSH2 não é necessária para a indução de morte celular dependente de MMR após tratamento com cisplatina. Através de mutações que alteram a função no domínio ATPase de MSH, e partindo do princípio que diferentes lesões no DNA alteram o requerimento por ATP, esse grupo sugere que os dois eventos estariam desacoplados. Reforçando essa hipótese, Clodfelter e colaboradores (2005) demonstraram que mutações pontuais no gene *msh2* podem afetar o reparo ou a sensibilidade à cisplatina, mas não necessariamente ambos os eventos.

Em *T. cruzi*, linhagens heminocautas para *Tcmsh2* ($\Delta Tcmsh2^{+/-}$) apresentando uma diminuição de 50 % nos níveis de mRNA (Campos *et al.*, 2010) e da proteína TcMS2 (**Figura 12**) mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com H₂O₂, mas não apresentaram diferenças significativas frente ao tratamento com cisplatina (Campos *et al.*, 2010). Ao investigar o papel de MSH2 em *T. brucei*, Machado-Silva e colaboradores

(2008) trataram com H₂O₂ linhagens nas quais os dois alelos que codificam a proteína foram deletados. O tratamento dessas células mostra que os mutantes, além de apresentarem aumento da instabilidade de microsátélites e resistência a MNNG, são mais sensíveis aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio do que células selvagens. Esse fenótipo seria independente de outras proteínas do MMR. Por outro lado, parasitas duplo-nocautes para MLH1 apresentam comportamento semelhante à célula selvagem após tratamento com H₂O₂. Adicionalmente, a complementação dos nocautes para MSH2 em *T. brucei* com o MSH2 de *T. cruzi* é capaz de restaurar o fenótipo de resistência ao H₂O₂, mas não a completa funcionalidade da via de MMR (Machado-Silva *et al.*, 2008). Esses dados indicam fortemente que em *T. cruzi* como em *T. brucei* a resposta aos danos oxidativos gerados no DNA ocorre por uma via independente do MMR.

Em *T. cruzi* ainda não foi possível gerar linhagens duplo nocautes viáveis para o gene *msh2*, sugerindo que esse tenha um papel essencial para o parasita. Até o momento, foram obtidas linhagens heminocautes do clone CL Brener, nas quais um dos alelos foi deletado ($\Delta Tcmsh2^{+/-}$), mas não o duplo nocautes (Campos *et al.*, 2010). Entretanto, Bell e colaboradores (2004) geraram linhagens de *T. brucei* em que ambos os alelos do gene *msh2* foram deletados nas formas sangüíneas do parasita. Dados metabólicos destas linhagens transfectadas sugerem que a glicólise é a principal fonte de ATP, enquanto que na forma procíclica – presente no inseto invertebrado – o metabolismo mitocondrial é mais importante que a glicólise (Colasante *et al.*, 2007). Os estudos metabólicos em tripanossomatídeos têm se concentrado em *T. brucei*, sendo a ordem Kinetoplastida caracterizada por diversas peculiaridades metabólicas em relação aos outros eucariotos (Hannaert *et al.*, 2003). Os poucos dados bioquímicos disponíveis bem como análises proteômicas (Atwood *et al.*, 2005) indicam que a forma epimastigota de *T. cruzi* apresenta um metabolismo dependente preferencialmente da cadeia respiratória, como ocorre nas formas procíclicas de *T. brucei*. Assim, pode-se especular que a inviabilidade de se gerar clones duplo nocautes em epimastigotas de *T. cruzi*, em contraste com os dados obtidos com a forma sangüínea de *T. brucei*, seja devido ao maior dano oxidativo sofrido por esse estágio no ciclo de vida desse parasita. Células que apresentam metabolismo preferencialmente mitocondrial terão maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e se o MSH2 estiver relacionado à resposta ao dano oxidativo, de acordo com nossa hipótese, a deleção dos dois alelos de *msh2* ($\Delta Tcmsh2^{-/-}$) pode ser letal em epimastigotas.

Infelizmente, protocolos para transfecção de formas tripomastigotas, as quais apresentam um metabolismo baseado na via glicolítica, ainda não foram estabelecidos.

Para elucidar o papel da proteína MSH2, inclusive na resposta aos danos oxidativos ao DNA, é fundamental obter a localização da proteína no parasita. Com base na hipótese de que a proteína MSH2 em *T. cruzi* esteja relacionada, tanto ao reparo de DNA quanto à resposta ao estresse oxidativo espera-se encontrá-la tanto no núcleo quanto associada ao DNA mitocondrial, organizado no cinetoplasto. No presente trabalho, foi gerada uma proteína recombinante correspondente a uma forma truncada da proteína MSH2 isoforma B, para ser utilizada na imunização de camundongos e geração de anticorpos anti-MSH2. A escolha por uma versão truncada da proteína, correspondente ao domínio de ligação ao DNA, foi decorrente das inúmeras tentativas anteriores de expressão da proteína completa e ao fato de que nas tentativas de clonagem do gene completo em vetor de expressão todos os clones analisados apresentavam o inserto na orientação invertida, sugerindo que provavelmente a expressão do gene na orientação correta seria letal para a bactéria (dados não mostrados). Ainda com base na hipótese de toxicidade da proteína para as bactérias, como hospedeira foi escolhida a linhagem bacteriana BL21 (DE3) *plysS*, a qual apresenta no seu genoma o promotor *lacuv5* que controla a transcrição do gene de T7 RNA Polimerase, que é regulado pela expressão de repressor *lac*. Além disso, a bactéria possui um plasmídeo, com gene de resistência a clorafenicol, que expressa pequenas quantidades de lisozima T7, que atua como um inibidor natural da T7 RNA Polimerase, promovendo um controle maior da expressão da proteína recombinante (pET System Manual, Novagen).

Os soros anti-MSH2 obtidos foram utilizados em várias tentativas de imunolocalização através de imunofluorescência de formas epimastigotas de CL Brener de *T. cruzi* fixadas em lâminas de poli-lisina. Porém, não foi possível obter a localização subcelular da proteína por esse método (não mostrado).

Como alternativa para avaliar a expressão de TcMSH2 e sua localização subcelular, realizamos experimentos de *western blot*. Os soros obtidos com os animais imunizados são capazes de reconhecer a proteína nativa em extrato protéico total de epimastigotas de CL Brener. Uma vez que se trata de uma cepa híbrida, em CL Brener são encontradas as isoformas B e C para TcMSH2 (Augusto-Pinto *et al.*, 2003) que apresentam massa

molecular predita de 110 e 106 KDa. Nos experimentos realizados foram detectadas proteínas de diferentes pesos moleculares. Sendo a maior a correspondente ao tamanho esperado para TcMSH2 e a menor com cerca de 50 KDa. Como esperado, o soro de animal não imunizado com TcMH2Bt recombinante não é capaz de reconhecer as mesmas proteínas. Para avaliar a localização subcelular das proteínas encontradas, foram realizados ensaios de fracionamento celular. Os extratos correspondentes às frações nuclear e citosólicas foram incubados com soro anti-MSH2. Como resultado foi observado que a proteína de maior massa molecular está localizada na fração nuclear, enquanto a proteína de menor massa molecular localiza-se na fração citosólica. Como controle dos extratos utilizados, esses foram incubados com soro anti-PEPCK e anti-Pol β . Conforme foi observado na **Figura 11** a DNA Polimerase β de *T. cruzi* está localizada na fração denominada citosólica. Lopes e colaboradores (2008) observaram por imunofluorescência que a DNA Pol β em *T. cruzi* está localizada na mitocôndria. Esses dados indicam, portanto, que TcMSH2 estaria envolvido no reparo do DNA mitocondrial, uma vez que além da localização nuclear, também está localizado no fração mitocondrial.

Em experimentos de *western blot* realizados por Machado-Silva e colaboradores (2008) também é possível observar que o soro policlonal anti-MSH2 reconhece duas proteínas de massas moleculares diferentes, tanto em *T. brucei* selvagem quanto em parasitas duplo-nocautes re-expressores de *TbmsH2*. A diferença de massa molecular entre TbMSH2 com o tamanho esperado (105 KDa) e a outra proteína reconhecida pelo soro (90 KDa) é menor do que a diferença observada em *T. cruzi*. Apesar de em *T. brucei* também ser observado o papel do MSH2 na resposta ao estresse oxidativo, as proteínas MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei* apresentam apenas 64 % de identidade de aminoácidos. Isso sugere que embora relacionadas TbMSH2 e TcMSH2 podem estar atuando diferencialmente na resposta ao estresse oxidativo nos dois organismos.

Os dados de localização subcelular nos levaram a propor a hipótese de que essa proteína esteja sendo processada. A forma processada, de menor massa molecular, estaria relacionada à resposta aos danos oxidativos e teria localização mitocondrial. Em *T. brucei* já foi demonstrado que através *splicing* alternativo a sequência do *spliced leader* seria adicionada em um sítio mais interno e um códon de iniciação diferente poderia ser reconhecido na tradução pelo ribossomo (Nilsson *et al.*, 2010). Experimentos procurando

verificar se tal forma de *trans*-splicing alternativo poderia ocorrer em *T. cruzi*, levando à produção de um mRNA de tamanho menor e conseqüentemente à tradução de uma isoforma de tamanho menor de MSH2 estão sendo planejados. Alternativamente, o processamento ocorreria de maneira pós-traducional, ou seja, a isoforma maior da proteína seria traduzida e clivada antes de ser direcionada para a mitocôndria. Por outro lado, o fato de parasitas heminocautes para *Tcmsh2* ($\Delta Tcmsh2^{+/-}$) apresentarem apenas a proteína de maior peso molecular sugere que esse processamento do mRNA ou da proteína seria alelo específico. Adicionalmente, resultados preliminares de *western blot* sugerem que cepas pertencentes a *T. cruzi* I possuem apenas a proteína de maior massa molecular, enquanto cepas pertencentes a *T. cruzi* II, assim como CL Brener (*T. cruzi* III), apresentam as proteínas de maior e menor massa molecular.

Dados de *northern blot* da cepa Tulahuén mostram que MSH2 é expresso em todas as fases do ciclo de vida do parasito, mas em menor quantidade em tripomastigotas (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Dados mais recentes de microarranjo, mostrando a expressão estágio específica de muitos genes de *T. cruzi*, indicam que a expressão de MSH2 é regulada positivamente em amastigotas e negativamente em tripomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (Minning *et al.*, 2009). No interior da célula hospedeira, as formas amastigotas estão constantemente expostas aos agentes oxidantes produzidos pelo metabolismo do hospedeiro. Durante a infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento da doença, espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas como conseqüência da destruição do tecido causada pelas secreções tóxicas do parasita, reações citotóxicas mediadas pela imunidade e danos secundários à mitocôndria (Gupta *et al.*, 2009) Altos níveis de expressão de TcMSH2 na forma amastigota podem ser importantes para a resistência dessa forma aos danos oxidativos que são causados no seu DNA, garantindo o sucesso da infecção. Análises preliminares de infectividade de heminocautes de *Tcmsh2* em cultura celular sugerem que essas células geram uma quantidade de tripomastigotas extracelular significativamente menor do que parasitas selvagens. Essas células diferenciam-se em amastigotas extracelulares com uma velocidade maior do que a observada para os parasitas selvagem. Entretanto, essas análises ainda são iniciais. Novos estudos quantitativos são necessários para que possamos avaliar com maiores detalhes o efeito da deleção de um dos alelos de *Tcmsh2* no processo de infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5.2 O papel de outras proteínas da via de MMR em *T. cruzi*

Com o objetivo de caracterizar outras proteínas da via de MMR e avaliar se os fenótipos observados com relação à resposta ao estresse oxidativo decorrem de um papel de TcMSH2 que é independente do MMR, foi iniciada a caracterização de TcMSH6.

Para localização subcelular de TcMSH6 foi gerada uma construção na qual a região codificadora do gene era expressa em fusão com a proteína fluorescente vermelha em um vetor de expressão episomal – pTREX_MSH6::RFP. Proteínas fluorescentes têm sido amplamente utilizadas como repórter para localização temporal e espacial de proteínas e DNA, bem como estudos de interação proteína-proteína e de expressão gênica. É uma ferramenta extremamente útil em biologia molecular, uma vez que, em fusão com proteínas alvo, não necessita de nenhum substrato exógeno para emitir fluorescência. (Phillips, 2001; Southward & Surette, 2002). Em *T. cruzi* já foram reportados inúmeros trabalhos de transfecções com vetores contendo seqüência codificadora para GFP ou RFP, o que permite elucidar importantes aspectos da biologia do parasita, inclusive aqueles relacionados ao seu ciclo de vida e localização de antígenos no parasita (Guevara *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2006). Apesar de ser possível visualizar a expressão da proteína fluorescente quando parasitas são transfectados com o vetor pTREX_RFP sem a presença do gene de interesse, não foi possível obter a localização de TcMSH6, provavelmente devido ao baixo nível de expressão da proteína, o que não permitiu a visualização da fluorescência. Outra hipótese é que a proteína MSH6 em fusão com RFP seja instável, uma vez que esta apresenta um tamanho estimado de 138 KDa.

Apesar de não termos observado a expressão da proteína MSH6 em fusão com RFP, outros trabalhos demonstram a expressão de outras proteínas do MMR em fusão com GFP, como a MLH1 (Chen *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007), a MSH4 (Her *et al.*, 2003), além do ortólogo em procariotos MutS (Smith *et al.*, 2001; Simmons *et al.*, 2008).

Em trabalho anterior Campos (2009) demonstrou que a expressão de TcMSH2 em fusão com GFP apresenta uma localização celular citoplasmática não usual. A expressão de TcMSH6 em fusão com RFP nos permitiria não somente avaliar a sua localização, mas também a hipótese de que é necessário a pré-formação de heterodímeros MSH2/MSH6 no citoplasma antes de serem translocadas para o núcleo. A investigação do MMR em

camundongos indica que as subunidades do heterodímero MutLa precisam formar dímeros antes de serem transportadas para o núcleo (Wu *et al.*, 2003). Já em *S. cerevisiae* foi observado que o transporte de MSH2 para o núcleo não é totalmente dependente da interação com a outra proteína do heterodímero, mas MSH6 é necessário para que MSH2 seja translocado de maneira eficiente para o núcleo, bem como a manutenção dos níveis protéicos (Hayes *et al.*, 2009).

Como estratégia adicional para caracterizar *Tcmsh6* foram geradas construções para deletar o gene no parasito. Paralelamente, geramos, também, construções para deletar TcMLH1 - proteína envolvida no segundo passo da via de MMR. Como descrito na introdução, a manipulação gênica em tripanosomatídeos pode ser feita através de transfecções transientes, que permitem uma rápida análise de várias funções como regulação pós-transcricional e localização de proteínas de fusão; ou através de transfecções estáveis, na qual é utilizado um gene de resistência para selecionar os parasitas transformados. Para que ocorra a integração no genoma, a construção utilizada deve apresentar uma seqüência idêntica ao do sítio de integração proposto (Clayton, 1999). Como primeira estratégia para deletar os genes de interesse geramos construções nas quais o gene de neomicina fosfotransferase era flanqueado pela regiões 5' e 3' UTRs desses genes. Várias tentativas de se gerar linhagens estáveis foram realizadas, mas não obtiveram sucesso, possivelmente porque os sinais presentes nos genes de *Tcmsh6* ou *Tcmlh1* que determinam o processamento correto do mRNA não foram eficazes para gerar mRNAs correspondentes ao gene de resistência a G418 de forma eficiente. Partimos, então, para uma segunda estratégia, pois sabe-se que os tripanosomatídeos apresentam várias peculiaridades em relação à transcrição e ao processamento do DNA, conforme descrito em detalhes anteriormente (Introdução, seção 1.3). Acredita-se que a estabilidade do transcrito e a tradução de proteínas é amplamente controlada pela região 3'UTR e regiões intergênicas (Teixeira & DaRocha, 2003; Das & Bellofatto, 2004). Optamos por gerar construções nas quais o gene de resistência a drogas era flanqueado pela seqüência de HX1, derivada da seqüência intergênica de TcP2 β , e pela seqüência intergênica de GAPDH a fim de assegurar a expressão do gene de resistência no parasita transfectado. Vários trabalhos já demonstraram que essas regiões são altamente eficientes no processamento de DNA em *T. cruzi* (Nozaki & Cross, 1995; Xu *et al.*, 2009; Ben-Dov *et al.*, 2005; Vazquez & Levin, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003; DaRocha *et al.*, 2004a).

Os clones obtidos após a transfecção de CL Brener com a construção para deleção de *Tcmsh6* seguindo a segunda estratégia são resistentes a G418. Porém, análises de PCR do DNA genômico desses clones sugerem que a integração do cassete de deleção não ocorreu no locus de *Tcmsh6* conforme esperado. A presença de seqüências regulatórias na construção utilizada mostrou-se mais eficiente para a transcrição e tradução do gene de resistência a G418. Entretanto, a presença das seqüências regulatórias de HX1 e GAPDH pode ter levado à integralização por recombinação homóloga em algum desses loci, ao invés de ocorrer no locus de *Tcmsh6*.

As evidências obtidas até o momento indicam que, em *T. cruzi* a proteína MSH2 apresenta um papel na resposta ao estresse oxidativo que é independente do MMR. Ainda são necessários novos estudos para entender o mecanismo pelo qual essa resposta ocorre. No presente trabalho encontramos indícios de que ou a proteína ou o mRNA que codifica *Tcmsh2* possam estar sendo processados de forma a gerar duas isoformas dessa proteína com tamanhos diferentes. Os dados de fracionamento celular apresentados sugerem que a proteína de menor massa molecular estaria localizada no cinetoplasto e pode estar relacionada ao reparo do DNA mitocondrial – constantemente exposto aos agentes oxidantes gerados pela cadeia respiratória.

Como estratégias futuras, pretendemos imunoprecipitar as proteínas nativas em *T. cruzi* e utilizá-las em reação de seqüenciamento por espectrometria de massa. Dessa forma, poderemos analisar o processamento de *Tcmsh2*. Para verificar se o processamento está acontecendo no mRNA de *Tcmsh2*, esses serão seqüenciados e será feito o mapeamento da região onde está sendo adicionado o SL e a cauda poli-A. Para avaliar a interação de TcMSH2 com outras proteínas pretendemos, também, realizar ensaios de co-imunoprecipitação.

6. PERSPECTIVAS

- Determinar a localização de TcMSH2 através de imunofluorescência em parasitas submetidos ou não a agentes mutagênicos e stress oxidativo;
- Determinar a localização celular de MSH6 em *T. cruzi* através de imunofluorescência ou expressão em fusão com GFP ou RFP;
- Obter e caracterizar parasitos nocautes de Tcmsh6 e verificar o fenótipo desses nocautes frente ao tratamento com agentes que causam stress oxidativo;
- Determinar a identidade das bandas de massas moleculares distintas visualizadas em *western blot* com anticorpos anti-TcMSH2 através de ensaios de imunoprecipitação e análises por espectrometria de massas;
- Avaliar a interação de TcMSH2 com outras proteínas através de ensaios de co-imunoprecipitação ou pull-down e análise das proteínas que interagem por espectrometria de massas;
- Verificar se ocorre processamento alternativo do mRNA de TcMSH2, através da adição de SL em sítios internos na região codificadora através da análise de seqüências de cDNA obtidos por RT-PCR;
- Verificar a presença de bandas de massas moleculares distintas correspondentes a TcMSH2 em outras cepas de *T. cruzi* e, se for o caso, analisar a localização dessas proteínas através de experimentos *western blot* após fracionamento celular;
- Avaliar a infectividade de clones heminocautes para TcMSH2 e TcMSH6 (se for possível obtê-los) em cultura celular e *in vivo*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 27-35, 1997.

ARAÚJO, P. R.; BURLE-CALDAS, G. A.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; DAROCHA, W. D.; TEIXEIRA S. M. R. Development of a dual reporter system to identify regulatory *cis*- acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. **Parasitology International**. (*in press*).

ATWOOD, J. A., WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p.473-476, 2005.

AUGUSTO-PINTO, L.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.; MACHADO, C. R. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 272, n. 1-2, p. 323-333, 2001.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.; MACHADO, C. R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 117-126, 2003.

ÁVILA, A. R.; GOLDENBERG, S. Functional Genomics and Insights into *Trypanosoma cruzi* Gene Expression Regulation. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 148-155, 2010.

BARBOSA, P. R. B. The oral transmission of Chagas' Disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, p. 132-133, 2006.

Referências Bibliográficas

BELL, J. S.; HARVEY, T. I.; SIMS, A. M.; MCCULLOCH, R. Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 159-73, 2004.

BEN-DOV, C. P.; LEVIN, M. J.; VAZQUEZ, M. P. Analysis of the highly efficient pre-mRNA processing region HX1 of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, n. 1, p. 97-105, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**. Situação epidemiológica - Aspectos Epidemiológicos. Disponível em:
http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454
Acesso em 20 out. 2010

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347-382, 1973.

CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPOS, P. C. Diferenças intra-específicas do sistema de reparo de erros de pareamento e na resposta ao estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*: o papel da proteína TcMSH2. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2009. 119 p. (Tese, Doutorado em Bioquímica e Imunologia).

CAMPOS, P. C.; SILVA, V. G.; FURTADO, C.; MACHADO-SILVA, A.; DaROCHA, W. D.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; MEDEIROS, M. H.; LANA, G. D.; CHEN, Y.; BARNES, R. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; McCULLOCH, R.; MACHADO, C. R.; TEIXEIRA, S. M. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2010.

Referências Bibliográficas

CERQUEIRA, G. C.; BARTHOLOMEU, D. C.; DaROCHA, W. D.; HOU, L.; FREITAS-SILVA, D. M.; MACHADO, C. R.; EL-SAYED, N. M.; TEIXEIRA, S. M. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 1, p. 65-72, 2008.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente' etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHEN, F.; ARSEVEN, O. K.; CRYNS, V. L. Proteolysis of the mismatch repair protein MLH1 by caspase-3 promotes DNA damage-induced apoptosis. **Journal Biology Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27542-27548, 2004.

CLAYTON, C. E. Genetic manipulation of kinetoplastida. **Parasitology Today**, v. 15, n. 9, p. 372-378, 1999.

CLODFELTER, J. E.; M, B. G.; DROTSCHMANN, K. MSH2 missense mutations alter cisplatin cytotoxicity and promote cisplatin-induced genome instability. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 10, p. 3323-3330, 2005.

COLASANTE, C.; ROBLES, A.; LI, C. H.; SCHWEDE, A.; BENZ, C.; VONCKEN, F.; GUILBRIDE, D. L.; CLAYTON, C. Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 151, n. 2, p. 193-204, 2007.

COUGHLIN, B. C.; TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 12051-12060, 2000.

da SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. R. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**,

v. 36, n. 1, p. 87-96, 2006.

DaROCHA, W. D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M.; DONELSON, J. E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 175-186, 2004b.

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. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113-120, 2004a.

DAS, A.; BELLOFATTO, V. Genetic regulation of protein synthesis in trypanosomes. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 577-584, 2004.

de WIND, N.; DEKKER, M.; BERNIS, A.; RADMAN, M.; te RIELE, H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 321-330, 1995.

DeWEESE, T. L.; SHIPMAN, J. M.; LARRIER, N. A.; BUCKLEY, N. M.; KIDD, L. R.; GROOPMAN, J. D.; CUTLER, R. G.; te Riele, H.; NELSON, W. G. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 20, p. 11915-11920, 1998.

DONELSON, J. E; GARDNER, M. J.; El-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 2579-2581, 1999.

DROTSCHMANN, K.; TOPPING, R. P.; CLODFELTER, J. E.; SALSBURY, F. R. Mutations in the nucleotide-binding domain of MutS homologs uncouple cell death from cell survival. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 7, p. 729-42, 2004.

Referências Bibliográficas

DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M. U.; MALC, E.; CIESLA, Z., Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependent pathway. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 4, p. 403-11, 2004.

ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, p. 457-469, 2003.

ELIAS, M. C.; NARDELLI, S. C; SCHENKMAN, S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. **Future Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1065-1074, out. 2009.

EI-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, B. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ÅSLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; SILVEIRA, J. F.; 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, S.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005b.

EI-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E. A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; HAAS, B. J.; TRAN, A. N.; WORTMAN, J. R.; ALSMARK, U. C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.;

Referências Bibliográficas

BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J. M.; CERQUEIRA, G. C.; CREASY, T.; DELCHER, A. L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T. M.; HAUSER, C.; IVENS, A. C.; KUMMERFELD, S. K.; PEREIRA-LEAL, J. B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S. L.; SHALLOM, J.; SILVA, J. C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S. E.; DONELSON, J. E.; ANDERSSON, B.; STUART, K. D.; HALL, N., Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, n. 309, v. 5733, p. 404-409, 2005a.

FINK, D.; ZHENG, H.; NEBEL, S.; NORRIS, P. S.; AEBI, S.; LIN, T. P.; NEHME, A.; CHRISTEN, R. D.; HAAS, M.; MACLEOD, C. L.; HOWELL, S. B. *In vitro* and *in vivo* resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. **Cancer Research**, v. 57, n. 10, p. 1841-1845, 1997.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 3, e24, 2006.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 411-417, 2005.

GOLYASNAYA, N. V.; TSVETKOVA, N. A. Mismatch repair. **Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 211-23, 2006.

GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; ABREU-BLANCO, M. T.; UMEZAWA, E.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n.1, p. 48-56, 2005.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 443-452, 2001.

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J., Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, 2009.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, n. 11, 30 p., 2003.

HAYES, A. P.; SEVI, L. A.; FELDT, M. C.; ROSE, M. D.; GAMMIE, A. E. Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutSalpha DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 6, p. 739-51, 2009.

HER, C.; WU, X.; GRISWOLD, M. D.; ZHOU, F. Human MutS homologue MSH4 physically interacts with von Hippel-Lindau tumor suppressor-binding protein 1. **Cancer Research**, v. 63, n. 4, p. 865-872, 2003.

HERRERA, C.; BARGUES, M. D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A.; GUHL, F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 535-539, 2007.

IYER, R. R.; PLUCIENNIK, A.; BURDETT, V.; MODRICH, P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 302-323, 2006.

JANSEN, A. M.; PINHO, A. P. S.; LISBOA, C. V.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O. The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: a Still Unsolved Puzzle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-204, 1999. Suplemento I.

JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nature reviews. Molecular cell**

biology, v. 7, n. 5, p. 335-46, 2006.

JUN, S. H.; KIM, T. G.; BAN, C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 8, p. 1609-19, 2006.

JUNOP, M. S.; YANG, W.; FUNCHAIN, P.; CLENDENIN, W.; MILLER, J. H. *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. **DNA Repair (Amst)**, v. 2, n. 4, p. 387-405, 2003.

KAWASHITA, S.Y.; SANSON, G. F. O.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B.; BRIONES, M. R. S. Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 12, p. 2250-2259, 2001.

KELLY, J. M. A B-cell activator in Chagas disease. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 865-866, 2000.

LEUNG, S. Y.; CHAN, T. L.; CHUNG, L. P.; CHAN, A. S.; FAN, Y. W.; HUNG, K. N.; KWONG, W. K.; HO, J. W.; YUEN, S. T. Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 4, p. 1181-1188, 1998.

LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85-98, 2008.

LIN, X.; KIM, H. K.; HOWELL, S. B. The role of DNA mismatch repair in cisplatin mutagenicity. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 77, n. 1-2, p. 89-93, 1999.

LIU, B.; NICOLAIDES, N. C.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J. K.; PARSONS, R. E.; JEN, J.; PAPADOPOLOUS, N.; PELTOMAKI, P.; de la CHAPELLE, A.; HAMILTON, S. R.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. **Nature Genetics**, v. 9, n. 1, p. 48-55, 1995.

LOPES, D. O.; SCHAMBER-REIS, B. L.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; RAJAO, M. A.; DaRocha, W. D.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; NARDELLI, S. C.; SCHENKMAN, S.; HOFFMANN, J. S.; CAZAUX, C.; PENA, S. D.; TEIXEIRA, S. M.; MACHADO, C. R. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 11, p. 1882-1892, 2008.

LORENZI, H. A.; VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 310, p. 91-99, 2003.

MACEDO A. M., PENA S. D. J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MACEDO, C. D.; DaROCHA, W. D.; MORTARA, R. A.; PRADO, M. A.; TEIXEIRA, S. M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* antigen with homology to intracellular mammalian lectins. **International Journal Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1473-1484, 2006.

MACHADO C. R., AUGUSTO-PINTO L., McCULLOCH R., TEIXEIRA S. M. R. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutation Research**, v. 612, n. 1, p. 40-57, 2006.

MACHADO-SILVA, A.; TEIXEIRA, S. M.; FRANCO, G. R.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; McCULLOCH, R.; MACHADO, C. R. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. **Gene**, v. 411, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, abr. 2007.

MELLO, J. A.; ACHARYA, S.; FISHEL, R.; ESSIGMANN, J. M. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. **Chemistry and Biology**, v. 3, n. 7, p. 579-89, 1996.

MILES, M. A.; CEDILLOS, R. A.; POVOA, M. M.; SOUZA, A. A. de; PRATA, A. A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? **Lancet**, v. 317, p. 1338-1340, 1981.

MILES, M. A.; SOUZA, A. A. de; POVOA, M. M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILES, M. A.; TOYÉ, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 217-225, 1977.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 370, p. 1471-2164, 2009.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 181-184, 1999.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. A.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

NILSSON, D.; GUNASEKERA, K.; MANI, J.; OSTERAS, M.; FARINELLI, L.; BAERLOCHER, L.; RODITI, I.; OCHSENREITER, T. Spliced leader trapping reveals

widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001037, 2010.

NOZAKI, T.; CROSS, G. A. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 55-67, 1995.

PASSOS-SILVA, D. G.; RAJAO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; MACHADO, C. R.; FURTADO, C. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, ID 840768, 2010.

PELTOMAKI, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 7, p. 735-40, 2001.

PHILLIPS, G. J. Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. **FEMS Microbiology Letter**, v. 204, n. 1, p. 9-18, 2001.

PIRES, S. F.; DaROCHA, W. D.; FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, L. A.; KITTEN, G. T.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; CHIARI, E.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, S. M. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **International Journal Parasitology**, v. 38, n. 3-4, p. 289-297, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.

REENAN, R. A.; KOLODNER, R. D. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *MSH1* and *MSH2* genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 975-85, 1992.

ROMANHA, A. J.; DaSILVA P. A. A.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of

cultured *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 193-142, 1979.

RUSSO, M. T.; De LUCA, G.; CASORELLI, I.; DEGAN, P.; MOLATORE, S.; BARONE, F.; MAZZEI, F.; PANNELLINI, T.; MUSIANI, P.; BIGNAMI, M. Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4372-4379, 2009.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2. ed., New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 579-608, 2003.

SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 12, n. 12, p. 2063-2072, 2006a.

SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. Functional replacement of *Trypanosoma brucei* Argonaute by the human slicer Argonaute2. **RNA**, v. 12, n. 6, p. 943-947, 2006b.

SIA, E. A.; DOMINSKA, M.; STEFANOVIC, L.; PETES, T. D. Isolation and characterization of point mutations in mismatch repair genes that destabilize microsatellites in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 23, p. 8157-8167, 2001.

SIMMONS, L. A.; DAVIES, B. W.; GROSSMAN, A. D.; WALKER, G. C. Beta clamp directs localization of mismatch repair in *Bacillus subtilis*. **Molecular Cell**, v. 29, n. 3, p. 291-301, 2008.

SMITH, B. T.; GROSSMAN, A. D.; WALKER, G. C. Visualization of mismatch repair in bacterial cells. **Molecular Cell**, v. 8, n. 6, p. 1197-1206, 2001.

Referências Bibliográficas

- SOUTHWARD, C. M.; SURETTE, M. G. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1191-1196, 2002.
- SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 41-152, 1996.
- SOUZA, W. de. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 17-36, 1999. Suplemento 1.
- SOUZA, W. de; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-19, 2010.
- TAKAHASHI, M.; SHIMODAIRA, H.; ANDREUTTI-ZAUGG, C.; IGGO, R.; KOLODNER, R. D.; ISHIOKA, C. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. **Cancer Research**, v. 67, n. 10, p. 4595-4604, 2007.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.
- TEIXEIRA, S. M. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. *Trypanosoma cruzi*: Suppression of tuzin gene expression by its 5'- UTR and spliced leader addition site. **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 143-151, 1999.
- TEIXEIRA, S. M.; DaROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 148-158, 2003.
- THIBODEAU, S. N.; FRENCH, A. J.; ROCHE, P. C.; CUNNINGHAM, J. M.; TESTER, D. J.; LINDOR, N. M.; MOSLEIN, G.; BAKER, S. M.; LISKAY, R. M.; BURGART, L.

J.; HONCHEL, R.; HALLING, K. C. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. **Cancer Research**, v. 56, n. 21, p. 4836-4840, 1996.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 85-104, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, 1991.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 223-40, 1995.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, v. 239, n. 2, p. 217-25, 1999.

WHO (World Health Organization). **Weekly epidemiological record**. Geneva: WHO, 2010. n. 34, p. 329-336. (85th year).

Who, how, what and where? Mapping Chagas disease. **Nature outlook: Chagas disease**, p. S8-S9, 2010. Suplemento.

WU, X.; PLATT, J. L.; CASCALHO, M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 9, p. 3320-3328, 2003.

XU, D.; BRANDAN, C. P.; BASOMBRIIO, M. A.; TARLETON, R. L. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 9, 2009.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI,

Referências Bibliográficas

E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPDELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSENC, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 105-112, 1998.