

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE DO DNA NUCLEAR E  
MITOCONDRIAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

ORIENTADO: Jarbas Ivan Rohr

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Renato Machado – ICB/UFMG

BELO HORIZONTE

Fevereiro - 2013

Jarbas Ivan Rohr

ESTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro – 2013**

Dedico esse trabalho aos portadores da doença de Chagas e às pessoas que diretamente ou indiretamente sofrem de suas conseqüências, que vivem num mundo injusto, guiado por interesses políticos, religiosos e econômicos insustentáveis, cego e desinteressado pelo sofrimento humano. Embora meu trabalho não tenha impacto direto sobre seus sofrimentos, acredito que minha dedicação deixou uma ínfima contribuição para o próximo pesquisador, e o pequeno benefício de ter capacitado mais uma pessoa a buscar na ciência a solução deste problema.

## **Agradecimentos**

A todos meus professores iniciais, pelo incentivo aos estudos e à leitura;

A todos os autores literários que me fizeram gostar e me apaixonar pela leitura, e desenvolver minha imaginação;

Aos meus amigos distantes, que direta e indiretamente fizeram parte do meu amadurecimento;

Aos amigos próximos por fazerem parte da minha vida, e permitirem vários momentos de imaturidade;

Aos professores recentes, pelos constantes desafios no mundo acadêmico e incentivo a aprendizagem e ao questionamento do conhecimento;

Ao Prof. Carlos Renato, Nem, por ter acreditado e apostado na minha capacidade;

Aos colegas do LGB pelo companheirismo diário, os ensinamentos, a paciência e as alegrias;

Às pessoas que não acreditaram em mim...

À minha família, por ser meu início de tudo, por ensinar o que significa dedicação e onde se pode chegar com ela, e por me apoiarem mesmo quando eu estou errado;

Aos pesquisadores que antecederam este trabalho e que fazem parte do meio científico, por terem possibilitado eu envolver-me no mundo espetacular que é a ciência e permitir que eu conheça pessoa tão interessantes!

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO .....	1
1. Introdução .....	5
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.2. Doença de Chagas .....	10
1.3. Estabilidade Genômica e Mutações.....	11
1.4. Reparo do DNA .....	14
1.5. Reparo de Erro de Pareamento: MutS e MSH .....	15
1.6. Instabilidade de Microssatélites .....	19
3. Objetivos .....	25
Objetivo geral .....	25
Objetivos específicos.....	25
4.1. Obtenção das cepas .....	26
4.2. Cultura e Manutenção.....	26
4.3. Cultura e tratamento com peróxido de hidrogênio.....	26
4.4. Extração de DNA .....	27
4.5. Identificando microssatélites no kDNA: Tandem Repeat Finder.....	27
4.6. Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores .....	28
4.7. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	28
4.7. Análise dos amplicons .....	29
4.8. Determinação do perfil alélico de microssatélites.....	30
4.9. Purificação, clonagem e obtenção de DNA Plasmidiano.....	30
4.10. Reação de Sequenciamento.....	32
RESULTADOS.....	34
5.1. Buscando microssatélites no kDNA <i>in silico</i> .....	34
5.2. Caracterização Microssatélites nos diferentes grupos de <i>T. cruzi</i> DTU.....	36
5.3. Estabilidade de microssatélite mitocondrial de CL Brener.....	38
5.4. Sequenciamento.....	38

5.5. Análise de microssatélites nucleares de CL Brener .....	40
5.7. Análise de <i>loci</i> microssatélites mitocondrial e nuclear de Silvio .....	43
6. Discussão.....	46
CONCLUSÃO .....	54
REFERÊNCIAS.....	55

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. ***Trypanosoma cruzi***. A figura ilustra a apresentação da forma epimastigota do parasito, assinalando as estruturas do núcleo, mitocôndria e dentro dela a região de organização do DNA denominado cinetoplasto ou kDNA. Adaptado de DOCAMPO, 2005..... 5
- Figura 2. **Ciclo de Vida**. O *T. cruzi* infecta alternadamente um hospedeiro invertebrado e vertebrado. Por reprodução clonal, multiplica-se no aparelho digestivo do inseto invertebrado em forma epimastigota, e então se diferenciando em tripomastigota metacíclico, a principal forma infectante. Após hematofagia, o inseto defeca próximo ao local da picada, depositando o parasito perto da lesão, o que pode levar a infecção do parasito no vertebrado. Na circulação sanguínea ocorre diferenciação em tripomastigota, e amastigota nos espaços intercelular de outros tecidos. .... 6
- Figura 3. **Morfologia dos tripanosomatídeos**. Tripomastigotas, a forma infectante, são observadas na corrente sanguínea, tecidos de vertebrados e nas fezes de invertebrados e não são capazes de se dividir. Amastigotas capazes de se dividir e infectar células de vertebrados. Epimastigota capazes de se dividir e são observados no intestino do hospedeiro invertebrado, não infectante. Adaptado de Docampo, 2005. .... 7
- Figura 4. **Distribuição Geográfica**. Distribuição aproximada das linhagens de *T. cruzi*. TcI é predominante na Amazônia, Tc II, TcV e TcVI na região do cone sul, Tc III e Tc IV esporadicamente infectam humanos, e Tc IV apresenta genótipos divergentes na América do Sul e América do Norte. Adaptado de "Nature outlook," 2010..... 8
- Figura 5. **DNA mitocondrial**. (Superior) A figura ilustra o DNA circular longo (maxicículo) e o DNA circular curto (minicículo) dos Kinetoplastídeos. (Inferior) Microscopia eletrônica de transmissão de *Trypanosoma brucei* ilustrando a organização compactada e aproximação com a membrana mitocondrial (m). Rede de DNA concatenado de minicículo (\*) e maxicículo (\*\*). Adaptado de SHAPIRO, T A et al., 1999; HAJDUK; OCHSENREITER, 2010..... 9
- Figura 6. **Geração da 8oxoguanina**. Adaptado de SILVA, et al., 2009..... 14
- Figura 7. **Reparo de Erros de Pareamento - MMR**. (Esquerda) Reparo por erro de pareamento em procariotos. A proteína MutS localiza o erro de pareamento e atrai a MutL, onde juntas sinalizam para a proteína MutH que reconhece e cliva a fita recém sintetizada. (Direita) Complexo de MMR em eucariotos: o heterodímero MSH2-MSH3/6 reconhece o mal pareamento e sinaliza o restante da via. Adaptado de SILVA, C. F. T. DA et al., 2009. .... 16
- Figura 8. **MSH2 e hipótese de capacidade de reparo dos haplogrupos em *T. cruzi***. Adaptado de SILVA, et al., 2009..... 17
- Figura 9. **Instabilidade de microssatélites**. Sequências repetidas em tandem a fazer mal pareamento durante a replicação, causando perda ou ganho da unidade repetitiva. Adaptado de JASCUR, 2006. .... 22

Figura 10. **Processo de derrapagem das fitas durante a replicação em sequência repetida.** (Superior) Durante a replicação a DNA polimerase (1) alcança uma barreira na fita descontinua e pára (2). Se essa enzima ou outros fatores de replicação não forem capazes de romper a barreira, ocorre a dissociação da polimerase e sequente reassociação após a barreira, continuando a replicação. (Inferior) Desalinhamento da região 5' do Fragmento de Okazaki gerando estrutura secundária. Adaptado de KOIDE, et al. 1999; VIGUEIRA et al., 2001. .... 23

Figura 11. **Análise de microssatélites no kDNA de CL Brener.** *Índices:* início e fim da repetição na sequência fornecida. *Period Size:* tamanho da unidade da repetição. *Copy number:* quantidade de vezes que a unidade é repetida. *Consensus size:* tamanho da sequência considerando apenas nucleotídeos pareados. *Percent Matches:* porcentagem da sequência que se alinha formando uma repetição perfeita. *Percent Indels:* porcentagem de inserção/deleção ocorrido na sequência. *Score:* pontuação mínima para ocorrer registro de sequência repetida, nesse caso 50. *A/C/G/T:* porcentagem de nucleotídeos na sequência. .... 34

Figura 12. **Microssatélites no kDNA de *T. cruzi*.** A região sublinhada indica a sequência utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para cada microssatélite, e a região realçada marca a sequência repetida. Na figura acima estão dois motivos de adeninas repetidas 9 vezes. Na figura abaixo estão dois motivos de timinas repetidas ambas 10 vezes. .... 35

Figura 13. **Caracterização de microssatélite em kDNA de *T. cruzi*.** Sequenciamento de 5 cepas dos 3 haplogrupos para conhecimento inicial do perfil da região repetitiva em diversas cepas de *T. cruzi*. Apenas haploglupro A (Tc1) apresenta a repetição CAA conservada, enquanto que os outros haplogrupos sofreram mutação de C→A, típico de lesão 8oxoG (seta). .... 36

Figura 14. **Cepas de *T. cruzi* e classificação por DTU.** Uma análise estendida a outras cepas de *T. cruzi* para observar a composição da repetição CAA em outras cepas não haplogrupo A (Tc1), averiguando a não conservação do nucleotídeo citosina. .... 37

Figura 15. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélite mitocondrial Amx2, a partir do DNA genômico de CL Brener, de células submetidas ou não a tratamento com 50 µM de peróxido de hidrogênio, após 50 dias de cultivo.** O locus Amx2 com cauda M13 apresenta pico de 349 nucleotídeos, incluso nele um motivo de repetição de A<sub>9</sub>. Resultado ilustrado em duplicata. Esquerda (Tratado), Direita (Não Tratado). .... 38

Figura 16. **Alinhamento da região do microssatélite Amx2.** Após 50 dias de cultivo o locus Amx2 foi sequenciado e na região repetitiva não foi observado nenhuma mutação. .... 39

Figura 17. **Região sem mutações após 50 gerações com e sem tratamento de 50 µM de peróxido de hidrogênio.** A figura ilustra o resultado do sequenciamento do locus Amx2, em torno da região repetitiva não foi observado nenhuma mutação comparado ao CL Brener selvagem (controle). .... 39

Figura 18. **Sequenciamento da região intergênica mitocondrial de CL Brenner. Sequenciamento entre os genes COI e ND4 de cepas CL Brenner selvagem e deficientes em genes do MMR (MSH2 hemi-nocaute – MSH2+/-, MSH2 nocaute – MSH2-/- e MSH6 hemi-nocaute (MSH6+/-) após 50 dias de cultivo na presença de 50 µM de peróxido de hidrogênio. TTT: tratado. O controle positivo e o Wt Tratado estão ilustrados juntos para favorecer a representação.....** 40

Figura 19. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites SCLE10 e MCLG10, a partir do DNA genômico de CL Brenner, de células submetidas ou não a tratamento. O locus SCLE10 apresenta picos de 238 e 275 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> e um motivo TG<sub>9</sub>. O locus MCLG10 apresenta pico de 175 nucleotídeos, nele incluso um motivo de repetição de A<sub>16</sub>. .....** 41

Figura 20. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites CAA10 e ATT14, a partir do DNA genômico de CL Brenner, de células submetidas ou não a tratamento. O locus CAA10 apresenta picos de 133 e 155 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição CAA<sub>10</sub>. O locus ATT14 apresenta picos de 267 e 273 nucleotídeos de comprimento, neles incluso motivos de repetição de ATT<sub>7</sub> e T<sub>13</sub>. .....** 41

Figura 21. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites MCLF10 e GAG10, a partir do DNA genômico de CL Brenner submetidas ou não a tratamento. O locus MCLF10 apresenta picos de 182 e 193 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição (CA)<sub>2</sub>A(CA)<sub>14</sub>. O locus GAG10 apresenta pico de 141 nucleotídeo de comprimento, nele incluso motivo de repetição de GAG<sub>10</sub>. .....** 42

Figura 22. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites TAT20 e TAC15, a partir do DNA genômico de CL Brenner submetidas ou não a tratamento. O locus TAT20 apresenta picos de 182 e 224 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição TAT<sub>20</sub>. O locus TAC15 apresenta picos de 128 e 141 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de repetição de TAC<sub>15</sub>. .....** 42

Figura 23. **Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus microssatélite SCLE11, a partir do DNA genômico de CL Brenner, de células submetidas ou não a tratamento da geração zero e cinquenta. O locus SCLE11 apresenta pico de 152 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição AC<sub>9</sub>. Além disso, a cepa MSH2+/- apresenta um segundo pico de 150 nucleotídeos, confirmado na amplificação da geração zero.....** 43

Figura 24. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélite Esm\_Mit (Amx2) a partir do DNA genômico de Silvio submetidas ou não a tratamento. O locus Esm\_mit apresenta pico de 367 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição A<sub>9</sub>..... 44

Figura 25. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites MCLE05 e SCLE10, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus MCLE05 apresenta picos de 224 e 267 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição TC<sub>9</sub>GT<sub>4</sub>. O locus SCLE10 apresenta picos de 273 e 291 nucleotídeo de comprimento, nele incluso o motivos de repetição A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> e um motivo TG<sub>9</sub>..... 44

Figura 26. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites CAA10 e TAC15, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus CAA10 apresenta pico de 147 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição CAA<sub>10</sub>. O locus TAC15 apresenta picos de 98 nucleotídeos de comprimento, nele incluso o motivo de repetição de TAC<sub>15</sub>..... 44

Figura 27. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites ATT14 e GAG10, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus ATT14 apresenta pico de 267 e 272 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição ATT<sub>7</sub> e T<sub>13</sub>. O locus GAG10 apresenta picos de 135 e 150 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de GAG<sub>10</sub>..... 45

Figura 28. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites SCLE11 e TAT20, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus SCLE11 apresenta pico de 267 e 272 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição AC<sub>9</sub>. O locus TAT20 apresenta picos de 135 e 150 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de TAT<sub>20</sub>..... 45

Figura 29. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélites MCLF10, a partir do DNA genômico de Silvio submetidas ou não a tratamento. O locus MCLF10 apresenta picos de 179 e 181 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de (CA)<sub>2</sub>A(CA)<sub>14</sub>..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALF - *Automatic Laser Fluorescent Sequencer*

Amp - Ampicilina

AP - sítio **apurínico** ou **apirimídico**

ATP - Trifosfato de Adenosina

BER - *Base Excision Repair*, Reparo por excisão de bases

BGH - Hormônio de Crescimento Bovino

BHI - *Brain Heart Infusion*, Meio de Cultura Infusão de Cérebro e Coração

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - Albumina de soro bovina

cDNA - DNA Complementar

cm<sup>2</sup> - Centímetro Quadrado

Crosslink - pontes intra e intercadeias no DNA

ddH<sub>2</sub>O - Água deionizada

ddNTP's - Didesoxirribonucleotídeo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

mtDNA - DNA mitocondrial

DNase - Desoxirribonuclease

dNTP - mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP).

DSB - *Double Strand Break*, quebra de fita dupla

DSBR - *Double Strand Break Repair*, reparo de quebra dupla

DTU - *Discrete Typing Unit*, Unidades de Tipagem Discreta

*E. coli* - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

g - Grama

GTP - Guanosina trifosfato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido Clorídrico

HJ - *Holliday Junction*, Junção de Holliday

HR - *Homologous Recombination*, Recombinação Homóloga

HU - Hidroxiuréia

IDL's - *Insertion or Deletion Loops*, alças de inserção/deleção

IR - Região intergênica

kb - kilo bases (1000 pares de bases)

KCl - Cloreto de Potássio

kDNA - DNA do cinetoplasto

L - Litro

LIT - *Liver Infusion Tryptone*

M - Molar

mg - Miligrama

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

mL - Mililitro

MLH - Homólogo de MutL

M - Molar

MNNG - N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine

mM - Milimolar

MMR - *Mismatch Repair*, Reparo de Erros de Pareamento

RNA – Ácido Ribonucléico

mRNA - RNA Mensageiro

MSH – *MutS Homologue*, Homólogo de MutS

MTH – *MutH Homologue*, Homólogo de MutT

MLH – *MutL Homologue*, Homólogo de MutL

MYH – *MutY Homologue*, Homólogo de MutY

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NER - *Nucleotide Excision Repair*, Reparo por Excisão de Nucleotídeo

ng - Nanograma

NHEJ - *Non-Homologous End Joining*, reparo de extremidades não homólogas

nm - Nanômetro

OGG - 8-oxoguanina DNA glicosilase

OGM - Organismo Genéticamente Modificado

ORF - *Open Reading Frame*, Janela aberta de leitura

pb - Pares de Bases

PBS - *Phosphate Buffered Saline*, Tampão Fosfato Salina

PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PEG - Polietileno glicol

pmol - picomol

q.s.p. - quantidade suficiente para

RAPD - *Random Amplified Polimorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polimorphism*

RNA - Ácido ribonucléico

mRNA - RNA mensageiro

ROS - **R**eactive **O**xygen **S**pecies, Espécies Reativas de Oxigênio

rRNA - RNA ribossômico

SNP - *single nucleotide polymorphism*

SFB - Soro Fetal Bovino

SL - Spliced Leader

SNP – **S**ingle-**N**ucleotide **P**olymorphism, polimorfismo de único nucleotídeo.

SSB - **S**ingle **S**trand **B**reak, quebra de fita simples

TAE - Tris-acetato EDTA

TLS - *Translesion Synthesis*, Síntese Translesão

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

UTR - *UnTranslated Region* – Região não traduzida

UV - radiação ultravioleta

μM - micromolar

WHO - **W**orld **H**ealth **O**rganization

WT - **W**ild **T**ype, Selvagem

8-hidroxi-GTP - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

8-oxo-dGMP - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato

8oxoG - 7,8-dihidro-8-oxoguanina, ou apenas 8oxoguanina

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas. Essa doença ocorre predominantemente na América Latina onde a principal via de transmissão é através de fezes de insetos triatomíneos. Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas ao redor do mundo, principalmente na América Central e do Sul, e mais de 25 milhões estão em risco de infecção. O agente etiológico é um hemoflagelado da família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e apenas uma mitocôndria. O DNA mitocondrial encontra-se numa estrutura chamada Kinetoplasto. O sistema de reparo de DNA é responsável por preservar a estabilidade genômica corrigindo lesões no DNA causadas por fontes ambientais e metabólicas. Entretanto algumas lesões permanecem, levando a mutação ou interrompendo a replicação. Dentre diversas formas de reparar o DNA, o Reparo de Erro de Pareamento (MMR) é um entre muitas vias que a célula possui para lidar com danos químicos e físicos ao genoma. No contexto da função do heterodímero MSH2-MSH6, proteína importante no MMR, as propriedades e funções ainda estão sendo esclarecidas. Além da participação do MMR, está cada vez mais claro a relação destes genes na resistência ao estresse oxidativo, principalmente diante da lesão 8oxoG. Os genes TcMSH2 e TcMSH6 são codificados pelo núcleo e são responsáveis pelo reparo do material genético nuclear. Para garantir a sobrevivência da célula diante estresse oxidativo durante situação metabólica fisiológica e/ou induzida durante ciclo evolutivo em diversos ambientes metabolicamente agressivos, o reparo deve ser adequado na única mitocôndria disponível, sendo assim, importante estudar os esforços feitos pelo parasito para proteger seu material genético mitocondrial. O presente trabalho teve como objetivo conhecer a estabilidade de microssatélite no DNA mitocondrial e nuclear no *T. cruzi*. Para tanto, foi utilizado cepa CL Brener selvagem e deficiente para os genes MSH2 (hemi e duplonocaut) e MSH6 (heminocaut), e a cepa Silvio selvagem. A avaliação de estabilidade dos microssatélites para CL Brener foi realizada analisando o DNA após 50 gerações do parasito dividido em 2 grupos, controle ou tratado com 50 µM de peróxido de hidrogênio. Para Silvio foi analisado o DNA após 30 gerações do parasito dividido em dois grupos, controle ou tratado com 50 µM de peróxido de hidrogênio. Duas abordagens foram utilizadas: eletroforese em gel desnaturante no sequenciador ALF e sequenciamento de uma região com DNA repetitivo previamente identificado. Além disso, também foi realizado sequenciamento de uma região intergênica mitocondrial de CL Brener para observar alguma eventual mutação. As análises revelaram que diante da ausência das duas cópias do gene MSH2 ou na cepa heminocaut para MSH6 em CL Brener não houve mutações no DNA mitocondrial mesmo diante estresse oxidativo induzido, sugerindo que a via de MMR na mitocôndria possua outras proteínas envolvidas ou outras vias responsáveis pelo tipo de lesão. No núcleo nenhum dos 9 *loci* microssatélites desenvolveu instabilidade, entretanto, o *locus* SCLE11 na cepa MSH2 heminocaut mostrou-se diferente na

geração zero, sugerindo que a instabilidade ocorreu no período entre a geração da cepa heminocauté até o início deste trabalho. Para Silvio, a análise revelou que não houve mutações no DNA mitocondrial na região observada, enquanto que no núcleo mostrou estabilidade em 9 *loci* de microssatélites observados, mesmo diante estresse oxidativo induzido. A ausência de instabilidade nas duas cepas e a ausência do heterodímero MSH2/MSH6 em CL Brener sugerem que possa haver outras proteínas envolvidas no reconhecimento ou outras vias estarem envolvidas no reparo desse tipo de lesão.

## ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the etiologic agent of Chagas Disease. This sickness occurs predominantly in Latin America and is transmitted mainly by faeces of triatomines insects. About 10 million peoples are infected around the world, mostly in Central and South America, and more than 25 million are in risk of infection. The etiologic agent is a hemoflagellate of the Trypanosomatidae family, characterized by the presence of a flagellum, and only one mitochondria. The mitochondrial DNA is presented as a structure known as Kinetoplast. The DNA repair system is responsible for preserving the genomic stability, correcting lesions in DNA caused by ambiental and metabolic sources. In the meantime, some lesions remain, leading to mutation or disrupting the replication. Among several ways to repair the DNA, the Mismatch Repair System (MMR) is one between many pathways that the cell possesses to deal with chemical and physical genome damages. The main MMR protein is the MSH2-MSH6 heterodimer, whose functions and properties are still being clarified. Besides the MMR participation, is becoming clearer its involvement in the oxidative stress resistance, mainly against the 8oxoG lesion. The TcMSH2 and TcMSH6 genes are codified in the nucleus and they are responsible to repair the nuclear genetic content. To guarantee the cell survival, in the face of oxidative stress in physiologic and/or induced stressing situation during the evolutive life cycle in metabolically aggressive environment, the repair of the only one mitochondria has to be adequate, being so, it's important to study the parasite efforts to protect its genetic content. This present work aimed to describe the microsatellite stability of the *T. cruzi* mitochondrial and nuclear DNA. The evaluation of the microsatellites stability where developed in CL Brener *T. cruzi* wild type strain, hemi and double knockout MSH2 gene and heminockout MSH6 gene, and also the Silvio wild type strain. The CL Brener microsatellite stability was assessed after 50 generations of the cell, and it was separated in 2 groups: control or treated with 50 $\mu$ M of hydrogen peroxide. The Silvio microsatellite stability was assessed after 30 generations of the cell, separated in 2 groups just like CL Brener. Two approaches were applied: denaturing gel electrophoresis in ALF sequencer and the sequencing of a repetitive DNA previously identified. Besides that, also was realized the sequencing of a mitochondrial intergenic region of CL Brener to look for any mutation. The analysis showed that even without the MSH2 gene or with MSH2 or MSH6 hemiknockout in CL Brener cells, no mutations in the mitochondrial DNA were found, also in induced oxidative stress situation, suggesting that the mitochondria MMR pathway posses others proteins involved or another pathways are responsible to take care of this kind of lesion. Meanwhile in nucleus none of 9 microsatellite *loci* developed instability, however, the locus SCLE11 in the CL Brener hemi knockout strain showed a new microsatellite allele in the zero generation, suggesting that the instability occurred among the strain generation until the beginning of this work. The absence of instability in two wild type strains and the lack of the

MSH2/MSH6 heterodimer in CL Brener suggest that there may be others proteins involved in the recognition or another repair pathway involved in the repair of this kind of lesion.

## 1. Introdução

### 1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um hemoflagelado da família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença de um flagelo e apenas uma mitocôndria. O DNA mitocondrial encontra-se numa estrutura chamada Kinetoplasto (ou Cinetoplasto). O cinetoplasto é uma massa de DNA circular, em forma de rede, onde se encontram inúmeras cópias de genoma mitocondrial (Figura 1) (KLINGBEIL; ENGLUND, 2004).

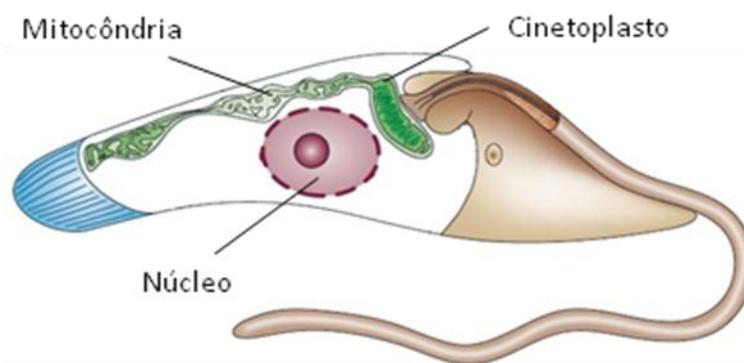


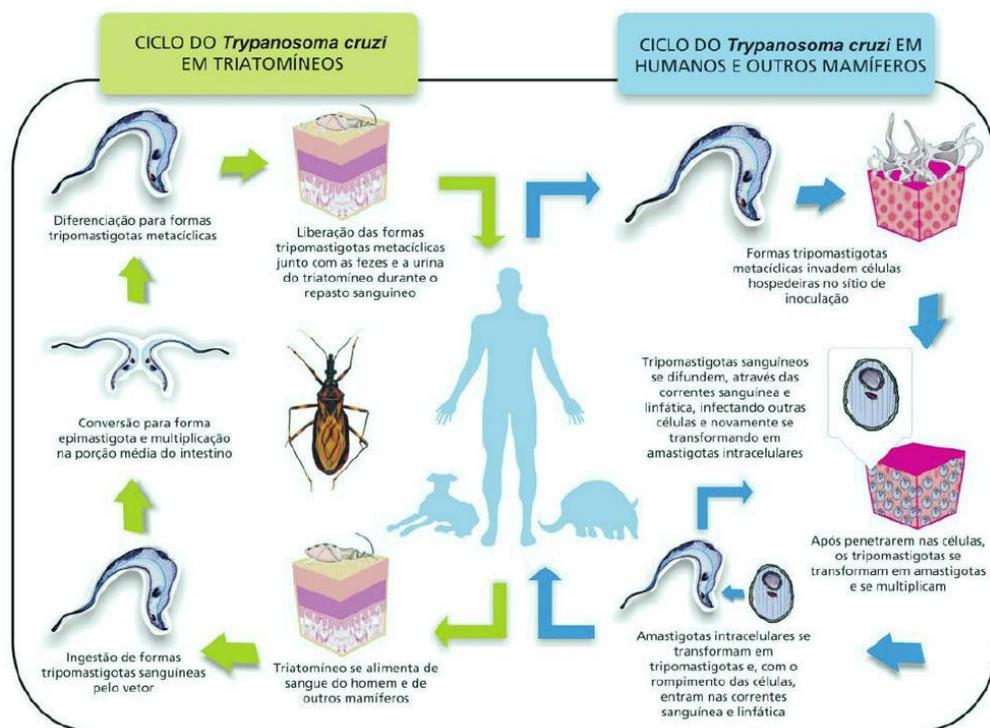
Figura 1. *Trypanosoma cruzi*. A figura ilustra a apresentação da forma epimastigota do parasito, assinalando as estruturas do núcleo, mitocôndria e dentro dela a região de organização do DNA denominado cinetoplasto ou kDNA. Adaptado de DOCAMPO, 2005.

O *T. cruzi* infecta alternadamente um hospedeiro vertebrado e invertebrado (Figura 2). Quando no hospedeiro invertebrado, como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* ou outros (popularmente conhecidos como barbeiro), desenvolve-se no tubo digestivo ao sistema excretor, e também nos tubos de Malpighi. No início do tubo digestivo multiplica-se na forma epimastigota por fissão binária, e ao longo do sistema digestivo do inseto, em direção ao reto, ocorre a diferenciação em tripomastigota metacíclica, a principal forma infectante. Na ampola retal, o parasito apresenta a maior taxa de diferenciação, assumindo predominantemente a forma infectante tripomastigota. A transmissão ocorre principalmente através da picada de um hematófago da subfamília Triatominae, onde estão os vetores do *T. cruzi*. Após a picada, o inseto defeca próximo ao local o que pode levar à infecção do parasito no vertebrado.

Quando no homem, a forma tripomastigota circula no organismo através do sangue, e a invasão celular acontece em diversas células nucleadas. Em células fagocíticas, por exemplo, inicialmente ocorre a atração do lisossomo para membrana celular para formar um compartimento vacuolar, permitindo a entrada do parasito. Neste momento o fagolisossoma gera diversos radicais de oxigênio sendo lançados no interior do vacúolo, levando a destruição e

digestão do parasito, ou caso o parasito seja capaz de resistir, ele aproveita do ambiente acidificado para secretar uma molécula que se incorpora a membrana do vacúolo, levando a sua desfragmentação. O parasita passa a viver no ambiente citoplasmático da célula hospedeira e se diferencia na forma amastigota. Algumas células iniciam o processo de diferenciação para a forma tripomastigota, o qual com intensa movimentação do flagelo ocorre a ruptura da célula hospedeira, com liberação de tanto tripomastigota quanto amastigota no espaço intercelular. Nessa liberação, ocorre a invasão de novas células e, também, a infecção de um novo triatomíneo no caso de uma picada.

Ao chegar ao estômago do inseto, a forma tripomastigota se transforma gradualmente em epimastigota. Em seguida migram para o intestino, onde se multiplica na forma epimastigota. Depois migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, onde se transformam em tripomastigota metacíclico, forma infectante ao vertebrado, fechando o ciclo (BRENER et al., 2000; SOUZA, 2002; COURA, J., 2007; EPTING et al., 2010).



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 2. **Ciclo de Vida.** O *T. cruzi* infecta alternadamente um hospedeiro invertebrado e vertebrado. Por reprodução clonal, multiplica-se no aparelho digestivo do inseto invertebrado em forma epimastigota, e então se diferenciando em tripomastigota metacíclico, a principal forma infectante. Após hematofagia, o inseto defeca próximo ao local da picada, depositando o parasito perto da lesão, o que pode levar a infecção do parasito no vertebrado. Na circulação sanguínea ocorre diferenciação em tripomastigota, e amastigota nos espaços intercelular de outros tecidos.

O *T. cruzi* apresenta três principais morfologias ao longo de seu ciclo de vida, as quais se caracterizam pelo formato da célula, presença do flagelo, fixação do corpo basal, cinetoplasto e núcleo (Figura 3). As formas amastigotas (presente no vertebrado) e epimastigota (no invertebrado) fazem replicação clonal, mas a forma epimastigota não promove a infecção no hospedeiro vertebrado. A forma tripomastigota, encontrada no intestino posterior do invertebrado e nos tecidos do vertebrado, não é capaz de se replicar, no entanto é infectante (SOUZA, 2002; DOCAMPO; SOUZA, 2005; ANDRADE, LUCIANA O; ANDREWS, 2005; MORTARA, R.A. et al., 2008).

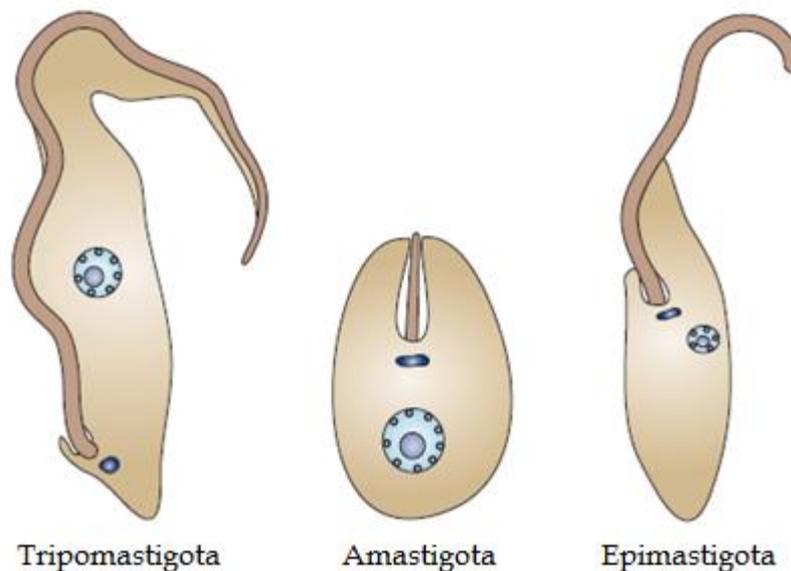


Figura 3. **Morfologia dos tripanosomatídeos.** Tripomastigotas, a forma infectante, são observadas na corrente sanguínea, tecidos de vertebrados e nas fezes de invertebrados e não são capazes de se dividir. Amastigotas capazes de se dividir e infectar células de vertebrados. Epimastigota capazes de se dividir e são observados no intestino do hospedeiro invertebrado, não infectante. Adaptado de Docampo, 2005.

O *T. cruzi* apresenta reprodução clonal, extensamente demonstrado pelo alto grau de desequilíbrio de ligação por seu genoma ser transmitido em bloco à descendência (TIBAYRENC, M et al., 1986; OLIVEIRA, R. P. et al., 1998). Entretanto, já foi demonstrado *in vitro* que ele é capaz de fazer recombinação através de um mecanismo pouco usual de fusão nuclear, formando uma progênie poliplóide que pode sofrer recombinação entre alelos e, após perda cromossômica, retornar ao estado diplóide (GAUNT, M.W. et al., 2003). Dessa forma discute-se que haja pelo menos três grupos ancestrais (Tc I, II e III), com eventos de hibridização entre II e III, produzindo linhagens híbridas como CL Brener, de modo que o grupo III seria o doador do material citoplasmático (mitocôndria) enquanto que o material nuclear é característico de II/III (FREITAS, J.M. DE et al., 2006). A epidemiologia molecular teve maior foco nos países do Cone Sul, e concluiu-se que o *T. cruzi* II predomina no ciclo doméstico da transmissão, responsável pela doença de Chagas em humanos (ZINGALES, B et al., 1998; FERNANDES, O et al., 1998; BRENIÈRE et al., 1998). A genotipagem de isolados de reservatórios silvestres e triatomíneos

da Mata Atlântica do Rio de Janeiro mostrou a adaptação preferencial de *T. cruzi* I a gambás e de *T. cruzi* II a primatas. Nos triatomíneos, os dois grupos foram observados (FERNANDES, O et al., 1999).

Atualmente, o *T. cruzi* é classificado em 6 linhagens filogenéticas ou DTU's - discrete typing unit, unidade de tipagem discreta- (ZINGALES, B et al., 2009) onde DTU é definido como um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, MICHEL, 1998). A distribuição geográfica (Figura 4) das DTU's indica a prevalência do Tc I em pacientes do México, América Central e ao norte da América do Sul (AÑEZ et al., 2004; MILES, M. A et al., 2009), demonstrando a forma indeterminada e cardíaca da doença. No Cone Sul, a prevalência é das formas cardíaca, digestiva e assintomática das Tc II, V e VI. Embora haja esse panorama, todos são capazes de promover a doença. Isolados pertencentes à Tc I não favorecem a forma digestiva, Tc II e V aparentemente seriam mais patogênicas, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva (MILES, M. A et al., 2009).

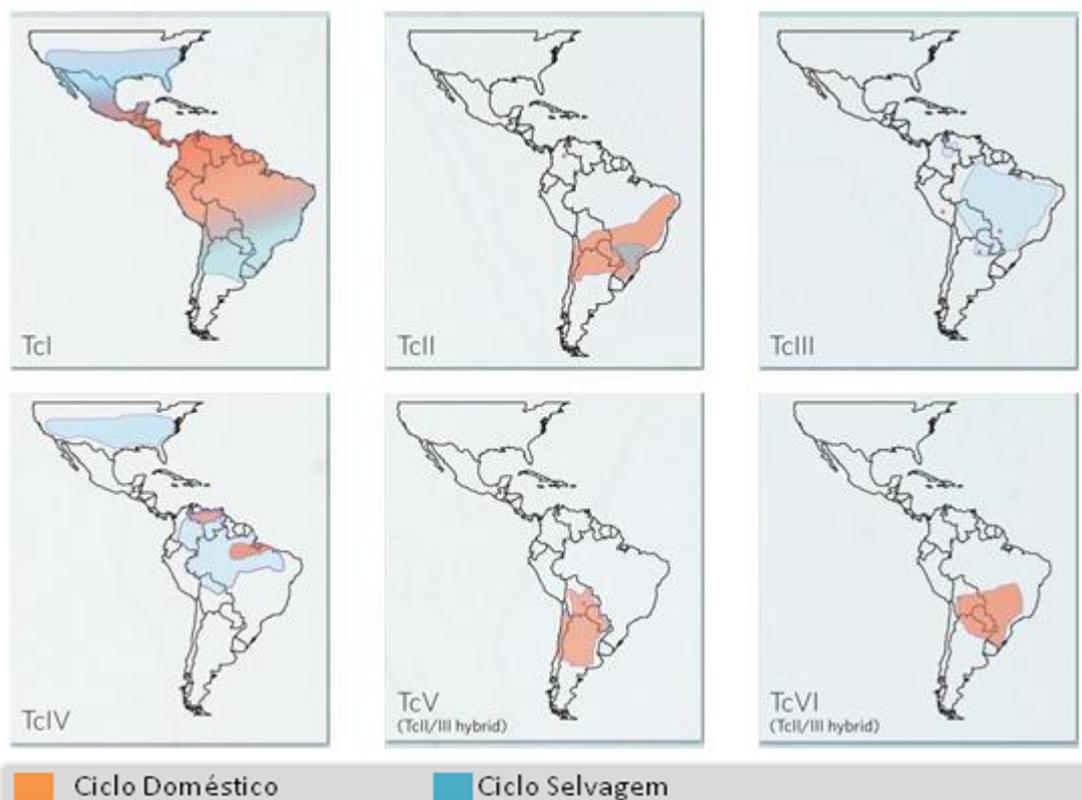


Figura 4. **Distribuição Geográfica.** Distribuição aproximada das linhagens de *T. cruzi*. TcI é predominante na Amazônia, Tc II, TcV e TcVI na região do cone sul, Tc III e Tc IV esporadicamente infectam humanos, e Tc IV apresenta genótipos divergentes na América do Sul e América do Norte. Adaptado de "Nature outlook," 2010.

Na mitocôndria dos tripanosomatídeos o DNA apresenta-se de duas formas características: maxicírculos e minicírculos (Figura 5). São milhares de minicírculos com tamanho entre 500 pb à 2,5 kb, e algumas dúzias de maxicírculos com tamanho entre 20-40 kb (SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T., 1995; SOUZA; CAVALCANTI, 2007). Os minicírculos contêm porções variáveis e conservadas. São quatro as regiões de sequências conservadas, de 120 a 160 pb, intercaladas pelas sequências variáveis que apresentam de 210 a 260 pb. Não são encontradas sequências repetitivas nas porções variáveis do minicírculos, sendo de baixa homologia quando comparadas a outras moléculas isoladas de um mesmo clone. As regiões variáveis dos minicírculos codificam pequenos RNA's guias que são modificados após a transcrição, com a adição de uma cauda de poliuridina. Os transcritos dos minicírculos são moléculas complementares aos transcritos dos maxicírculos, com participação importante/vital na edição destes através da adição ou deleção de uridina na sequência desses RNAm (STUART; FEAGIN, 1992; HAJDUK; OCHSENREITER, 2010).

Maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos, os quais codificam para ribossomos e subunidades do complexo respiratório, que primeiramente necessitam serem editados por RNA's guias transcritos pelos minicírculos (SOUZA, 2009).

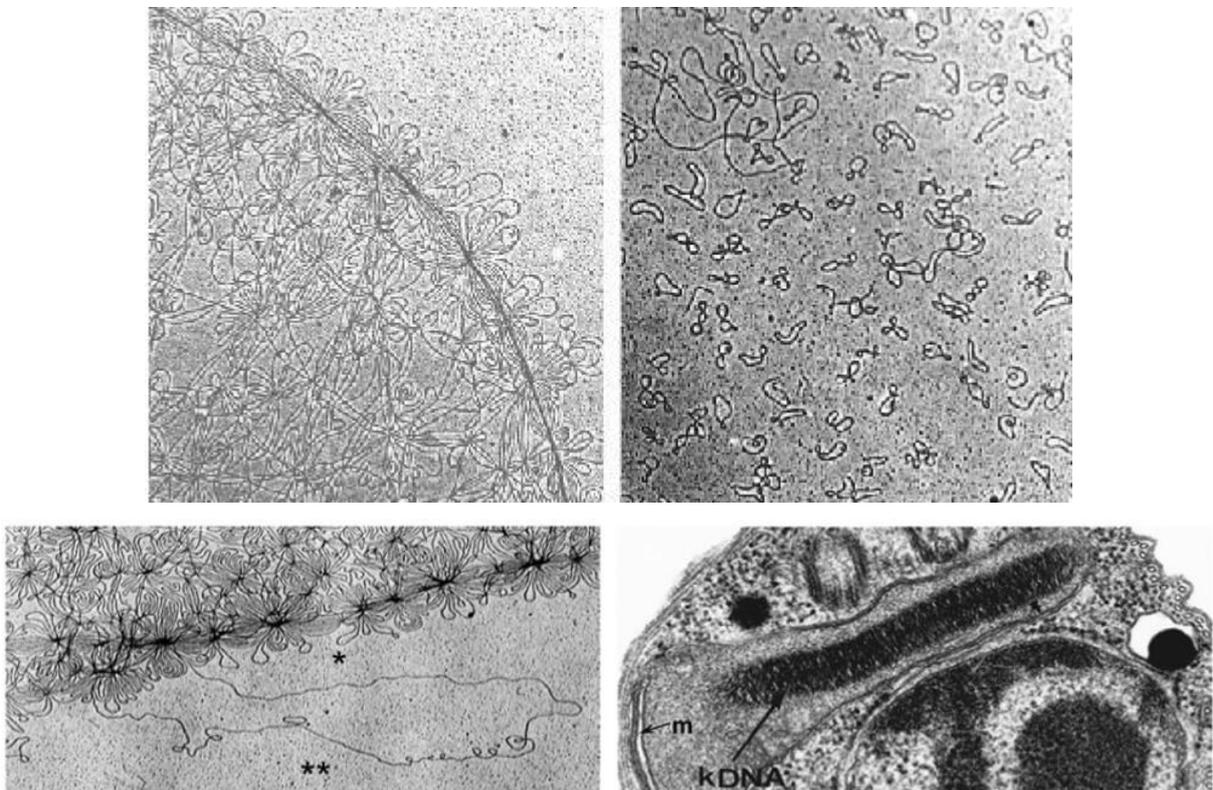


Figura 5. **DNA mitocondrial.** (Superior) A figura ilustra o DNA circular longo (maxicírculo) e o DNA circular curto (minicírculo) dos Kinetoplastídeos. (Inferior) Microscopia eletrônica de transmissão de *Trypanosoma brucei* ilustrando a organização

compactada e aproximação com a membrana mitocondrial (m). Rede de DNA concatenado de minicírculo (\*) e maxicírculo (\*\*). Adaptado de SHAPIRO, T A et al., 1999; HAJDUK; OCHSENREITER, 2010.

## 1.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, descrito em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Ocorre predominantemente na América Latina onde a principal via de transmissão é através de fezes de insetos triatomíneos. Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas ao redor do mundo, principalmente na América Central e América do Sul, e mais de 25 milhões estão em risco de infecção (WHO, 2010).

No ano 2000 as Nações Unidas revisaram e incluíram outras doenças na classificação de Doenças Negligenciadas. Esse termo refere-se às doenças com grave impacto no desenvolvimento infantil, complicações gestacionais e na produtividade do trabalhador. Devido ao intenso impacto da patologia no ser humano, a doença de Chagas foi classificada como uma doença que promove a pobreza nas populações afetadas (HOTEZ; FERRIS, 2006).

A transmissão da doença de Chagas ocorre predominantemente pela via vetorial (80-90%), via transfusional (5 a 20%) e a via congênita (0,5 a 8%). Outras vias excepcionais, como transmissão acidental (laboratórios e hospitais), transplante de órgãos, oral (ingestão de alimentos contaminados pelo parasito), sexual e por outros vetores não triatomíneos são possíveis, porém raramente observadas (BRENER et al., 2000; PRATA, 2001; DIAS; NETO, 2011). O mecanismo da infecção congênita ainda é incerto. Sugere-se que o parasita atinge o feto através da corrente sanguínea ao atravessar a barreira placentária, com uma complexa interação entre resposta imune, fatores placentários e características do parasito (KEMMERLING et al., 2010). O que parece claro é que mães portadoras de *T. cruzi* não geram, necessariamente, filhos infectados. No entanto, essa via de transmissão da doença de Chagas ainda permanece uma forma de infecção nos dias atuais e os portadores desinformados constituem um fator limitante para o controle da doença. Neste sentido, é relevante incluir investigação dessa doença no pré-natal de gestantes residentes ou provenientes de áreas endêmicas (ARAÚJO et al., 2009).

A doença se apresenta de forma variada e sua evolução depende de fatores como a quantidade de parasito inoculada, estado imunológico do paciente e o grupo genético do agente infeccioso. A fase aguda dura 4 a 8 semanas, podendo ser assintomático ou manifestar sintomas brandos imediatamente após a picada. Esta fase é caracterizada por altos níveis de parasitemia, hipertrofia linfonodal, edema bupalpebral unilateral (sinal de Romana), febre e alterações no

ecocardiograma. Muitas vezes nem todos os sintomas são manifestados. Após uma fase latente que pode durar de meses a muitos anos, a fase crônica pode levar a um crescimento anormal do coração e insuficiência cardíaca, mega-cólon, mega-esôfago e degeneração do sistema nervoso autônomo (SALA, 2006; COURA, JOSÉ RODRIGUES, 2007; PARKER; SETHI, 2011; MENEZES et al., 2011).

O tropismo tecidual e a distribuição geográfica do parasito também são fatos marcantes. Andrade et al. (1998) demonstraram que embora diferentes clones possam infectar o mesmo tecido em estudo *in vitro*, há geralmente uma predominância de cepas infectando determinado tecido quando animais são infectados por múltiplas cepas (ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S., 1999; ANDRADE, L.O.; MACHADO, C. R. S., 2002). Posteriormente, ao comparar a taxa de infecção de diferentes cepas em cultura cardiomiócitos de camundongo BALB/c, Andrade et al. (2010) demonstraram o possível papel do desenvolvimento intracelular como determinante para o tropismo tecidual (ANDRADE, L. O.; GALVÃO, 2010). Guedes et al. (2007) demonstraram diferença na patogenicidade *in vivo* entre duas cepas de *T. cruzi* e diferença na infectividade *in vivo* em modelo animal canino (GUEDES; VELOSO, 2007).

As razões dessa diversidade de sintomas ainda são desconhecidas, mas acredita-se que grande parte seja determinada por variações genéticas do *T. cruzi*, que apresenta uma estrutura populacional bastante heterogênea. Aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro também podem ser a causa da variedade de sintomas observados (MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R., 2004).

### 1.3. Estabilidade Genômica e Mutações

O DNA mitocondrial é uma característica marcante nos tripanosomatídeos, devido a sua composição de DNA circular longo (maxicírculos) e DNA circular curto (minicírculos) entrelaçados em forma de rede. É de vital importância que esse conjunto de DNA esteja intacto após a replicação (LIU, B. et al., 2005). Uma replicação adequada deve garantir a duplicação do material genético e sua correta distribuição. Diferente da mitocôndria de mamíferos, por exemplo, que tem apenas uma DNA polimerase, em tripanosomatídeos já foi descrita a presença de sete, e dentre eles, a TcPol kappa, a qual já foi demonstrada aumentando a resistência do *T. cruzi* ao peróxido de oxigênio (KLINGBEIL; ENGLUND, PAUL T, 2004; RAJÃO, M., 2009).

A diversidade de uma população é relacionada com a capacidade de tolerar danos em seu genoma. Todas as células estão sujeitas a danos no DNA causados pela exposição a agentes genotóxicos endógenos e exógenos. Uma falha no reparo destes danos pode resultar

em mutação, enquanto o seu correto reparo garante a manutenção e a integridade do material genético e das funções celulares. O reparo do DNA é crucial para manter a integridade do genoma em todos os organismos, por outro lado, a capacidade de tolerar as lesões é intimamente ligada ao equilíbrio da necessidade de se criar diversidade. Sendo assim, o surgimento de variação no conteúdo genômico, gerando novos caracteres que serão ou não selecionados posteriormente durante a evolução, também é essencial. Inevitavelmente, o metabolismo do DNA e seus mecanismos responsáveis pelo reparo e pela tolerância a estas lesões garantem a sobrevivência e a evolução de uma espécie (PINTO, 2004; WATERS et al., 2009).

O *T. cruzi* é uma espécie que apresenta grande variabilidade genética, porém não estão esclarecidos os mecanismos moleculares associados à geração dessa variabilidade. Vale ressaltar que em qualquer espécie a variabilidade surge de mutações no DNA. Além disso, a taxa de mutações no DNA de uma célula depende da eficiência dos mecanismos de reparo do DNA, em especial do Reparo de Erros de Pareamento, ou MMR (do inglês *Mismatch Repair*). Desse modo, aspectos básicos sobre o MMR de *T. cruzi* devem ser investigados (PINTO, 2004).

Mutações são eventos raros que ocorrem espontaneamente numa frequência de  $1 \times 10^{-9}$ - $10^{-10}$  por par de bases por divisão celular. Elas podem ocorrer por: i. erro na incorporação de nucleotídeos, e fixados no próximo ciclo de replicação; ii. incorporação de nucleotídeos quimicamente danificados, no qual durante o próximo ciclo de replicação podem parear com um nucleotídeo diferente do original, levando a mutação; iii. incorporação de nucleotídeo não danificado, mas pareados com uma base danificada na fita oposta. Todos esses eventos ocorrem constantemente em todas as células, e caso não haja reparo destas lesões, ocorrerá mutação (IYER; PLUCIENNIK, 2006; SILVA et al., 2009).

Agentes genotóxicos são agentes físicos ou químicos que podem interagir com o DNA, afetando a integridade do material genético. Dentre os principais agentes genotóxicos temos o peróxido de hidrogênio, luz ultravioleta, cisplatina, entre outros. Eles podem causar lesões, que se não reparadas, podem levar a modificação na sequência de DNA (DAMIA; D'INCALCI, 2007).

Lesões oxidativas no DNA são causadas por radicais livres e espécies reativas de oxigênio, produzidos durante o metabolismo normal da célula e por exposição a agentes precursores de espécies reativas, tais como irradiação gama, UVA e peróxido de hidrogênio (GUPTA et al., 2009). Dano ao DNA por estresse oxidativo pode ocorrer por dano às bases nitrogenadas e/ou ao açúcar-fosfato, gerando quebras de fita simples (as quais podem ser convertidas em quebra dupla durante a replicação), quebras duplas no DNA, modificações de

bases, geração de sítios apurínicos/apirimídicos, dentre outros. Quebras duplas são letais caso não reparadas, enquanto dano às bases podem ser mutagênicas e/ou citotóxicas. O DNA pode ser danificado diretamente por exposição por raios ionizantes, ou secundariamente pelos radicais livres gerados pela radiação. Mais de 20 diferentes tipos de danos a bases foram identificadas após exposição a estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) mais relevantes são  $O_2^{\cdot-}$  (radical superóxido),  $OH^{\cdot}$  (radical hidroxila) e  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUPTA et al., 2009).

Entre os danos oxidativos no DNA, a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (ou apenas 8oxoG) representa a lesão mais abundante (MAZUREK et al., 2002). A indução de dano à base no DNA envolve a reação do ROS com o DNA, o radical hidroxila inicialmente reage com a base guanina para formar um aduto C8-OH (ou seja, união entre os dois compostos). Posteriormente ocorre a perda de um elétron e um hidrogênio, gerando o 8oxoG (Figura 6) (SLUPPHAUG, 2003). Esse processo ocorre na presença de metais como ferro e cobre, que reduzem a água oxigenada a OH por reação do tipo Fenton. O produto da reação é uma espécie reativa de oxigênio que reage com a base guanina do DNA produzindo a 8oxoG (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A 8oxoG é, portanto, um produto da oxidação de guaninas no DNA, tanto do pool de nucleotídeos disponível para replicação quanto do nucleotídeo na fita de DNA. É altamente mutagênico por ser capaz de parear incorretamente com adenina durante a replicação. Se o par 8oxoG:A não for reparado, uma nova replicação pode levar a transições C:G→A:T (PASSOS-SILVA et al., 2010). Bases danificadas podem ser mutagênicas durante a polimerização por uma polimerase replicativa frente a uma base danificada ou por síntese translesão. Por isso, o reparo de lesões oxidativas é essencial para estabilidade do genoma.

Em células eucarióticas já foram bem caracterizadas três diferentes abordagens para lidar com a formação de 8oxoG: uma DNA glicosilase (8-oxoguanina DNA Glicosilase - OGG1) para remover diretamente a 8oxoG do par 8oxoG:C; outra DNA glicosilase (MYH) para remover a adenina do par 8oxo:A (e permitir que a OGG1, ou seus homólogos funcionais, terminem o reparo retirando a base oxidada), ambas seguidas de replicação para preencher a lacuna do nucleotídeo removido. Adicionalmente, outra enzima (MTH) faz a sanitização de nucleotídeos guanina não incorporados no DNA, tendo como substrato a 8-oxo-dGTP (guanina oxidada), convertendo este ao nucleotídeo monofosfato (8-oxo-dGMP) que não é substrato para a DNA polimerase. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que MMR também reconhece o pareamento 8oxoG:A como substrato e remove o resíduo mal pareado na fita recém sintetizada (NI et al., 1999; FUKUI, 2010; FURTADO et al., 2012).

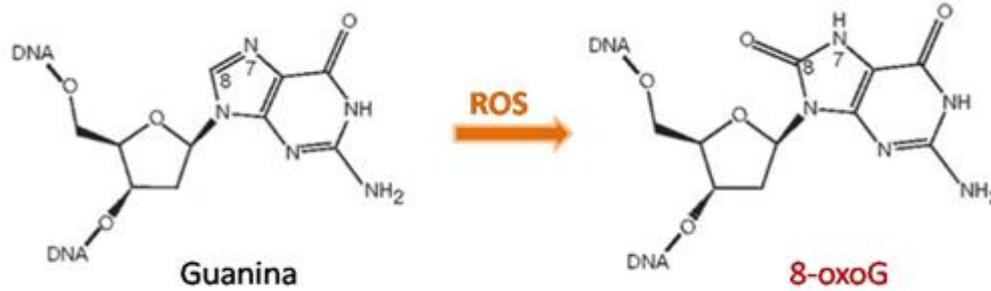


Figura 6. **Geração da 8oxoguanina.** Adaptado de SILVA, et al., 2009.

#### 1.4. Reparo do DNA

Enzimas de reparo de DNA podem ser caracterizadas como proteínas agindo diretamente sobre o DNA danificado numa tentativa de restaurar a sequência de DNA inicial e/ou sua estrutura. Essas enzimas encarregam-se de identificar e reparar formas específicas de danos ao DNA. Há enzimas que diretamente tratam com danos específicos, enquanto outros participam do metabolismo normal do DNA, como fazendo a polimerização, revisão, ligação e até recombinação (FRIEDBERG et al., 1995; WIND, DE; HAYS, 2001; IYER; PLUCIENNIK, 2006).

O sistema de reparo de DNA é responsável por preservar a estabilidade genômica corrigindo lesões no DNA causadas por danos ambientais e metabólicos. Mesmo apresentando esses mecanismos algumas lesões permanecem, levando a mutação ou interrompendo a replicação. Conhecimento básico sobre reparo de DNA e processos de tolerância é crucial para entender como e porquê o genoma é afetado durante o ciclo de vida e como a célula responde (PASSOS-SILVA et al., 2010).

A análise comparativa dos genomas de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) e *Leishmania major* identificou diferenças nos mecanismos de manutenção de DNA entre estes e outros eucariotos. O sequenciamento e posterior análise destes genomas revelou a presença de grande parte dos genes das principais vias de reparo de DNA, indicando que esses organismos são capazes de realizar a maioria delas (BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005; IVENS et al., 2006; PASSOS-SILVA et al., 2010).

Diante da grande variedade de danos ao DNA, as células utilizam várias abordagens de reparo ao DNA, tais como: (1) sanitização de nucleotídeos não incorporados; (2) reversão direta das modificações de base, como dímero de timina; (3) remoção de fragmentos da dupla-fita quando houver mal pareamento através do reparo por erro de pareamento (MMR) ou quando o

dano resulta em distorção da dupla-fita através de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER, Nucleotide Excision Repair), e, finalmente, remoção de bases oxidadas através do reparo por excisão de bases (ou, BER, Base Excision Repair). Essas enzimas são capazes de reconhecer o dano, cortar a fita a uma distância adequada a ambos os lados, desenrolar e remover a fita (FRIEDBERG et al., 1995).

O DNA também é suscetível a *crosslinks* no DNA, quebras de fita simples (ou SSBs do inglês *Single Strand Breaks*) e quebras duplas (ou DSBs do inglês *Double Strand Breaks*), que podem ser reparados por recombinação homóloga (ou HR, do inglês *Homologous Recombination*) e recombinação não-homóloga (ou NHEJ do inglês *non homologous end joining*). Mesmo que estes mecanismos reparem a maioria das lesões do DNA, alguns dos danos permanecem, levando a mutações ou ao bloqueio da maquinaria de replicação. DNA polimerases alternativas podem ignorar essas lesões de forma livre de erros ou propenso a erros usando um processo conhecido como síntese translesão (ou TLS do inglês) (HOEIJMAKERS, 2001; PASSOS-SILVA et al., 2010).

O MMR é uma entre muitas vias que a célula possui para lidar com danos químicos e físicos ao genoma. Além de aumentar a fidelidade da replicação, também tem importante papel na regulação da recombinação homóloga e da correção de danos químicos (MODRICH, P; LAHUE, 1996; UMAR; KUNKEL, 1996; BELL et al., 2003).

#### 1.5. Reparo de Erro de Pareamento: MutS e MSH

Um dos papéis do MMR é corrigir bases mal pareadas no DNA. Uma base mal pareada no meio de um aglomerado de bases pareadas corretamente necessita, inicialmente, de um eficiente reconhecimento por parte do sistema de reparo. Resumidamente, o processo consiste no reconhecimento da base mal pareada, excisão do segmento de DNA que contém o erro e a síntese da região removida utilizando a fita parental como molde (Figura 7). O MMR é extremamente importante para assegurar a manutenção de estabilidade do genoma após a replicação do DNA, aumentando sua fidelidade em cerca de 1000 vezes (SCHOFIELD; HSIEH, 2003). O MSH2, gene chave do MMR, foi caracterizado em *T. cruzi* e *T. brucei* (AUGUSTO-PINTO, L.; BARTHOLOMEU, D., 2001; BELL et al., 2003; MACHADO-SILVA et al., 2008; PASSOS-SILVA et al., 2010).

As principais proteínas do sistema de Reparo de Erro de Pareamento de *E. coli* são MutS, MutL e MutH. Muitos homólogos, MSH (MutS Homologue) e MLH (MutL Homologue), foram descritas em outras espécies, o gene MutH não foi identificada em eucariotos, onde

possivelmente a função de clivagem seja exercida pelo heterodímero MLH1-PMS1 (KADYROV et al., 2006). Em procariotos o homodímero de MutS $\alpha$  ou MutS $\beta$  faz varredura do DNA buscando erros de pareamento, ao encontrar atrai o homodímero MutL no sítio identificado. A MutL serve como um intermediário entre o reconhecimento do mal pareamento e clivagem da fita pelo homodímero MutH, devido a ação deste de reconhecer o padrão de metilação e clivar a fita recém sintetizada (não metilada). A função básica dessas proteínas foi conservada ao longo da evolução, de modo que seus homólogos estão presentes em eucariotos (Machado-Silva, 2008). Em eucariotos, o heterodímero MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ) reconhece o mal pareamento de bases e de alças de inserção de 1-2 nucleotídeo enquanto MSH2/MSH3 (MutS $\beta$ ) reconhece alças de inserção/deleção de 2 ou mais nucleotídeos, e fazem em seguida a sinalização de mal pareamento. Heterodímeros de MLH1/PMS1 ligam-se ao MSH, possuem atividade endonucleásica e coordenam os passos seguintes do reparo (CANNAVO et al., 2005; HAYES et al., 2009; PASSOS-SILVA et al., 2010). A capacidade de reparo de mal pareamento de bases é diretamente relacionada com a taxa de formação do heterodímero, já que MSH3 e MSH6 são estáveis apenas na presença de MSH2 (DRUMMOND, 1997).

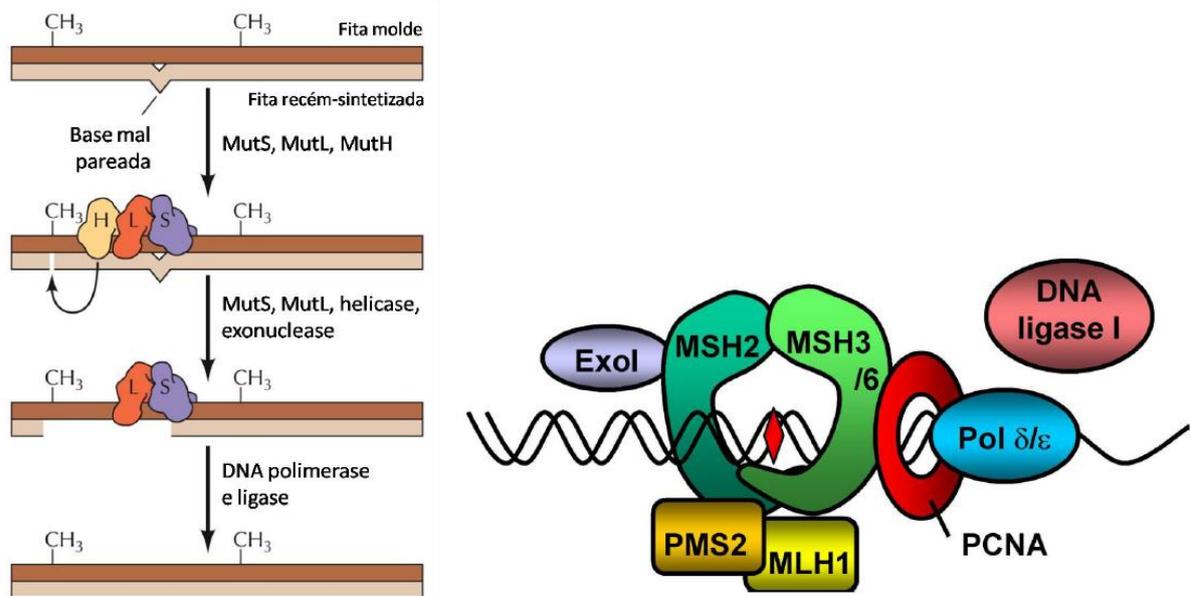


Figura 7. **Reparo de Erros de Pareamento - MMR.** (Esquerda) Reparo por erro de pareamento em procariotos. A proteína MutS localiza o erro de pareamento e atrai a MutL, onde juntas sinalizam para a proteína MutH que reconhece e cliva a fita recém sintetizada. (Direita) Complexo de MMR em eucariotos: o heterodímero MSH2-MSH3/6 reconhece o mal pareamento e sinaliza o restante da via. Adaptado de SILVA, C. F. T. DA et al., 2009.

Ambos procariotos e eucariotos expressam MutS e MutL com regiões altamente conservadas, porém o mecanismo de discriminação da fita recém sintetizada em eucarioto é pouco elucidado. Notavelmente, existem pelo menos 7 genes homólogos de MutS em eucariotos (MSH1-7) e pelo menos 5 genes homólogos para MutL. Análises genéticas e bioquímicas tem

demonstrado que a evolução da família MSH em eucarioto tem sido acompanhada da aquisição de novas funções, no qual a sequência ancestral tenha evoluído a partir de MSH1. A estabilidade mitocondrial é dependente de MSH1 (descrita apenas em levedura), a estabilidade nuclear é dependente de MSH2, MSH3, MSH6 e MSH7, enquanto MSH4 e MSH5 participam na recombinação durante meiose (CHI; KOLODNER, 1994; CULLIGAN, 2000).

Augusto-Pinto et al. (2003) identificaram polimorfismos no gene de reparo de erro de pareamento de *T. cruzi* TcMSH2, o qual através de inferência filogenética foi possível separar em três haplogrupos: A, B e C. Os haplogrupos A e C agrupam as linhagens Tc I e Tc II, respectivamente, e B com as linhagens TcIII-TcVI (Figura 8). Cada haplogrupo codifica uma isoforma da proteína, chamadas de TcMSH2a, TcMSH2b e TcMSH2c. Após tratar com peróxido de hidrogênio culturas de diferentes grupos de *T. cruzi*, encontraram evidências de instabilidade de microssatélite nuclear nos grupos B e C, mas não no grupo A, sugerindo que os grupos B e C têm uma menor habilidade de reparo do que o grupo A (AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S., 2003; ZINGALES, B et al., 2009).

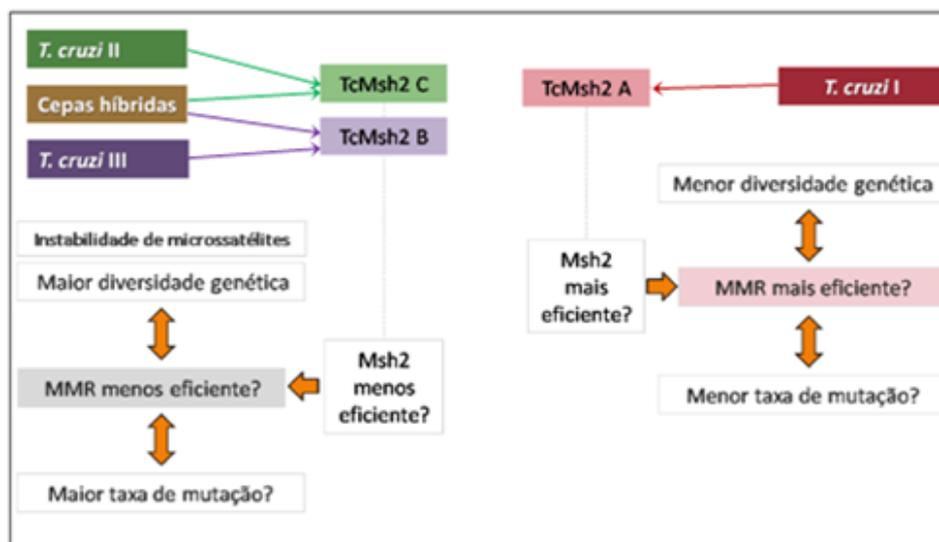


Figura 8. **MSH2 e hipótese de capacidade de reparo dos haplogrupos em *T. cruzi*.** Adaptado de SILVA, et al., 2009.

A atividade da proteína MSH2 foi recentemente investigada em *T. cruzi* e *T. brucei*. Em *T. brucei*, MSH2 foi estudada juntamente com MLH1 através da inativação nesses dois genes. Nocaute em ambos os genes resultou em um fenótipo mutante pela diminuição da atividade de MMR ao observar instabilidade de microssatélite nuclear (BELL et al., 2003). Além disso, *T. brucei* TbMSH2<sup>-/-</sup> (duplo nocaute) complementado com TcMSH2 de CL Brener (Tc VI) ou de Colombiana (Tc I) também apresentou instabilidade de microssatélite nuclear, mas o mesmo não foi observado em *T. brucei* complementado com o próprio gene TbMSH2. Isso sugere que a

TbMSH2 é capaz de complementar a deficiência de MMR de nocautes para MSH2, enquanto de TcMSH2 não funciona como componente de MMR em *T. brucei* (MACHADO-SILVA et al., 2008).

Surpreendentemente, também foi observado que *T. brucei* expressando TcMSH2 de CL Brener (Tc VI, haplogrupo B/C) teve a mesma taxa de sobrevivência comparado a *T. brucei* selvagem diante tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse fenótipo de tolerância a peróxido de hidrogênio foi confirmado ao transfectar *T. brucei* MSH2 nocaute com MSH2 da cepa Colombiana (Tcl, haplogrupo A) e a mesma taxa de sobrevivência foi observada, comparando com cepa selvagem. A análise de TbMLH1 nocaute não demonstrou sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em curva de sobrevivência, comportando-se igual a células WT (wild type, selvagem). Isso indica que MSH2 parece ter um papel adicional no reparo de dano oxidativo independente de MMR, dado que MLH1, componente de MMR, não está envolvido nessa função (BELL et al., 2003; MACHADO-SILVA et al., 2008).

Ao testar a sensibilidade dos grupos de *T. cruzi* diante peróxido de hidrogênio, houve uma diferença distinta entre linhagens, onde Tcl apresenta uma taxa de crescimento mais próximo ao normal do que Tc II. A dosagem de 8-oxoG corroborou o dado em que em TcII há maior geração de nucleotídeos oxidados no kDNA do que no grupo Tcl. Quando utilizado clones de CL Brener heminocaute para MSH2 não tratado e tratado com peróxido de hidrogênio, houve um aumento significativo de 8-oxoG apenas no kDNA na situação não tratado e tratado. Similar a *T. cruzi* heminocaute, *T. brucei* duplonocaute para MSH2 é mais sensível ao tratamento de peróxido de hidrogênio, inclusive demonstrando perda de material genético mitocondrial sem tratamento e perda acentuada diante tratamento com peróxido de hidrogênio. Tanto *T. cruzi* e *T. brucei* sofrem com sensibilidade no crescimento das colônias *in vitro* e aumento da geração de nucleotídeos oxidados na mitocôndria quando há células menos eficientes no MMR (*T. cruzi* haplogrupos B/C) ou quando a célula for OGM (*T. cruzi* heminocaute MSH2 e *T. brucei* MSH2 duplonocaute) para o gene MSH2, sugerindo uma participação direta dessa proteína na organela na resposta ao estresse oxidativo independente de MMR (CAMPOS, PRISCILA C et al., 2011).

Outro mecanismo de reparo, o Reparo por Excisão de Base (BER), é a principal via responsável por corrigir lesões que modificam bases individuais sem maiores efeitos sobre a estrutura da dupla hélice, tal como as lesões por oxidação, alquilação e desaminação. A via consiste em reconhecimento da base modificada (como 8oxoG) e remoção por DNA glicosilase, clivagem da estrutura açúcar-fosfato e excisão do sítio abásico (AP endonuclease), e posterior síntese e ligação para preencher lacuna nucleotídica (BOITEUX et al., 2002; PASSOS-SILVA et al., 2010). Reparo por Erro de Pareamento é uma forma de Reparo por Excisão de Base, pois também remove base que foi quimicamente alterada (estresse oxidativo) ou incorretamente

pareada (pela DNA polimerase). Estudos sugerem cada vez mais que o MMR é uma das vias alternativas ao BER para controlar os níveis de 8oxoG no DNA. O heterodímero MSH2-MSH6 é capaz de reconhecer essa lesão em determinados contextos, tanto em células humanas quanto em *S. cerevisiae* e *E. coli* (NI et al., 1999; BOITEUX et al., 2002; WYRZYKOWSKI; VOLKERT, 2003; MACPHERSON et al., 2005).

No contexto da função de MSH2-MSH6, as propriedades e funções ainda estão sendo esclarecidas. Muitos autores descrevem a eficiente função deste heterodímero em reparo de mal pareamento e alças de inserção e deleção no núcleo. Na última década, vários estudos vem descrevendo diferentes fenótipos em diferentes espécies diante nocaute desses genes. Além da participação do MMR, está cada vez mais claro a participação na resistência ao estresse oxidativo, principalmente diante da lesão 8oxoG (SCHOFIELD; HSIEH, 2003; IYER; PLUCIENNIK, 2006).

A função primária do sistema de reparo dos erros de pareamento (MMR) do DNA é eliminar os erros causados pelo erro de pareamento de bases e pela inserção/deleção de sequências que podem ocorrer durante a replicação do DNA. A natureza repetitiva dos microssatélites faz com que ocorra um deslizamento das fitas de DNA durante sua replicação e formem-se alças de inserção/deleção. Quando a inserção/deleção não é reparada apropriadamente, ocorre um aumento ou diminuição no número de unidades de repetição do microssatélite, e conseqüentemente uma alteração no tamanho da sequência. Esse evento é conhecido como instabilidade de microssatélite. Pelo menos 10 reações enzimáticas são necessárias para resolver o mal pareamento. Mutantes em MutS e MutL foram relacionados com aumento da taxa de mutação espontânea e instabilidade de microssatélite em bactéria (LEVINSON; GUTNAN, 1987), o mesmo ocorre com mutações em MSH2 de levedura (SIA; DOMINSKA, 2001) e *Caenorhabditis elegans* (DEGTYAREVA, 2002). Uma maneira de avaliar o estado funcional dos genes de reparo de erro de pareamento no DNA é verificar alterações no tamanho das sequências dos microssatélites (MIR, 2004; MACHADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L., 2006).

#### 1.6. Instabilidade de Microssatélites

Microssatélites são nucleotídeos repetidos em tandem com composição (motivo) de mono à hexa-nucleotídeos que se repetem até centenas de vezes no DNA, e ocorrem aleatoriamente no genoma, inclusive dentro de regiões codificantes. Embora a unidade repetitiva e o comprimento da repetição sejam usados para classificar subgrupos de DNA repetitivo, ainda não há consenso sobre a definição precisa das repetições. Alguns autores não consideram

repetições mononucleotídicas, e outros consideram apenas unidades repetidas a partir de 3, 4 ou cinco nucleotídeos (ALVINO et al., 2002; RICHARD et al., 2008; EPPLEN; AKKARD, 2011).

Diferentes mecanismos (todos envolvidos na síntese de DNA) foram observados na instabilidade de microssatélite usando *E. coli*, fungos e roedores como modelos. Mudança na estrutura secundária de DNA causado por DNA repetitivo podem levar a instabilidades da sequência durante a replicação (derrapagem), reparo ineficiente (alças clivadas por DNA nucleases) e recombinação não-homóloga (TOTH, 2000; RICHARD et al., 2008).

Wilder e Hollocher (2001) descreveram uma forma de distribuição e desenvolvimento de sequências repetitivas em moscas, através de dois processos de mutação distintos dentro de elementos móveis de DNA: a (i) expansão de repetições em tandem preexistentes e a (ii) conversão de sequências crípticas em DNA repetitivo (protorepetições). Porém, até agora ainda não se compreende completamente como diferentes classes de DNA repetitivo surgem e como ocorrem os polimorfismos (TOTH, 2000; WILDER; HOLLOCHER, 2001; RICHARD et al., 2008).

Para microssatélites, a taxa de mutação é de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por locus e geração, dependendo da espécie, do locus e número de repetição (SCHLÖTTERER, 2000; ECKERT; HILE, 2009). Microssatélites foram inicialmente utilizados como marcadores em genética de população, investigação forense, teste de paternidade e de instabilidade genômica. Entretanto, algumas desvantagens devido ao seu caráter altamente polimórfico e a limitada utilidade em testes de alto rendimento, levou a utilização mais frequente de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfismo de único nucleotídeo), tanto por motivos técnicos quanto pela eficiência (COHEN, H. et al., 2004; BROOKS, 2007).

O comprimento das repetições microssatélites frequentemente varia como resultado de mutações que ocorreram durante a replicação do DNA (Figura 9). A variação de tamanho da região repetitiva, normalmente chamada de instabilidade de microssatélite, foi descrito em tumores de pacientes com Síndrome do Câncer Colorectal Hereditário não-polipóide, além de estar altamente relacionado com mutações dos genes codificantes das proteínas de Reparo de Erro de Pareamento (Mismatch Repair) MSH2, MLH1 entre outros (THIBODEAU et al., 1993; ALVINO et al., 2002; FERNANDES, 2007; GEIERSBACH; SAMOWITZ, 2011). As alças de inserção/deleção são normalmente reconhecidas e reparadas pelo MMR, porém se não reparadas levam a variação de comprimento, processo chamado de instabilidade de microssatélite (BUERMEYER, 1999), evento observado anteriormente em MMR de bactérias (LEVINSON; GUTNAN, 1987), fungos (STRAND et al., 1993), mamíferos (WIND, DE et al., 1995), e, recentemente, em *T. cruzi* (AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S., 2003).

Durante varredura do DNA, o heterodímero MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$  em procariotos) induz uma curvatura no DNA devido a um motivo conservado Phe-Xaa-Glu (fenilalanina -Xaa- ácido glutâmico). Diante um mal pareamento ou alça de inserção/deleção essa conformação curvada passa para não curvado, o qual é induzido pelo resíduo Phe (fenilalanina). A formação da conformação 'não curvado' é essencial para inibição da hidrólise de ATP de MSH2-MSH6, que sinaliza o reparo. Mutação nesse resíduo foi relacionada com taxa aumentada de mutação *in vivo* (TESSMER, 2008).

Estudos *in vitro* indicam que adição/deleção de sequências repetitivas são geradas por "derrapagem" da DNA polimerase durante a replicação, e então a alça resultante de DNA é removida pelo Sistema de Reparo de Pareamento. Assim, aumento na derrapagem ou deficiência no reparo pode alterar este equilíbrio dinâmico e resultar em instabilidade de microsatélite (LOEB, LAWRENCE A, 2001).

Mutações induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sequências microsatélites em plasmídios construídos com repetições mono ou dinucleotídicas mostraram mudanças na fase de leitura de modo a impedir a expressão do gene da B-lactamase no qual foram inseridas. Por outro lado, sequências não-repetitivas não sofreram mutações que alteraram a fase de leitura. Além da frequência de mutantes, o sequenciamento da região de inserção e mais cem bases antes e depois demonstraram apenas mutação na sequência repetitiva. A frequência de mudança de fase de leitura aumentou 50 vezes quando incubado com 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em contraste, não foi detectado aumento de frequência de mutação em plasmídios contendo sequências não repetitivas de mesmo comprimento e janela de leitura, presentes na mesma posição (JACKSON et al., 1998).

Resultados semelhantes foram encontrados em linhagens de câncer de pulmão que carregavam um plasmídio vetor contendo um microsatélite, o qual teve mutações induzidas por peróxido de hidrogênio e paraquat (ZIENOLDDINY et al., 2000).

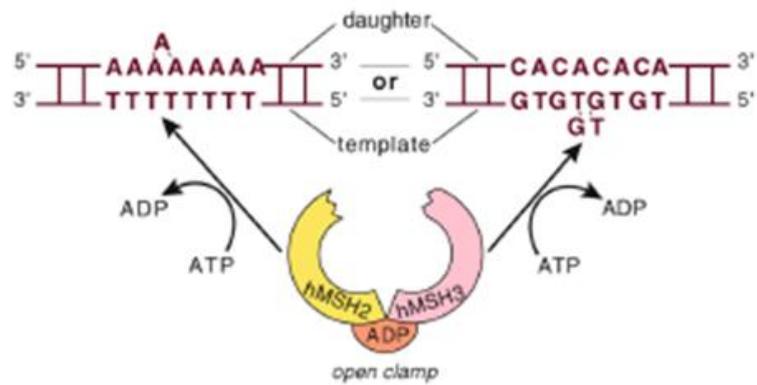


Figura 9. **Instabilidade de microssatélites.** Sequências repetidas em tendem a fazer mal pareamento durante a replicação, causando perda ou ganho da unidade repetitiva. Adaptado de JASCUR, 2006.

Muitos modelos para expansão de repetições assume que elas ocorrem durante replicação por duas razões. Primeiro porque a rápida expansão de DNA repetitivo não pode ser explicada sem a síntese de grandes quantidades de DNA. Segundo, durante a progressão da forquilha de replicação, a região do Fragmento de Okazaki fica temporariamente fita simples, e a presença de sequências repetitivas dentro dessa região facilita a formação de alças (Figura 10). Diante essa estrutura secundária, a DNA polimerase pode dissociar-se e a região recém sintetizada 3' ou 5' pode desanelar e reanelar de maneira incorreta, ou também pode acontecer de a DNA polimerase reassociar após a obstrução e continuar a polimerização. Estudos de replicação *in vitro* demonstram que várias DNA polimerases param diante mal alinhamento de DNA repetitivo (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992; VIGUERA et al., 2001). A instabilidade de microssatélites é marcadamente afetada diante mutações em vários genes codificadores de proteínas envolvidas na replicação, como endonucleases, PCNA, helicase, entre outros. Assim, o modelo de replicação para instabilidade de repetições é baseado na parada e recomeço da forquilha de replicação, e na ausência de reparo adequado da via de MMR (KOIDE; KOBAYASHI, 1999; MIRKIN, 2007; SHOKAL; SHARMA, 2012).



## 2. Justificativa

O MSH2 e MSH6 são proteínas da via de MMR, o qual é uma importante via de reparo de DNA nuclear em todos os organismos. O estudo dos genes envolvidos no reparo do DNA e a falta da via MMR por nocaute destes genes pode favorecer a descoberta de vias importantes para sobrevivência de seres vivos, e pode ser utilizado para entender outros organismos. Elucidar se há participação dessas proteínas na mitocôndria do *T. cruzi* seria de interesse para futuros estudos de alvo terapêutico.

Instabilidade no DNA mitocondrial causa desordem metabólica em vários organismos, os quais não há tratamento efetivo. Compreender o mecanismo de reparo do DNA mitocondrial pode facilitar o desenvolvimento de novas terapias no combate de diversas doenças.

Tendo em vista esses dados, foram planejados experimentos que nos permitissem compreender melhor o papel de MSH2 no processo de reparo em *T. cruzi*. Esse mecanismo está envolvido no reparo de diferentes danos ao DNA desse parasito e, portanto constitui um alvo importante para os estudos da biologia desses parasitos.

### 3. Objetivos

#### Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste em conhecer o perfil e a estabilidade de microssatélite no DNA mitocondrial e nuclear do *T. cruzi* em diferentes cepas e investigar variações na taxa de mutação em células deficientes no gene MSH2 e MSH6.

#### Objetivos específicos

1. Localizar microssatélite no kDNA do *T. cruzi*,
2. Caracterizar microssatélite mitocondrial em diferentes cepas e grupos,
3. Observar a estabilidade durante 50 gerações em cultivo e sob tratamento de agente genotóxico (peróxido de hidrogênio),
4. Utilizar cepa CL Brener Selvagem, heminocaute e duplonocaute para MSH2 e heminocaute para MSH6 para ver se há contribuição destes genes na estabilidade de microssatélite nuclear e mitocondrial em condição sem e com estresse oxidativo induzido com peróxido de hidrogênio.
5. Utilizar cepa Silvio selvagem em condição sem e com estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio para observar a estabilidade de microssatélite nuclear e mitocondrial.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Obtenção das cepas

Neste trabalho as cepas de *Trypanossoma cruzi* geneticamente modificadas utilizadas para cultura foram gentilmente disponibilizadas pelo grupo da Profa. Dr. Santuza Maria Ribeiro Teixeira do Departamento de Bioquímica e Imunologia e as cepas CL Brener e Silvio selvagens pelo professor Dr. Egler Chiari do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os clones utilizados são CL Brener selvagem, CL Brener MSH2+/- ( $\Delta$ TcMSH2::HYG/TcMHS2), CL Brener MSH2-/- ( $\Delta$ TcMSH2::HYG/ $\Delta$ TcMSH2::NEO), CL Brener MSH6 +/- (TcMSH6/ $\Delta$ TcMSH6::NEO) e Silvio.

### 4.2. Cultura e Manutenção

Epimastigotas da cepa CL Brener (Selvagem e OGM) e Silvio foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptone – liver digested neutralized 5 g/L, NaCl 4 g/L, bactotriptose 5 g/L, KCl 0,4 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8g/L, dextrose 2 g/L, hemina 0,2% 10 mL em NaOH 0,05 M, pH 7,3) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e os antibióticos penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Invitrogen). A cultura foi mantida a 28°C em frascos apropriados e em sua fase exponencial de crescimento, através de repiques semanais. Para contagem do número de parasitos, esses foram diluídos em PBS (0,15 M pH 7,2) e eritrosina (4% em PBS) e posteriormente, os parasitos vivos foram contados em câmara citométrica.

### 4.3. Cultura e tratamento com peróxido de hidrogênio

#### CL Brener

Nos ensaios com tratamento com agente genotóxico, os parasitos foram cultivados concomitantemente em dois grupos: grupo não tratado e grupo tratado. Cada cepa foi cultivada em octoplicata durante 50 dias (aproximadamente 50 gerações). As culturas previamente mantidas em fase exponencial de crescimento, em frascos apropriados, foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços. De modo geral, cada poço apresentava 1mL de cultura, partindo de uma densidade de  $2 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> à  $6,4 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> durante duas passagens. No final deste ciclo, foi realizada extração de DNA da 'geração' 0 (zero), e posteriormente nos dias 10, 20, 30, 40 e 50.

#### Silvio

Nos ensaios com tratamento com agente genotóxico, os parasitos foram cultivados concomitantemente em dois grupos: grupo não tratado e grupo tratado. Cada grupo foi cultivado em 12 repetições durante 30 dias (aproximadamente 30 gerações). O preparo das culturas seguiu o mesmo protocolo de CL Brener descrito acima.

O agente genotóxico utilizado foi Peróxido de Hidrogênio (Merck 8,87M). Através de diluições seriadas em meio LIT, fez-se tratamento de 50 µM de peróxido de hidrogênio em cada cultura do grupo tratado, no período de 2 em 2 dias. O DNA da cultura inicial (geração 0 -zero-) foi extraído e imediatamente feito o repique desta cultura para o início do experimento. A dose de 50 µM foi escolhida partindo do pressuposto que seria necessário uma concentração do agente que não interferisse no ciclo celular do *T. cruzi*, de modo que a replicação ocorresse da forma usual, ou seja, que o tempo de duplicação *in vitro* continuasse a ser 24 horas.

#### 4.4. Extração de DNA

Os testes iniciais para determinação de microssatélites foram realizados com DNA genômico extraído pelo método Fenol Clorofórmio gentilmente cedido pelo grupo da Profa. Dr. Andrea Mara Macedo.

Durante os 50 dias de cultivo para CL Brener (50 gerações), o DNA foi extraído nos dias 0 (zero), 10 (dez), 20 (vinte), 30 (trinta), 40 (quarenta) e 50 (cinquenta), e para Silvio o DNA foi extraído nos dias 0 (zero) e 30 (trinta). O DNA genômico de cultura de células epimastigotas foi obtido da seguinte maneira: centrifugação durante 7 minutos a 5.000 rpm em microtubo com 600 µL de cultura (cerca de  $6,4 \times 10^7$  parasitos/mL). Ressuspende-se o sedimento em 500 µL de PBS 1X, centrifugando novamente durante 7 minutos a 5.000 rpm. Ressuspensão do sedimento em 500 uL Solução de Lise (Tris-HCl 1M, pH 8,0, EDTA 0,4mM pH8,0, SDS 0,2% e NaCl 1M) e adiciona-se à 1/3 de volume presente no microtubo microesferas de vidro, veda-se o tubo com parafilme para levar ao vórtex por 20 minutos em agitação alta. Os microtubos são incubados a 98°C durante 10 minutos. O sobrenadante é transferido para outro microtubo e então adiciona-se 50 µL de NaCl 5M e 500 µL de etanol absoluto gelado, misturando por inversão. As amostras são incubadas overnight a -20 °C. Centrifuga-se os microtubos a 12.000 rpm durante 2 minutos, após o sobrenadante deve ser descartado e deixar o microtubo imóvel até secar. O DNA então é ressuspendido em 70 uL de água miliq autoclavada.

#### 4.5. Identificando microssatélites no kDNA: Tandem Repeat Finder

Para encontrar repetições em tandem no DNA mitocondrial, a sequência do maxicírculo depositada de CL Brener (GenBank accession number: DQ343645.1) foi analisada pelo algoritmo Tandem Repeat Finder (BENSON, 1999). Após, foi realizada uma busca manual por sequências curtas simples.

Neste trabalho foi utilizado o Tandem Repeat Finder, programa que localiza sequências repetidas em tandem de DNA (BENSON, 1999). O princípio de funcionamento do programa Tandem Repeat Finder fundamenta-se na geração de uma matriz onde atribui-se pontos a nucleotídeos que pareiam e retira-se pontos ao ocorrer não pareamento e/ou inserção/deleção numa determinada sequência.

#### 4.6. Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Todos iniciadores foram desenhados utilizando a sequência do maxicírculo de CL Brener e Esmeraldo (WESTENBERGER et al., 2006) e Silvio (LAURA, 2011), através do programa OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/Oli-goAnalyzer>). Devido a alta quantidade A/T no genoma mitocondrial, os iniciadores construídos apresentaram tamanho entre 31 e 36 pares de base, e o Tm 50°C e Tm 55°C como temperaturas mínimas e máximas, respectivamente. A qualidade dos iniciadores foi testada individualmente e aos pares no próprio programa quanto à formação de estruturas que dificultam a amplificação. Os iniciadores foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies*® (IDT) e estão listados em anexo (OWCZARZY; TATAUROV, 2008).

#### 4.7. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O microsatélite Amx2 foi amplificado a partir de DNA genômico de CL Brener utilizando os pares de iniciadores Amx2Fw e Amx2Rv. As amplificações foram realizadas em termociclador (EPPENDORF Mastercycler modelo 22331) e o programa consiste em: desnaturação inicial 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 54°C durante 30 segundos (anelamento) e 72°C durante 1 minuto (extensão); 10 minutos de extensão final a 72°C. A concentração dos reagentes está exposto na tabela de PCR 1, a seguir:

Tabela de PCR 1

Reagentes C <sub>i</sub>	Volume da solução estoque/reação	C <sub>i</sub> /reação
Tampão Phoneutria 10X	1,5 µL	1X
dNTP 10mM	0,3 µL	0,2 µM
Iniciador Fw 10µM	0,3 µL	2,5 µM
Iniciador Rv 10µM	0,3 µL	2,5 µM
Taq Polimerase 5U/10µL	0,2 µL	1U/reação
Água miliq autoclavada	q.s.p. 15uL	-
DNA 0,5 – 100ng/reação	1 – 2 µL	-

A amplificação do microssatélite com oligonucleotídeos iniciadores Esm\_Mit\_Fw\_M13tail (iniciador Fw com cauda M13), M13-40FAM e Esm\_Mit\_Rv foram realizadas em termociclador EPPENDORF Mastercycler modelo 22331 e o programa consiste em: desnaturação inicial 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos(desnaturação), 54°C durante 30 segundos (anelamento) e 72°C durante 1 minuto (extensão); 10 minutos de extensão final a 72°C. A concentração dos reagentes está exposto na tabela de PCR 2, a seguir:

Tabela de PCR 2

Reagentes C <sub>i</sub>	Volume da solução	C <sub>i</sub> /reação
Tampão Phoneutria 10X	1,5 µL	1X
dNTP 10mM	0,3 µL	0,2 µM
Iniciador FwM13tail 10 µM	0,03 µL	0,25 µM
Iniciador M13-40FAM Fw 10µM	0,3 µL	2,5 µM
Iniciador Rv 10µM	0,3 µL	2,5 µM
Taq Polimerase 5U/µL	0,2 µL	1U/reação
Água miliq autoclavada	q.s.p. 15uL	-
DNA 0,5 – 100ng/reação	1 – 2 µL	-

#### 4.7. Análise dos amplicons

O produto das amplificações foi analisado em gel de agarose 0,8% ou poliacrilamida 6% na presença de padrão de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen) de acordo com a padronização da amplificação. Os géis de acrilamida foram corados com Nitrato de Prata e analisados sob luz branca, e os géis de agarose foram corados em tampão com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm).

Os géis de poliacrilamida foram corridos em cubas verticais com tampão TBE 1X de acordo com protocolo padrão estabelecido no Laboratório de Genética Bioquímica (SAMBROOK; GREEN, 2001), aplicando uma diferença de potencial de 100 a 120 volts,

acompanhando os marcadores de corrida, entre 1 e 2 horas. Os géis de agarose foram preparados a uma concentração de 1,0% m/v em tampão TAE 0,5 X (Tris 40 mM, acetato de sódio 5,0 mM e EDTA 1,0 mM) e corridos em cubas horizontais com tampão TAE 0,5X de acordo com protocolo padrão estabelecido no Laboratório de Genética Bioquímica, aplicando uma diferença de potencial entre 80 e 120 volts e acompanhando os marcadores de corrida entre 30 e 60 minutos. As amostras foram aplicadas com tampão de amostra (Glicerol 5,0% v/v; azul de bromofenol 0,042% m/v, xileno cianol 0,042 m/v) para em seguida ser aplicado no gel. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 20ug/mL). Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador UV (Byoagency, modelo T25M) e fotografado.

Os amplicons a serem analisados via ALF (*Automatic Laser Fluorescent*) Sequencer foram previamente analisados em gel de agarose para estimar a quantidade de produto de reação a ser aplicado no sistema. A quantidade de produto de reação de PCR a ser aplicado é determinada de forma empírica, baseado de acordo com a intensidade de marcação da banda em gel de agarose. A quantidade aplicada variou entre 0,5uL a 1,2uL.

#### 4.8. Determinação do perfil alélico de microssatélites

Para a determinação do tamanho dos alelos de microssatélites, uma alíquota de 0,45 µL a 1,2 µL do produto da PCR foi desnaturada a 90 °C por 3 minutos, mergulhado em água fria, depois submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (8M uréia) no sequenciador automático de DNA (ALF – Pharmacia). A corrida ocorreu durante 10 horas, a 45 °C.

Como padrão externo das corridas foram utilizadas escadas alélicas contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares conhecidos, “sizer 50–500” (Pharmacia). Para cada canaleta aplicada foi acrescentado um fragmento fluorescente de tamanho conhecido, que foi utilizado como padrão interno da corrida.

Os resultados obtidos em forma de cromatograma foram analisados no programa AlleleLocator (versão 1.03, Pharmacia-Biotech). Os fragmentos de tamanho conhecido (padrões internos e externos) foram corretamente alinhados e os tamanhos dos alelos foram calculados.

#### 4.9. Purificação, clonagem e obtenção de DNA Plasmidiano

Duas abordagens de purificação e sequenciamento foram utilizadas. No início do projeto optou-se o sequenciamento na plataforma MegaBACE, no qual os amplicons foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e após clonados em vetor pGEM®-T Easy. Uma alíquota (2,5 µL) dos produtos de PCR purificados foi utilizada diretamente em reações contendo 50 ng do vetor, 3U de T4 DNA Ligase e 1X do tampão *Rapid Ligation Buffer* [30 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 5% PEG MW8000] em um volume final de 10 µL. As reações de clonagem ocorreram a 4 °C, por 16 horas.

Para a transformação, alíquotas de 40 µl ( $10^6/10^7$  células) da *Escherichia coli* DH5α eletrocompetente foram descongeladas no gelo, acrescidas de 3 µl da reação de ligação e incubadas no gelo por 5 min. Cada amostra foi transferida para uma cubeta e submetida à eletroporação com um pulso elétrico de 2,5kV (eletroporador MicroPulser Bio Rad). Imediatamente após a eletroporação, a amostra foi transferida para um microtubo contendo 200 µl de meio 2xYT pH 7,0 (bacto-triptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g, água q. s. p. 1 L) e incubada a 37 °C sob agitação constante por 45 min. Diferentes volumes da reação foram plaqueados em meio 2xYT adicionado de 1,5% de ágar e 100 µg.ml<sup>-1</sup> de ampicilina e incubadas por 16 horas em estufa à 37°C.

Para confirmação da transformação foi realizado PCR de colônia utilizando as quantidades descritas na tabela de PCR 1 e usando um inóculo de colônia com palito estéril como “DNA”. Às transformações confirmadas, as respectivas colônias foram submetidas a Miniprep com kit *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) para extração e purificação do plasmídeo contendo o inserto.

O segundo modo de purificação também foi utilizado o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), desta vez para purificação das bandas que apresentavam o tamanho esperado do amplicon, e o sequenciamento realizado pela plataforma ABI 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

O sequenciamento das diversas cepas para representar todos os grupos de *T. cruzi* foi realizado através do serviço de sequenciamento do Laboratório de Genética Animal da Faculdade de Veterinária, UFMG, pela plataforma ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Resumidamente, foi feita uma eletroforese em gel de agarose com 90 µL do produto de PCR. Após a eletroforese, o gel foi exposto ao transluminador (no modo de baixa intensidade) e foi feita a excisão da banda. Os fragmentos de agarose foram transferidos para um microtubo, pesados e ao mesmo foi adicionado 10 µL de solução de ligação à membrana (isotiocianato de guanidina 4,5 M, acetato

de potássio 0,5 M, pH 5,0) para cada 10 mg de agarose. Foi feita uma incubação com agitação à 65°C até a completa dissolução da agarose e em seguida o material foi transferido para a Wizard<sup>®</sup> SV Minicolumns (membranas de sílica). A coluna foi centrifugada a 18.000 xg, em temperatura ambiente por um minuto e 700 µL da solução de lavagem (10 mM de acetato de potássio, pH 5,0, 16,7 µM de EDTA, pH 8,0) e novamente centrifugada a 18.000 xg, em temperatura ambiente por um minuto. O processo de lavagem foi repetido, só que com 500 µL da solução de lavagem e seis minutos de centrifugação. Após isso foi adicionado à coluna 25 µL de ddH<sub>2</sub>O à 37°C e, depois de um minuto de incubação, a coluna foi eluída por centrifugação a 18.000 xg por um minuto à temperatura ambiente. A eficiência e a pureza do material precipitado foram acessadas pela dosagem do DNA por espectrofotômetro.

#### 4.10. Reação de Sequenciamento

O microsatélite Amx2 inicialmente foi analisado em cepas CL Brener, 222 e Colombiana através de sequenciamento como inserto no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Em cada reação foram utilizados 4 µL do kit *DYEnamic ET Dye Terminator MegaBACE* (GE Healthcare), e sequenciadas no sequenciador automático MegaBace 1000 utilizando 5 pmol de iniciador (M13), 200-250 ng de DNA (Miniprep) e água miliq q.s.p. 10uL. As reações foram feitas no termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf) usando o seguinte programa: 30 ciclos de i. desnaturação 95°C (20 segundos), ii. anelamento 55°C (15 segundos) e iii. extensão 60°C (1 minuto e 20 segundos). Após rea o no termociclador, os produtos foram submetidos a precipita o com etanol e aplicados no sequenciador MegaBace 1000 de acordo com as especifica es do fabricante. A análise das sequências foi realizada usando a interface DNA Baser (versão 3.2.5.133).

Todos os eletroferogramas gerados foram analisados no programa DNA Baser Sequence Assembler (Heracle Biosoft) para a montagem dos *contigs*. Os dados gerados pela plataforma ABI 310 foram automaticamente reconhecidos pelo referido programa e a atribui o de base aos picos executada. Todavia, os eletroferogramas gerados pela plataforma MegaBACE<sup>™</sup> 1000 DNA Analysis System não foram reconhecidos pelo programa DNA Baser, sendo necessário uma atribui o de base no programa PHRED (EWING et. al., 1998; EWING & GREEN, 1998) para gera o do arquivo de rastreamento no formato SCF versão 3.

Após esta montagem inicial, cada base do *contig* foi cuidadosamente analisada. Nos casos de ocorrência de atribui o de bases, montagem ou alinhamento incorretos foi feita uma corre o manual baseada na observa o da existência ou não de um pico resolvido, caso isso não fosse

possível, toda a região foi removida do *contig*. Também foram removidas dos *contigs* regiões correspondentes aos iniciadores.

#### 4.11. Dosagem de ácidos nucléicos em solução

DNA em solução foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ NP 1000 (Thermo-Scientific) através da leitura da absorbância a 260 nm. O grau de pureza das amostras foi estimado pela razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm.

## RESULTADOS

### 5.1. Buscando microssatélites no kDNA *in silico*.

Estudar a instabilidade de microssatélites é uma excelente ferramenta para testar a instabilidade genômica. Diante disso, com intuito de observar a estabilidade do DNA mitocondrial do *T. cruzi*, procuramos por microssatélites nessa molécula.

Analizamos a sequência do maxicírculo de CL Brener com programa Tandem Repeats Finder para localizar sequências repetitivas. A Figura 11 ilustra o resultado da sequência do DNA mitocondrial de CL Brener submetido ao programa com os seguintes parâmetros: +2 pontos para pareamento, -7 para não pareamento e -7 para inserção/deleção. A matriz é feita baseada em alinhamento da sequência com ela mesma, ao atingir 50 pontos uma sequência repetida é registrada.

Indices	Period Size	Copy Number	Consensus Size	Percent Matches	Percent Indels	Score	A	C	G	T
<a href="#">101--142</a>	23	1.9	21	85	9	57	52	9	2	35
<a href="#">669--808</a>	63	2.4	55	75	20	156	50	12	10	26
<a href="#">684--814</a>	64	2.0	65	94	2	230	51	11	10	26
<a href="#">921--962</a>	23	1.9	21	85	9	57	52	9	2	35
<a href="#">1408--1575</a>	64	2.7	63	93	4	293	55	10	8	25
<a href="#">1638--1679</a>	23	1.9	21	85	9	57	52	9	2	35
<a href="#">1718--1858</a>	64	2.4	55	76	18	165	50	12	10	26
<a href="#">1733--1864</a>	64	2.0	65	95	1	239	51	11	10	26
<a href="#">4782--4840</a>	22	2.7	22	78	5	66	30	0	10	59
<a href="#">6399--6437</a>	19	2.1	19	85	0	51	51	0	2	46
<a href="#">10258--10297</a>	17	2.4	17	87	8	55	20	2	40	37
<a href="#">10512--10586</a>	31	2.4	30	80	13	80	65	2	5	26
<a href="#">13884--13935</a>	24	2.2	23	79	3	59	15	3	5	75
<a href="#">18712--18751</a>	14	2.6	16	77	22	50	15	7	7	70

Figura 11. **Análise de microssatélites no kDNA de CL Brener.** *Indices*: início e fim da repetição na sequência fornecida. *Period Size*: tamanho da unidade da repetição. *Copy number*: quantidade de vezes que a unidade é repetida. *Consensus size*: tamanho da sequência considerando apenas nucleotídeos pareados. *Percent Matches*: porcentagem da sequência que se alinha formando uma repetição perfeita. *Percent Indels*: porcentagem de inserção/deleção ocorrido na sequência. *Score*: pontuação mínima para ocorrer registro de sequência repetida, nesse caso 50. *A/C/G/T*: porcentagem de nucleotídeos na sequência.

O programa ainda permite alterar os parâmetros para uma configuração mais permissível, porém mesmo configurando com os menores e maiores parâmetros ainda assim nenhum microssatélite foi encontrado (dados não mostrados).

Para sequência mitocondrial de CL Brener testada, o programa retornou 14 possíveis sequências microssatélites. Porém, numa análise mais aprofundada é possível observar que o tamanho da repetição e a quantidade de vezes que se repete são baixas suficientes para serem consideradas irrelevantes para os nossos objetivos (testar instabilidade de sequências repetitivas). No caso ilustrado na Figura 11, a maior repetição encontrada nos índices 1408--575 e 4782--4840, no qual se repetem 2.7 vezes, tamanho de repetição considerada pequena demais considerando outros trabalhos que estudam instabilidade de microssatélite.

Devido à ausência de sequências curtas repetidas em tandem perfeitas, foi realizada uma busca manual em editor de texto. Os resultados estão ilustrados na Figura 12 a seguir:

```
GTTTAATTTTGTATCAATATTTATAAAATGAGATCAAATAAATTAATAATATCAAAAAATAATGTATAAA
AAGAACAACACTACAAAAAAATTTAAATTATTAAAGCAAACATAAATGAAGTCTAACTACTCAAAATCCAAT
AGATTGATATGAAAAAATAAAAATGTTAATAATAAGTCTAAAAATAAAAAATATAAATTATAATAAGTCAA
ATGATTAATAAATAAAAATGATGCAAACACCAATGTAGCTAAGTTGTGTTAGTAAGCAAAAACTTTTATAA
AGAAACCAAAGGCAATGGGGATAGTACCTATACATAAAAAATAAGCAAGATAACATGATACTAAGCAAAAA
ATTATTAATAAATAAAAAAGATAAAAATTTATGAGAAAATAATTTTCGTTATACTTAATATCAAAAAATA
TTGTAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
TATCTGTTTTTTGATTTTATAAGTTTTTTCATGTTTTATTATAAATTTTTTTGGTCTATTCTTCACATTTA
ATATCATATTTTGTACGTATTTGTTTTGCTTATTTTATTATTTATAAATTTTTTTTTATTCTGTTTTATATT
TTTTGTAATACGTTGTTTATTTGTAATTGTATTCGACTTTTTTATTTTTTAATTTTCGATATTTTATATCA
TTAACGTTATGTGATGTACAGTATATAGATTTTCGTGTGTTTCTTAATATTGTATTTTAATTATATAACAA
ATTCATATATGGATTTTATTGTTTCATAATTATATTAGGGTTAATTTTTTTTATTATTATACATGGTACT
TAATTTATATTTTGGTTTTTTTTATAAATTTATGGATTAATATCTTTTCTGATAAATTATATATTCTGA
ATATATATAATATATAGTAGAAGTTGTTATATATTAATGCCGTCTATTTTAATATTTTTTAAGTTTTATT
```

Figura 12. **Microssatélites no kDNA de *T. cruzi***. A região sublinhada indica a sequência utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para cada microssatélite, e a região realçada marca a sequência repetida. Na figura acima estão dois motivos de adeninas repetidas 9 vezes. Na figura abaixo estão dois motivos de timinas repetidas ambas 10 vezes.

As maiores repetições em tandem encontradas estão ilustradas na Figura 12. Duas compostas por adeninas, onde a primeira (de cima para baixo) composta por 9 adeninas foi denominada Amx2, e segunda também composta por 9 adeninas (motivo de repetição A, de adenina) foi denominada Amx1. Duas compostas por timinas, onde a primeira foi denominada Tmx1 e a segunda Tmx2 (motivo de repetição T, de timina).

Os microssatélites Amx1 e Amx2 estão dentro da sequência denominada MURF1 e descrição sobre esse gene encontra-se apenas no trabalho de microarranjo, demonstrando

aumento de expressão de RNAm diante radiação ionizante (GRYNBERG et al., 2012). Os microssatélites Tmx1 e Tmx2 estão dentro do gene MURF2 e nenhum trabalho foi descrito sobre esse gene. Não há trabalhos descrevendo esses dois genes com mais detalhes.

A partir da caracterização *in silico* dos microssatélites Amx1, Amx2, Tmx1 e Tmx2 foi possível testar os oligonucleotídeos iniciadores em diversas cepas disponíveis no Laboratório de Genética Bioquímica a fim de verificar qual iniciador seria mais viável diante diferentes grupos do parasito. Após amplificação por PCR e análise via gel de agarose e acrilamida, o microssatélite Amx2 foi escolhido por resultar em *amplicons* mais satisfatórios diante as diferentes cepas (dados não mostrados).

## 5.2. Caracterização Microssatélites nos diferentes grupos de *T. cruzi* DTU.

Diante de diversos trabalhos descrevendo a variabilidade genética dentro da espécie *T. cruzi*, várias classificações em distintos grupos foram descritas. A mais recente, DTU (Discrete Typing Unit), distribui diferentes cepas em 6 grupos de acordo com marcadores genéticos. Além disso, Augusto-Pinto et al. analisaram a sequência do gene de MSH2 e pôde separar a espécie em 3 haplogrupos de acordo com marcadores SNP e pelo fenótipo de melhor (Haplogrupo A) e pior (Haplogrupos B e C) eficiência no reparo de instabilidade de microssatélites nuclear. Diante disso, analisamos a estabilidade da região repetitiva encontrada (Amx2) em algumas cepas de diferentes grupos para ter uma ideia inicial da sequência nessa região. O resultado está ilustrado na Figura 13.



Figura 13. **Caracterização de microssatélite em kDNA de *T. cruzi*.** Sequenciamento de 5 cepas dos 3 haplogrupos para conhecimento inicial do perfil da região repetitiva em diversas cepas de *T. cruzi*. Apenas haplogrupo A (Tc1) apresenta a repetição CAA conservada, enquanto que os outros haplogrupos sofreram mutação de C→A, típico de lesão 8oxoG (seta).

O alinhamento das sequências de Colombiana e Silvio representando o haplogrupo A, cepas 222 e CL Brener representando o Haplogrupo B e Esmeraldo o Haplogrupo C segundo classificação de Pinto *et al.* 2003 resultam na Figura 13. Curiosamente, cepas pertencentes ao haplogrupo A (DTU I) apresentaram um microssatélite com 4 repetições CAA. Essa repetição é perdida nas outras cepas analisadas devido a presença de duas mutações: uma troca A-T na

segunda repetição e uma troca C-A na última repetição. A troca de C para A é uma assinatura da presença da base 8-oxoguanina que pode levar um pareamento errôneo com a adenina. No trabalho de Pinto *et al.* 2003 foi verificado que cepas pertencentes ao grupo DTU I apresentavam um MMR mais eficiente e isso ficava mais evidenciado após o tratamento com peróxido de hidrogênio (AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S., 2003). A mutação encontrada de C-A pode ser relacionada à deficiência no MMR após o estresse oxidativo.

Diante esse cenário, buscamos analisar essa região em mais cepas de *T. cruzi* para ver se essa observação se estende a mais amostras. O alinhamento na Figura 14 ilustra a região Amx2 de 14 cepas de *T. cruzi* identificadas posteriormente com a classificação de DTUs.

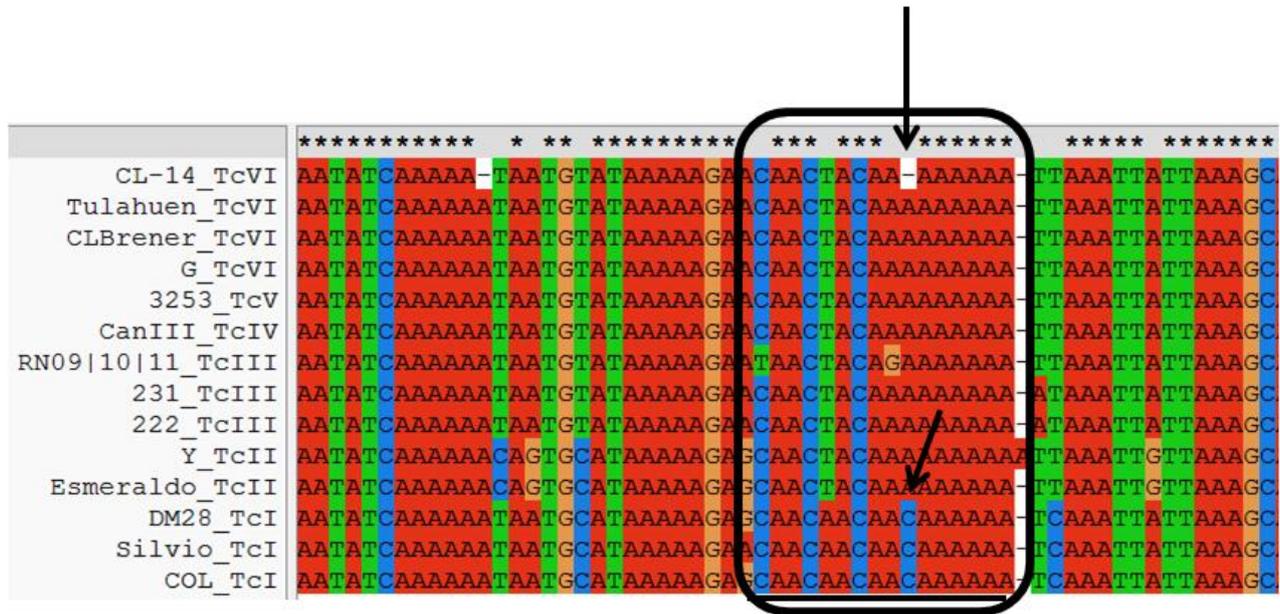


Figura 14. **Cepas de *T. cruzi* e classificação por DTU.** Uma análise estendida a outras cepas de *T. cruzi* para observar a composição da repetição CAA em outras cepas não haplogrupo A (TcI), averiguando a não conservação do nucleotídeo citosina.

A figura 14 demonstra a falta de conservação do nucleotídeo citosina na última unidade de repetição CAA, o qual é observado apenas em cepas pertencentes ao grupo Tc1 (haplogrupo A). Embora outras mutações são observadas ao longo da sequência, a conversão de C→A ocorre apenas em cepas de grupo não Tc1.

A partir destes resultados elaboramos um experimento para observar se a ausência de proteínas chaves do MMR estavam diretamente relacionadas com a instabilidade de microssatélite na mitocôndria e se alguma outra mutação característica de estresse oxidativo seria gerado nessa região.

### 5.3. Estabilidade de microssatélite mitocondrial de CL Brener

Células de CL Brener selvagem, hemi-nocaute e duplo-nocaute para MSH2 e hemi-nocaute para MSH6 foram cultivadas durante 50 dias (aproximadamente 50 gerações) em dois grupos: não tratados e tratados com 50  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio.

Para analisar a instabilidade de microssatélite, ganho/perda de unidades do motivo de repetição, a região foi amplificada com oligonucleotídeo com cauda marcada com o fluoróforo FAM e analisado via sequenciador automático ALF. Os resultados estão ilustrados nas figuras a seguir.

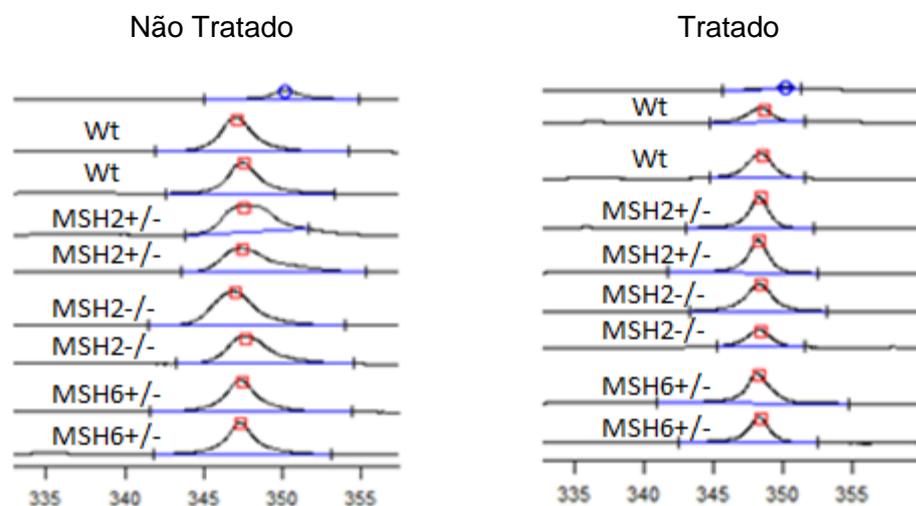


Figura 15. **Electrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélite mitocondrial Amx2, a partir do DNA genômico de CL Brener, de células submetidas ou não a tratamento com 50  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio, após 50 dias de cultivo. O locus Amx2 com cauda M13 apresenta pico de 349 nucleotídeos, incluso nele um motivo de repetição de A<sub>9</sub>. Resultado ilustrado em duplicata. Esquerda (Tratado), Direita (Não Tratado).**

A figura 15 ilustra os primeiros resultados de análise de estabilidade de microssatélite mitocondrial. O fragmento amplificado no grupo controle possui um tamanho de 349 nucleotídeos, e se mantém constante após 50 dias de cultivo em todas as cepas, inclusive em cepas com ausência de MMR e com tratamento com peróxido de hidrogênio.

### 5.4. Sequenciamento

Para confirmar os resultados do ALF e verificar algum perfil de mutação na região observada, foi feito sequenciamento da região do locus Amx2. As 8 replicatas de todas as cepas foram sequenciadas do grupo tratado, e 4 replicatas do grupo não tratado de todas as cepas

foram sequenciadas. O alinhamento via DNA Baser (v.3.5) e ClustalW 2.1 revelaram não haver qualquer tipo de instabilidade do microssatélite nas leituras, e para facilitar a visualização foram montados contigs de cada cepa e feito o alinhamento. Como se vê na Figura 16, além de não haver mudança no tamanho, não houve mutação na região repetitiva para nenhuma cepa em nenhum grupo do experimento.



Figura 16. **Alinhamento da região do microssatélite Amx2.** Após 50 dias de cultivo o *locus* Amx2 foi sequenciado e na região repetitiva não foi observado nenhuma mutação.

Além da composição (motivo) do microssatélite, uma região maior (mais 80 pares de bases aproximadamente) foi sequenciada. A figura 17 ilustra o alinhamento no algoritmo MultiAlign onde foram utilizado apenas bases com mínimo 20 de qualidade analisado via DNA Baser (v 3.5). Em um segmento de 143 pb não foi observado nenhuma mutação para nenhuma cepa em todos os grupos do experimento de cultura.

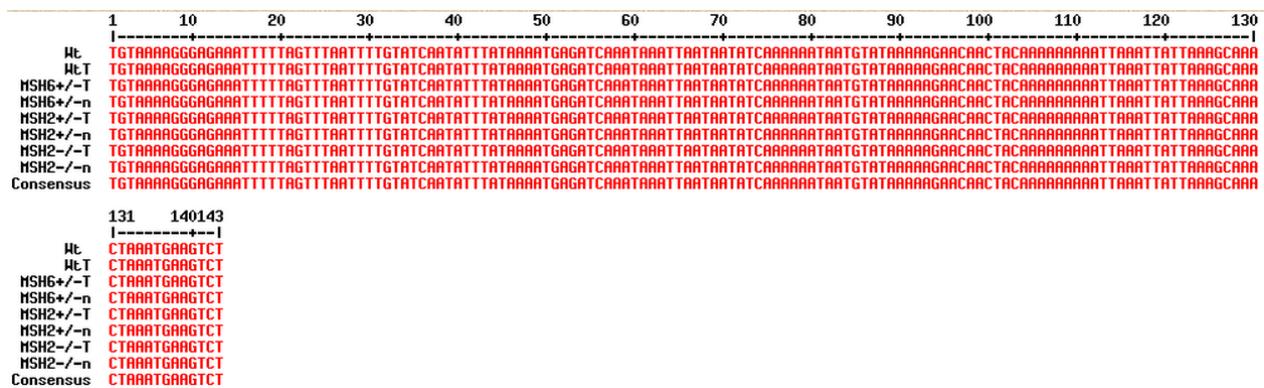


Figura 17. **Região sem mutações após 50 gerações com e sem tratamento de 50 µM de peróxido de hidrogênio.** A figura ilustra o resultado do sequenciamento do *locus* Amx2, em torno da região repetitiva não foi observado nenhuma mutação comparado ao CL Brener selvagem (controle).

Além de regiões repetitivas serem altamente polimórficas, regiões intergênicas na maioria das vezes sofrem menos pressões evolutivas, pois mutações nessa região afetam menos a estabilidade genômica e a expectativa de vida, podendo ocorrer mutação de uma forma mais frequente. Em vista disso, buscamos no DNA mitocondrial uma região intergênica que pudesse fornecer dados sobre a taxa e o perfil de mutação, caso houvesse. O kDNA de *T. cruzi* possui pouca ou porções muito curtas de região intergênica, de modo que a mais satisfatória para esse

fim foi encontrada entre os genes mitocondriais COI e ND4, uma região chamada CR4 (*Cytosine rich 4*). A figura 18 ilustra o alinhamento do sequenciamento dessa região onde foi utilizado apenas bases com mínimo 20 de qualidade analisado via DNA Baser (v 3.5). Como pode ser visto na figura 18, também nessa região intergênica não foi verificado nenhuma mutação.

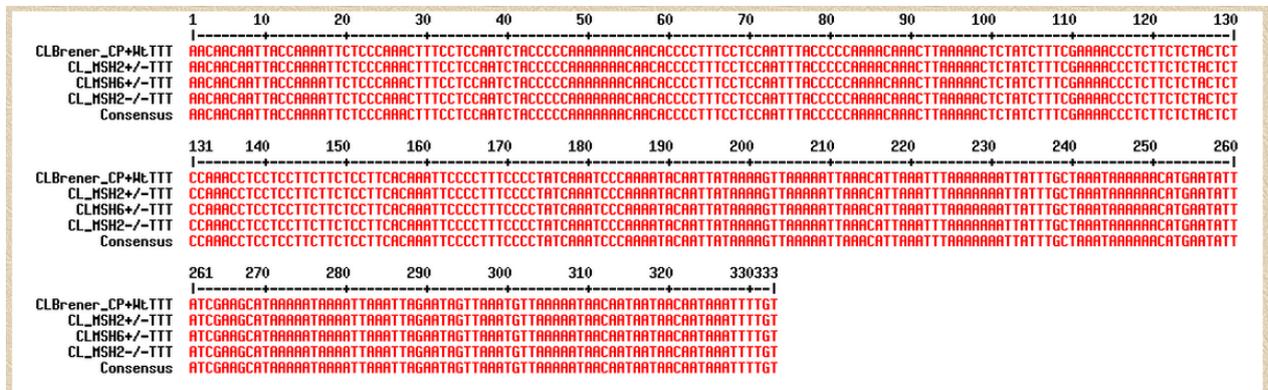


Figura 18. Sequenciamento da região intergênica mitocondrial de CL Brenner. Sequenciamento entre os genes COI e ND4 de cepas CL Brenner selvagem e deficientes em genes do MMR (MSH2 hemi-nocaute – MSH2+/-, MSH2 nocaute – MSH2-/- e MSH6 hemi-nocaute (MSH6+/-) após 50 dias de cultivo na presença de 50 µM de peróxido de hidrogênio. TTT: tratado. O controle positivo e o Wt Tratado estão ilustrados juntos para favorecer a representação.

### 5.5. Análise de microssatélites nucleares de CL Brenner

A estabilidade de microssatélite mitocondrial nos levou a questionar se esse fenótipo se repetiria no núcleo. Para tanto, foram utilizados 9 *loci* nucleares em CL Brenner ATT14, CAA10, GAG10, MCLF10, MCLG10, SCLE10, SCLE11, TAT20 e TAC15 (PIMENTA, JULIANA RAMOS et al., 2002; VALADARES et al., 2008).

A maioria dos 9 *loci* analisados apresentaram estabilidade no comprimento do *amplicon* através da análise via ALF durante cultivo de 50 dias (Figuras 19 a 23). Entretanto, um fato curioso aconteceu. O *locus* SCLE11 possui na cepa selvagem um *amplicon* de 153 nucleotídeos, diferente do *amplicon* apresentado na cepa modificada MSH2 hemi-nocaute, 150/153 (Figura 23). Para confirmarmos que essa alteração surgiu durante os repiques realizados, a análise da geração zero foi feita e pudemos constatar essa alteração já estava presente no início do experimento (Figura 23). Possivelmente, a instabilidade de microssatélite na cepa heminocaute deve ter ocorrido entre o período de geração dessa cepa (há aproximadamente 4 anos) e os experimentos atuais, pois quando essa cepa foi gerada a mesma não apresentou diferenças no *locus* SCLE11 (dado não mostrado).

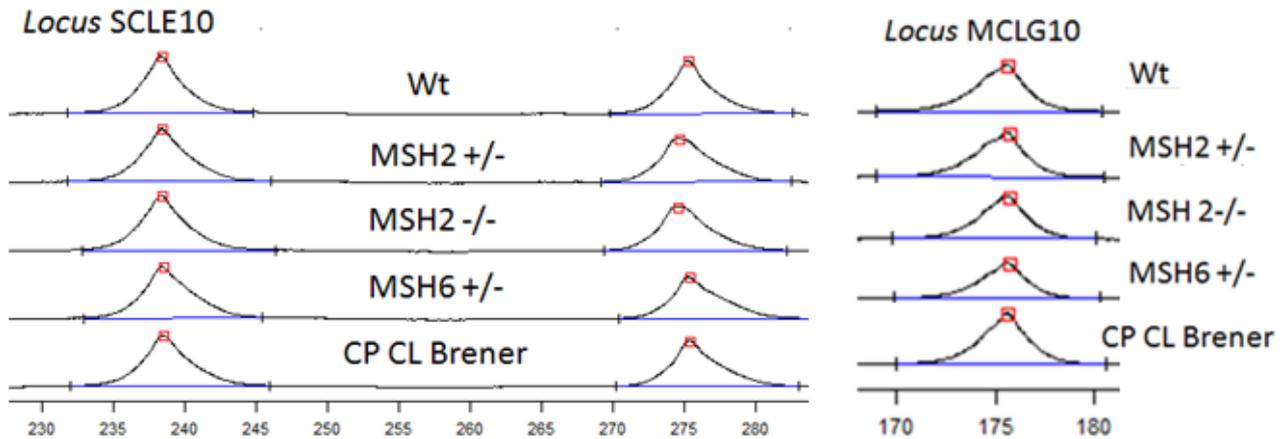


Figura 19. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites SCLE10 e MCLG10, a partir do DNA genômico de CL Brener, de células submetidas ou não a tratamento. O locus SCLE10 apresenta picos de 238 e 275 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> e um motivo TG<sub>9</sub>. O locus MCLG10 apresenta pico de 175 nucleotídeos, nele incluso um motivo de repetição de A<sub>16</sub>.

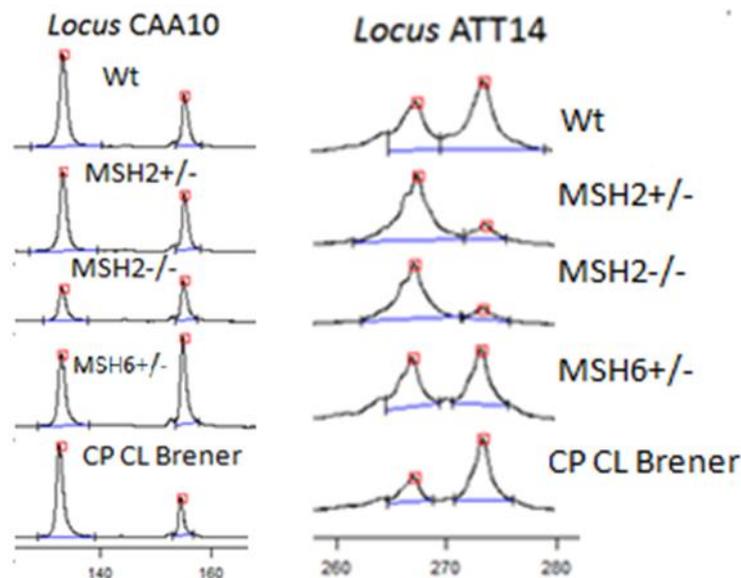


Figura 20. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites CAA10 e ATT14, a partir do DNA genômico de CL Brener, de células submetidas ou não a tratamento. O locus CAA10 apresenta picos de 133 e 155 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição CAA<sub>10</sub>. O locus ATT14 apresenta picos de 267 e 273 nucleotídeos de comprimento, neles incluso motivos de repetição de ATT<sub>7</sub> e T<sub>13</sub>.

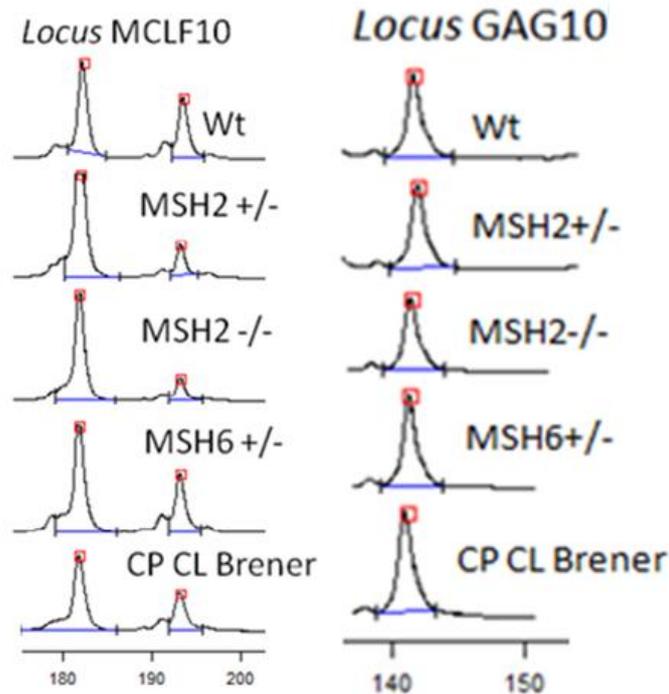


Figura 21. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites MCLF10 e GAG10, a partir do DNA genômico de CL Brener submetidas ou não a tratamento. O locus MCLF10 apresenta picos de 182 e 193 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição  $(CA)_2A(CA)_{14}$ . O locus GAG10 apresenta pico de 141 nucleotídeo de comprimento, nele incluso motivo de repetição de  $GAG_{10}$ .

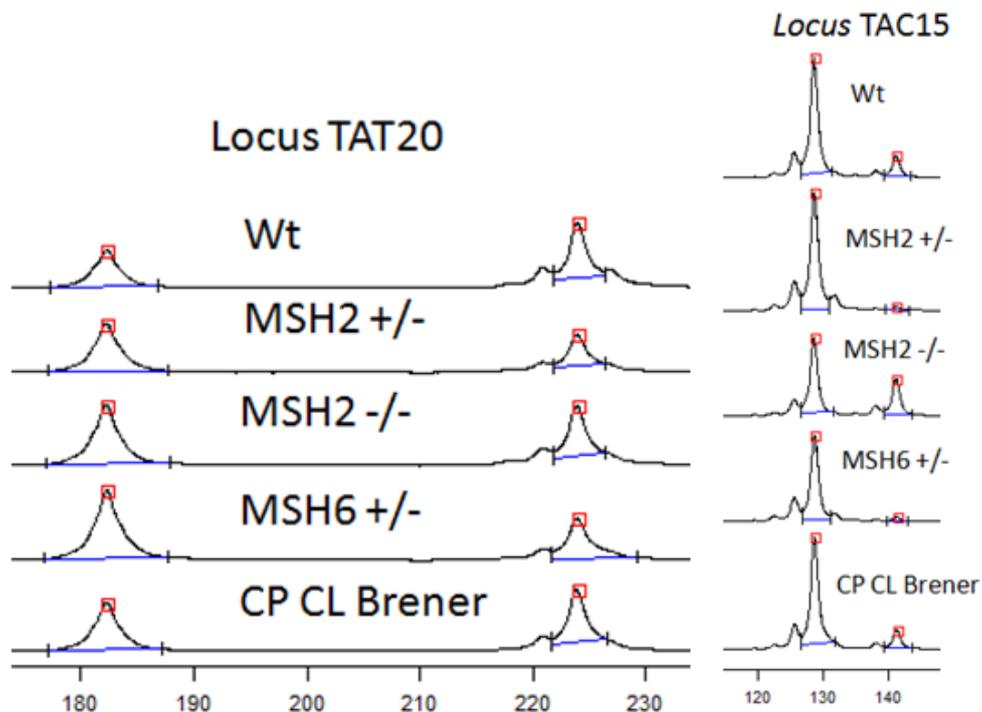


Figura 22. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites TAT20 e TAC15, a partir do DNA genômico de CL Brener submetidas ou não a tratamento. O locus TAT20 apresenta picos de 182 e 224 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição  $TAT_{20}$ . O locus TAC15 apresenta picos de 128 e 141 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de repetição de  $TAC_{15}$ .

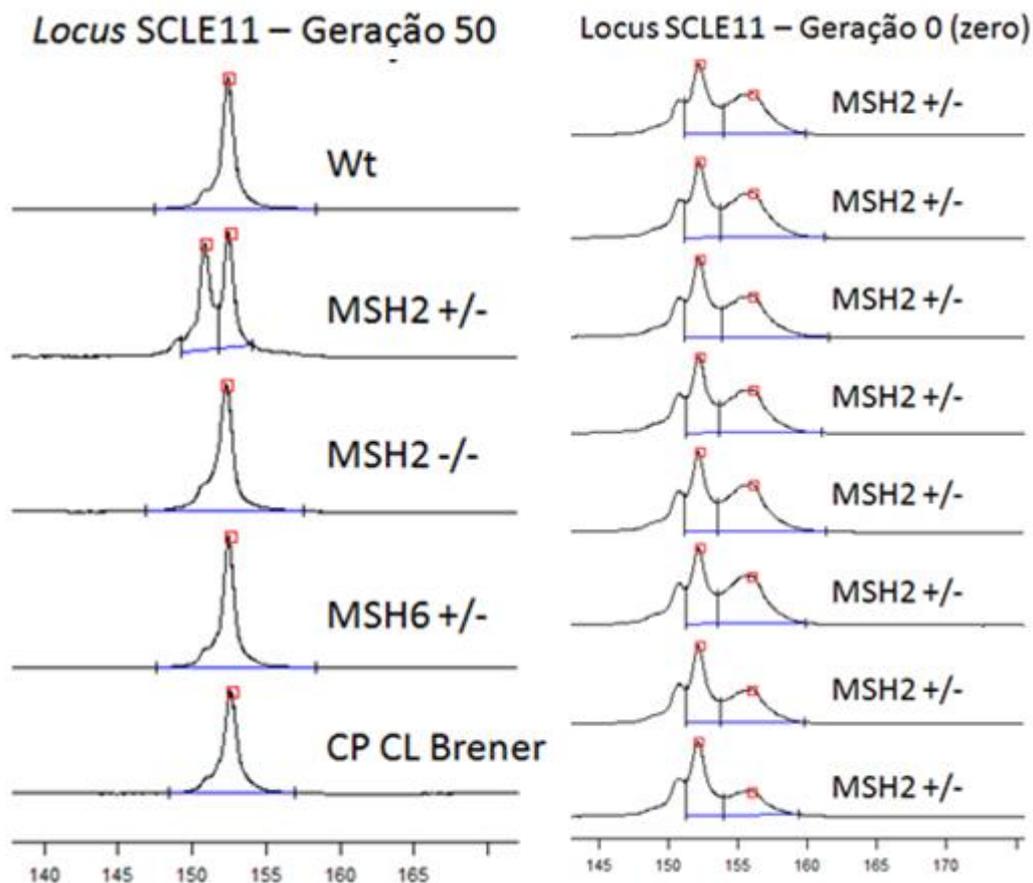


Figura 23. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus microssatélite SCLE11, a partir do DNA genômico de CL Brener, de células submetidas ou não a tratamento da geração zero e cinquenta. O locus SCLE11 apresenta pico de 152 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição AC<sub>9</sub>. Além disso, a cepa MSH2<sup>+/-</sup> apresenta um segundo pico de 150 nucleotídeos, confirmado na amplificação da geração zero.

### 5.7. Análise de *loci* microssatélites mitocondrial e nuclear de Silvio

A estabilidade de microssatélite mitocondrial e nuclear de CL Brener nos levou a estender os experimentos para a cepa Silvio, representando assim o haplogrupo A na classificação de Pinto 2003 (considerando a eficiência de MMR). Para tanto foi utilizado os mesmo marcadores utilizados anteriormente, ou seja, foi utilizado um loco mitocondrial Amx2 e 9 *loci* nucleares: ATT14, CAA10, GAG10, MCLE05, MCLF10, SCLE10, SCLE11, TAC15 e TAT20 (PIMENTA, JULIANA RAMOS et al., 2002; VALADARES et al., 2008). As células da cepa Silvio selvagem foram cultivadas durante 30 dias (aproximadamente 30 gerações) em dois grupos: não tratado e tratado com a mesma droga. O DNA foi extraído e analisado em um gel desnaturante em um sequenciador automático (ALF).

Todos os *loci* analisados apresentaram estabilidade no comprimento do *amplicon* através da análise via ALF durante 30 dias de cultivo. As figuras 24 a 28 ilustram o resultado de cada amplificação dos *loci* microssatélites.

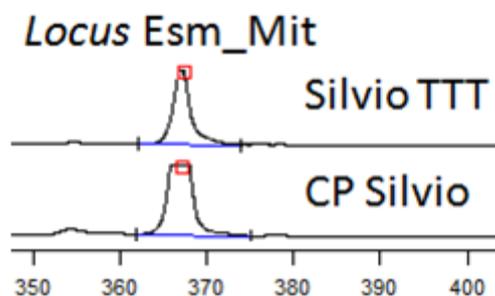


Figura 24. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélite Esm\_Mit (Amx2) a partir do DNA genômico de Silvio submetidas ou não a tratamento. O locus Esm\_mit apresenta pico de 367 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição A<sub>9</sub>.

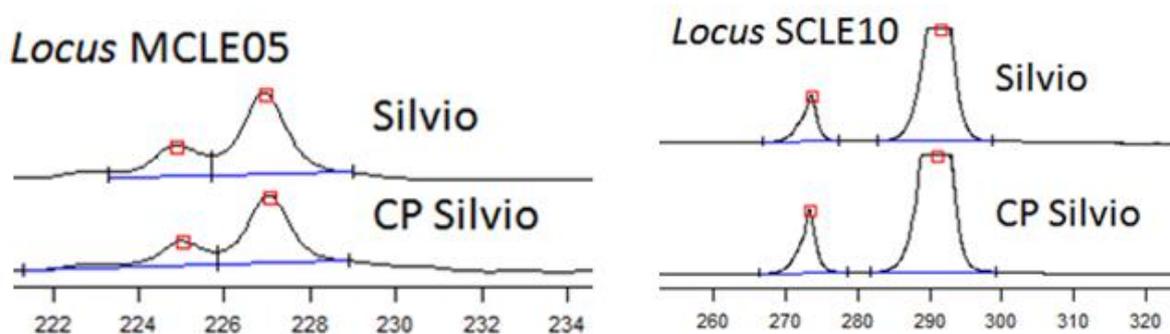


Figura 25. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites MCLE05 e SCLE10, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus MCLE05 apresenta picos de 224 e 267 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição TC<sub>9</sub>GT<sub>4</sub>. O locus SCLE10 apresenta picos de 273 e 291 nucleotídeo de comprimento, nele incluso o motivos de repetição A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> e um motivo TG<sub>9</sub>.

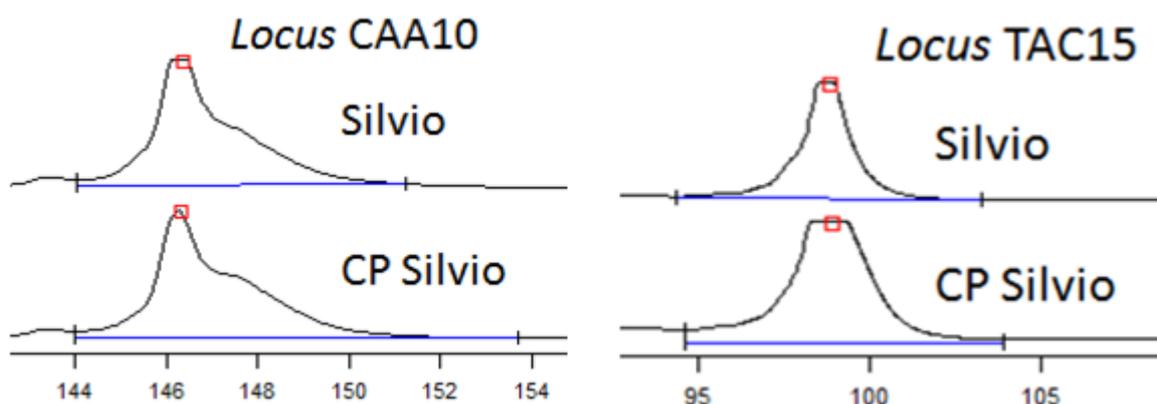
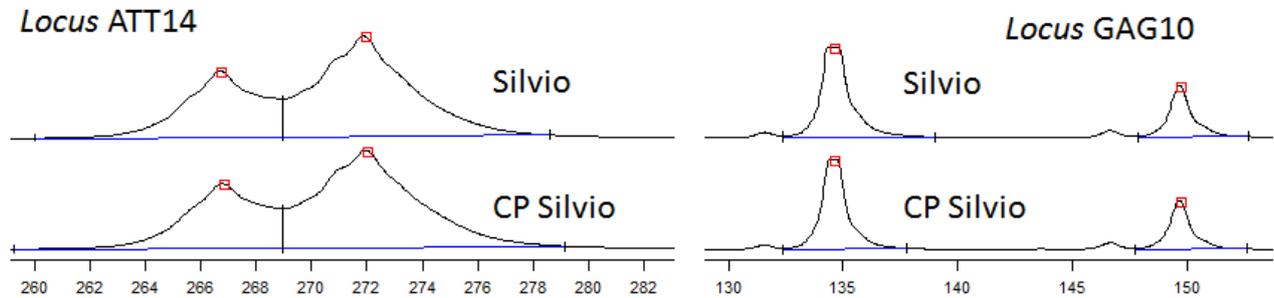
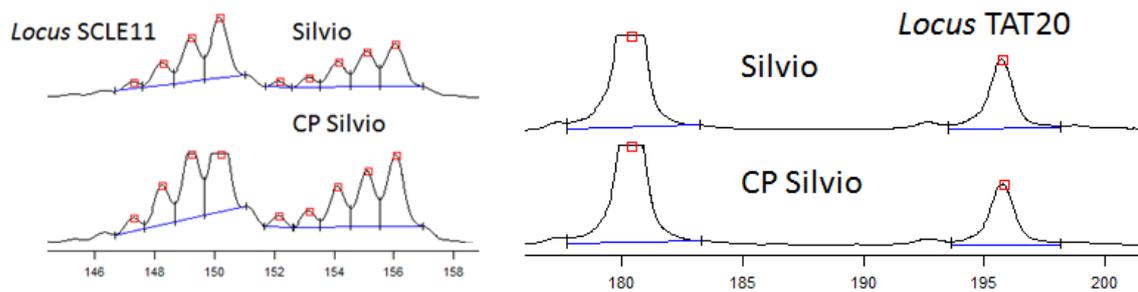


Figura 26. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites CAA10 e

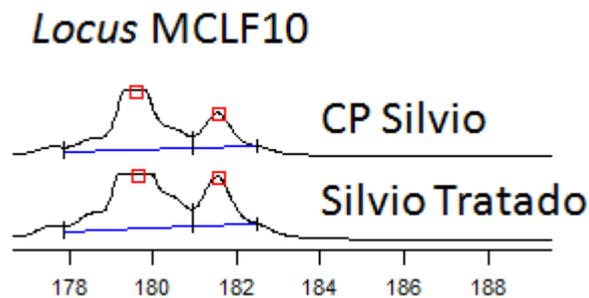
**TAC15, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus CAA10 apresenta pico de 147 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivo de repetição CAA<sub>10</sub>. O locus TAC15 apresenta picos de 98 nucleotídeos de comprimento, nele incluso o motivo de repetição de TAC<sub>15</sub>.**



**Figura 27. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites ATT14 e GAG10, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus ATT14 apresenta pico de 267 e 272 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição ATT<sub>7</sub> e T<sub>13</sub>. O locus GAG10 apresenta picos de 135 e 150 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de GAG<sub>10</sub>.**



**Figura 28. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos loci microssatélites SCLE11 e TAT20, a partir do DNA genômico de Silvio, de células submetidas ou não a tratamento. O locus SCLE11 apresenta pico de 267 e 272 nucleotídeos de comprimento, nesse incluso motivos de repetição AC<sub>9</sub>. O locus TAT20 apresenta picos de 135 e 150 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de TAT<sub>20</sub>.**



**Figura 29. Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do locus de microssatélites MCLF10, a partir do DNA genômico de Silvio submetidas ou não a tratamento. O locus MCLF10 apresenta picos de 179 e 181 nucleotídeos de comprimento, nele incluso motivo de (CA)<sub>2</sub>A(CA)<sub>14</sub>.**

## 6. Discussão

O *T. cruzi* é um organismo que, diante as condições de experimento desse trabalho, apresenta alta estabilidade de microssatélite mitocondrial e nuclear. Em todos os organismos estudados até hoje, a estabilidade de microssatélite é diretamente relacionada com a eficiência e presença das proteínas de reparo da via Reparo de Erro de Pareamento (MMR). Uma maneira de avaliar o estado funcional dos genes de reparo de erro de pareamento no DNA é verificar alterações no tamanho das sequências dos microssatélites (AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S., 2003; MIR, 2004; MACHADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L., 2006). Embora não observamos instabilidade de microssatélite, Augusto Pinto et al. após tratar culturas com uma dose de 600  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio pôde observar instabilidade de microssatélite nuclear em duas cepas, CL Brener e JG. Nesse trabalho fizemos a escolha de tratar com baixa dose de peróxido de hidrogênio, 50  $\mu$ M, a cada dois dias, com o intuito de causar uma sobrecarga das proteínas do MMR e facilitar que houvesse um escape maior de deslizamento da DNA polimerase replicativa e geração de alças de inserção e deleção, principalmente em cepas deficientes para MSH2. Entretanto o que se observou foi estabilidade de praticamente todos os *loci* analisados, o que sugere que outras proteínas e outras vias de reparo estejam atuando e/ou a dose do agente genotóxico era baixo demais para causar estresse significativo a ponto de desenvolver mutação.

As principais proteínas do sistema de reparo de erro de pareamento de *E. coli* são MutS e MutL, e muitos homólogos, MSH e MLH, foram descritas em outras espécies. A função primária do sistema de reparo dos erros de pareamento do DNA é eliminar os erros causados pelo mal pareamento de bases e pela inserção/deleção de fitas que podem ocorrer durante a duplicação do DNA. Em CL Brener após 50 gerações não foi observado alteração no tamanho de microssatélite em células selvagens e nem em células deficientes para MMR, mesmo resultado para células de Silvio selvagem após 30 gerações. A natureza repetitiva dos microssatélites faz com que ocorra um deslize das fitas de DNA durante sua duplicação e formem-se alças de inserção/deleção (LEVINSON; GUTNAN, 1987), porém o resultado desse evento não foi observado. Apenas no locus, SCLE11 que observamos uma instabilidade de microssatélite na cepa heminocaute em MSH2. Essa instabilidade surgiu antes do início dos experimentos relatados nessa dissertação. A mesma deve ter ocorrido no período entre a geração dessa cepa (aproximadamente 4 anos) e os experimentos atuais. Essa cepa é a que está mais tempo em cultivo no laboratório e o tempo maior de cultivo pode ter permitido que essa instabilidade tenha surgido, o que não é verificado nas cepas nocautes em MSH2 e heminocaute em MSH6 que são cepas que foram geradas recentemente e estão sendo cultivadas a pouco tempo. Esses dados sugerem que o reparo por erro de pareamento está marginalmente

envolvido com a estabilidade de microssatélites em *T. cruzi* ou que este organismo possui vias de reparo de DNA que são capazes de atuar na ausência do MMR.

Instabilidade de microssatélite representa uma importante forma de associação de instabilidade genômica com reparo de DNA defeituoso em tumores. Embora esse tipo de estudo seja muito mais direcionado ao genoma nuclear, poucos trabalhos estão descrevendo esse evento na mitocôndria. Habano et al. (1998) analisaram o DNAmT de 45 carcinomas de colo retal esporádicos e pôde observar alteração na sequência de  $C_n$  dentro de região não codificante (20/45) e três destes também em região codificante. Nenhuma alteração em repetição CA foi observada (HABANO, W et al., 1998). No presente trabalho, o *locus* SCLE11 apresenta motivo  $AC_9$  o qual durante 50 gerações não sofreu instabilidade. Entretanto, diferente da cepa controle, apresentou um segundo alelo (Figura 23) com dois nucleotídeos a menos (152/150) o qual precisou de vários repiques para ocorrer a instabilidade. Habano et al. (2000), estudando o câncer gástrico, observaram também alteração em sequências de  $C_n$  em 10/62 amostras analisadas. Em ambas situações, nenhum gene de reparo foi analisado, porém exemplifica a ocorrência deste fenótipo em situação de ciclo celular alterado (HABANO, WATARU et al., 2000). Em tecidos com câncer gástrico, Ling et al (2004) observaram instabilidade mitocondrial em 26/68 amostras, além de um aumento acumulativo na progressão histológica desde gastrite aguda (5/40), metaplasia (6/30) e displasia intestinal (5/20) (LING et al., 2004). É possível que a instabilidade mitocondrial vista por Ling et al. 2004 e Habano et al. 2000 seja devido a intenso estresse oxidativo e repetitivas lesões destes tecidos, diferente das culturas de CL Brener e Silvio que tiveram estresse oxidativo induzido com baixa dose de peróxido de hidrogênio de tal forma que outras vias de reparo devem ter sido suficientes para proteger as células.

Egashira et al. em 2002 estudaram células de camundongo nocautes para MTH1 (DNA glicosilase envolvida na remoção de 8oxodGTP do pool de nucleotídeos livres não polimerizados, homólogo de MutT), e diferente de *E. coli*, essas células não apresentaram taxa de mutação significativa para transição do tipo AT→CG, por outro lado observou um aumento acentuado na taxa de inserção de nucleotídeos onde aproximadamente 2/3 delas eram em regiões de mononucleotídeo de adenina (aumento de 5,7x do nocaute comparado ao selvagem). Embora em *E. coli* deficiente para MutT o aumento da transição AT→CG seja de 1000x, a falta desse fenótipo em camundongo pode ser atribuída ao direcionamento das proteínas reparo de MMR ao reparo de bases oxidadas, o que já foi visto em Campos et al. 2011 quando observaram que *T. cruzi* hemi-nocaute para MSH2 ocorre aumento de geração de 8oxoG na mitocôndria e não no núcleo. Quando observados células de camundongos deficientes em MSH2 e MTH1, a taxa de transição GC→TA nuclear aumentou 33x, e inserção de 1pb em 140x, ambos comparado com camundongo deficiente apenas em MTH1 (EGASHIRA et al., 2002; CAMPOS,

PRISCILA C et al., 2011). Ni et al. (1999) demonstraram que células de levedura nocautes em OGG1 (DNA glicosilase envolvida na remoção de 8oxoG do par 8oxoG:A) a taxa de mutação GC→TA foi 35x maior que células selvagens. Porém, diante deleção combinada entre MSH2 ou MSH6 com OGG1, a taxa de mutação foi 140 a 218x maior que células selvagens (NI et al., 1999). Em bactérias deficientes para MutH, mutações induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sequências microsatélites em plasmídeo construídos com repetições mono ou dinucleotídicas mostraram mudanças na fase de leitura de modo a impedir a expressão do gene da B-lactamase no qual foram inseridas. Por outro lado, sequências não-repetitivas não sofreram mutações que alteraram a fase de leitura. O sequenciamento da região de inserção e mais cem bases antes e depois demonstraram apenas mutação na sequência repetitiva. A frequência de mudança de fase de leitura aumentou 50 vezes quando incubado com 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em contraste, não foi detectado aumento de frequência de mutação em plasmídios contendo sequências não repetitivas de mesmo comprimento e janela de leitura (JACKSON et al., 1998). No presente trabalho duas regiões foram sequenciadas, o microsatélite mitocondrial Amx2 e a região intergênica mitocondrial. Diferente de Jackson et al. 1998, Egashira et al. 2002 e Ni et al. 1999, no qual observaram mutação dentro da região repetitiva, não observamos mutação dentro da região repetitiva do microsatélite mitocondrial e nem na região em torno da repetição. Já em semelhança com Jackson et al. 1998, fora da região repetitiva, na região intergênica também não observamos mutação nas cepas testes (deficientes em MMR ou selvagem tratadas ou não tratadas) e controle (deficientes em MMR ou selvagem não tratadas).

Através de análise imunohistoquímica as proteínas MSH3, MSH6 e MLH1 não foram observadas em mitocôndria de fígado de rato e nem em mitocôndrias humanas. Ainda assim, a atividade de reparo na mitocôndria humana tem alta capacidade funcional mesmo em células deficientes de MSH2 diante de mal pareamento G:G e G:T. A atividade de MMR mitocondrial funciona separadamente de MMR nuclear e não envolve as proteínas conhecidas pelo MMR nuclear, porém o mecanismo continua eficiente (SOUZA-PINTO, DE et al., 2009). Utilizando extrato de mitocôndria de ratos Whistar para testar a capacidade de reparo das enzimas dessa organela, foi possível observar que há reparo eficiente de mal pareamento e IDL, porém não foi possível localizar a proteína MSH2. Curiosamente, a quantidade de sequências repetidas no DNAm é muito pequena, sugerindo que o reparo de mal pareamento (MMR) nessa organela não foi ou então é menos conservada. Como MSH3 e MSH6 são estáveis apenas na presença de MSH2, a enzima de reparo de IDL na mitocôndria é desconhecida e um homólogo mitocondrial deve ser importante para manter a integridade do genoma mitocondrial de mamíferos (MASON, P. A., 2003). Em *T. cruzi* também não foi possível fazer imunolocalização das proteínas de MMR na mitocôndria, porém argumentos importantes já foram gerados a respeito dos efeitos da ausência genes de MMR na estabilidade do genoma mitocondrial, tais como: maior geração de

8oxoG em diferentes haplogrupos de MSH2 menos eficientes de *T. cruzi* e perda de material genético mitocondrial em *T. brucei* deficientes no gene MSH2 (MACHADO-SILVA et al., 2008; SOUZA-PINTO, DE et al., 2009; CAMPOS, PRISCILA C et al., 2011). Todos os dados acima sugerem que o gene MSH2 pode ter um papel na estabilidade do material genético mitocondrial, mas pelas nossas análises, esse papel pode ser também realizado por outras vias e, assim, não fomos capazes de detectar instabilidade de microssatélite ou mutações no genoma mitocondrial de cepas deficientes no MSH2.

Estudos com camundongos deficientes em MSH2 (DEWEESE, 1998; EGASHIRA et al., 2002; RUSSO, M. T. et al., 2007) mostram uma redução no reparo de 8oxoG após exposição à radiação ionizante e aumento no nível desta lesão em diversos tecidos, indicando a participação de MSH2 na correção de danos oxidativos. Resultados obtidos por Colussi et al. (2002) em células de mamíferos sugerem que o MSH2 removeria 8oxoG inserido no DNA durante a replicação a partir do pool de nucleotídeos (e não proveniente da 8oxoG já presentes na fita de DNA) e que MSH2 e OGG1 (glicosilase que remove 8oxoG do par 8oxoG:C) atuam de maneira independente nesse processo (COLUSSI et al., 2002). Um estudo posterior (RUSSO, M. et al., 2004) reforça esses dados quando mostra que o fenótipo mutador de linhagens celulares MSH2 *-/-* ou MSH6 *-/-* é abolido pela superexpressão (50x) da proteína de MTH1, homólogo de MutT, que retira guaninas oxidadas do pool de nucleotídeos. Para *T. cruzi*, há maior geração de 8oxoG na mitocôndria quando um alelo de MSH2 é deletado (CAMPOS, PRISCILA C et al., 2011). Apesar de a presença de 8oxoG ser altamente mutagênica, não observamos nenhum tipo de mutação nas sequências analisadas.

Linfomas de Células B humanas deficientes em MSH2 demonstram clara instabilidade em pelo menos um *locus* microssatélite nuclear de vários testados, entre eles 4/12 repetições mononucleotídicas e 4/7 repetições dinucleotídicas (PELED; SELLERS, 2010). No presente trabalho observamos 4 *loci* com repetições mononucleotídicas, Amx2 (A<sub>9</sub>, mitocondrial), ATT14 (T<sub>13</sub>, nuclear) e SCLE10 (A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> e um motivo TG<sub>9</sub>, nuclear), e MCLG10 (A<sub>16</sub>), e 2 *loci* dinucleotídicos MCLF10 (CA<sub>14</sub>) e MCLE05 (TC<sub>9</sub>), e nenhum mostrou instabilidade em 50 gerações, mesmo na ausência de MMR. Além de MSH2-MSH6 também terem papel de remover A do par 8oxoG:A, em levedura MSH1 tem efeito similar na mitocôndria diante nocaute de ogg1, reduzindo taxa de mutação do tipo transição. Ao observar o aumento das taxas de mutações geradas pela deleção de Ogg1, a superexpressão de MSH1 foi capaz de diminuir essa alta taxa de mutação, sobretudo de CG→TA em mitocôndria de *Saccharomyces cerevisiae*. Isso demonstra o efetivo papel de MSH1 na mitocôndria (DZIERZBICKI et al., 2004). Linhagens MSH1 $\pm$  apresentam alta taxa de mutação em repetições GT comparado com AT numa construção de gene repórter em mitocôndria de levedura. Quando a mesma comparação foi feita

em sequências nucleares a diferença na taxa de mutação não foi observada. A falta de instabilidade de tipo AT pode indicar que a DNA polimerase  $\gamma$  tem uma menor taxa de geração de alças de poli AT (SIA; BUTLER, 2000). No genoma de *T. brucei* e *T. cruzi* não foi observado um homólogo para MSH1 (EL-SAYED et al., 2005), o qual é responsável por estabilidade do DNAm em leveduras.

Ao considerar a taxa de mutação de repetições mononucleotídicas no DNA nuclear, Grag 2002 pode observar que a geração de IDL em sequências 10C/10G são 100x mais frequentes que 10A/10T em células selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Já em células deficientes em MSH2, MLH1 ou PMS1 a taxa de mutação em 10C/10G aumentou centenas de vezes comparado a selvagem, enquanto nas sequências 10A/10T a mutação aumentou em milhares de vezes, sugerindo MMR mais eficiente em remover IDL 10A/10T do que 10C/10G (GRAGG, 2002). CL Brener deficiente para MSH2, nas condições deste trabalho, não apresentou instabilidade nos 4 *loci* com repetições mononucleotídicas observados (Amx2, ATT14, SCLE10, MCLG10).

Russo et al. (2004) fizeram uma observação muito interessante em fibroblasto embrionário de ratos deficientes para MSH2. A taxa de mutação ( $3,1 \times 10^{-6}$ ) para essa célula deficiente é 25 vezes maior que a selvagem. Ao superexpressar hMTH1 (enzima que limpa o pool de nucleotídeos oxidados) em torno de 10x, a taxa de mutação para célula MSH2<sup>-/-</sup> passa para  $1,4 \times 10^{-6}$ . O aumento em 50x na expressão de hMTH1 reduz a taxa de mutação muito próxima ao selvagem ( $0,18 \times 10^{-6}$ ). Esses dados sugerem que uma porção substancial de mutações surgidas a partir de linhagem MSH2<sup>-/-</sup> é prevenido apenas pelo saneamento do pool de dNTP. Essa é uma alternativa para os resultados vistos nesse trabalho se considerarmos que não observamos mutação ou instabilidade de microssatélites se julgarmos que outras vias, como Sistema GO (MTH) faça sanitização suficiente e BER aja eficientemente, pelo menos em curto período de tempo. A expressão aumentada em 50x de hMTH1 em células deficientes MSH2 anula o fenótipo associado com deficiência a MSH2. Incorporação de dNTP oxidado é portanto o maior contribuidor para o fenótipo MSH2<sup>-/-</sup> mutador em fibroblasto embrionário de ratos (RUSSO, M. et al., 2004). Entretanto, é curioso verificar que a ausência do MSH2 em *T. cruzi* leva a uma maior sensibilidade ao tratamento com peróxido de hidrogênio (CAMPOS, et al., 2011). Essa morte pode estar relacionada com a ativação de algumas enzimas do BER, pois já foi mostrado que a superexpressão da enzima OGG1 é capaz de levar a uma maior sensibilidade ao tratamento com peróxido de hidrogênio (FURTADO et al., 2012). Uma outra via de reparo que pode estar envolvida com a estabilidade do DNA na ausência do MMR é a recombinação. Dados de nosso grupo mostram que cepas deficientes no gene RAD51 são mais sensíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio e poderiam estar atuando no reparo das

quebras geradas por este agente. Será interessante verificar se essas modificadas apresentam alguma instabilidade nos microssatélites nucleares.

Em células humanas mutantes para MSH6 a taxa de mutação espontânea reduz 2,6x quando ocorre superexpressão de hMTH1. Em dois marcadores como repetição mononucleotídica A<sub>n</sub> ocorreu um comportamento curioso: no marcador BAT26 houve redução de 44% de MSI para 15% em célula superexpressando, enquanto que com marcador BAT25 a taxa de mutação (24%) manteve-se igual em célula selvagem e em célula deficiente expressando hMTH (RUSSO, M. et al., 2004). Diferente de Russo et al. (2004), nesse trabalho, não houve mudança na taxa de mutação na mitocôndria e nem instabilidade de microssatélite mitocondrial e nuclear para células CL Brener heminocautas para MSH6, porém estudos devem ser realizados em células duplamente nocautas para MSH6 para compreender o papel deste gene.

Análises da sequência gênica de TcMSH2 mostraram a existência de três distintas isoformas da proteína, denominadas TcMSH2A, B e C, codificadas pelo genoma de cepas Tc I, III e II respectivamente. Análises dos diferentes grupos mostraram haver distinta atividade enzimática, levando a variação na eficiência de MMR em *T. cruzi*. Diante estresse oxidativo induzido (600 µM de peróxido de hidrogênio), apenas Colombiana (que possui a isoforma TcMSH2a) não mostrou instabilidade de microssatélite nuclear, ao mesmo tempo que apresentou maior sensibilidade ao tratamento com menor taxa de sobrevivência. Por outro lado, o locus MCLE01 mostrou um padrão sugestivo de instabilidade de microssatélite para JG (TcMSH2c) e para CL Brener (TcMSH2b e TcMSH2c, uma cepa híbrida). A melhor explicação para a indução de instabilidade de microssatélite por tratamento de peróxido de hidrogênio é que lesões oxidativas não reparadas, como quebras de fita-simples, aumentam a frequência de derrapagem da enzima polimerase quando a lesão está presente na fita molde durante a replicação. No mesmo trabalho, após 5 dias de tratamento com cisplatina (um composto que faz *crosslinks* intra e inter cadeia no DNA causando morte celular se não corretamente reparado e que é associado com diminuição na eficiência do MMR em células eucarióticas) as cepas JG e CL Brener (haplogrupo B e C, respectivamente) mostraram-se mais resistentes a várias concentrações da droga do que cepa Colombiana (haplogrupo A). Resultado semelhante observou-se com tratamento com agente MNNG, onde cepa Colombiana mostrou-se mais sensível a droga que as cepas JG e CL Brener (AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S., 2003). No caso apresentado aqui, uma dose de apenas 50 µM foi utilizada nas culturas, e diferente de Augusto Pinto et al. (2003), nossas culturas foram cultivadas por mais de 30 gerações, e mesmo assim instabilidade mitocondrial não foi observada. É possível que a geração de radicais livres tenha sido em quantidade baixa para observar o fenótipo e/ou outra via de reparo deve estar mantendo a replicação livre de mutações, o qual será discutido mais adiante.

Num estudo com microssatélites nucleares de *T. brucei* com culturas selvagens, MSH2+/- ou MSH2-/-/+ (células com MSH2 deletado reexpressando o gene), após ~25 gerações não houve variação no tamanho de microssatélites, porém em células MSH2-/- 4/5 *loci* mostraram mudança no tamanho das repetições em pelo menos um alelo em 10 clones examinados, e em alguns casos, metade ou mais dos alelos tiveram mudança de tamanho. Em linhagens MLH1 mutantes 3 *loci* foram analisados, MLH1+/- não mostrou alteração nos alelos analisados enquanto que MLH1-/- mostraram alteração em todas as linhagens testadas para pelo menos 2 *loci* em cada uma. No mesmo trabalho, observou-se a taxa de sobrevivência dessas linhagens celulares diante composto MNNG, um agente alquilante que metila o oxigênio 6 da guanina, gerando O6-metilguanina, o qual pode parear errado com timina durante a replicação. Células tratadas com esse composto mostram baixa taxa de sobrevivência mesmo em baixas doses, por outro lado ocorre uma resistência gradual para célula MSH2+/- e MSH2-/- e uma resistência gradual também para MLH1+/- e MLH1-/. Esses dados indicam que a inativação de MSH2 ou MLH1 em *T. brucei* resultam em taxas aumentadas de variação de repetição de microssatélite e aumento a tolerância a MNNG, mostrando que o parasita possuiu um sistema MMR ativo em reparar erros que surgem durante replicação e em resposta a dano químico induzido (BELL et al., 2003). Diferente de *T. cruzi*, *T. brucei* cultivado por 25 gerações sem tratamento foi passível de observar instabilidade nuclear. Nesse trabalho não foi possível observar instabilidade de microssatélites nuclear e mitocondrial, com exceção do *locus* SCLE11. Nesse *locus*, especialmente, foi observado instabilidade na cepa MSH2 heminocaute, e não em outras. Entretanto, a análise da geração zero (pré-experimento) constatou que esse *locus* já vinha instável antes de ocorrer o tratamento, e a hipótese sugerida, como já discutida acima, é que a instabilidade ocorreu durante os 4 anos de repique que a cepa sofreu desde a data de sua geração em laboratório, sendo que as cepas MSH2-/- e MSH6 +/- são mais recentes e, portanto, terem menos tempo para ocorrer o evento de instabilidade.

Diferente dos resultados de Campos et al. (2011), com TbMSH2 -/- demonstrando perda mitocondrial e maior acúmulo de 8oxoG na mitocôndria, não foi possível observar mudança no microssatélite observado nem em sequência de região intergênica mitocondrial. Isso pode nos levar a pensar que outra via de reparo pode estar ocorrendo de forma a sobrepor os substratos de via MMR, ou seja, as IDL's e mal pareamentos. O que de fato pode ser possível, pois Souza-Souza-Pinto et al. (2009) demonstraram em células eucarióticas (humanas) atividade de reparo e ligação a mal pareamentos não dependente de fatores MMR nucleares clássicos (MSH2, MSH6, MLH1). Em linhagens celulares humanas deficientes em fatores de MMR e expressão depletada de YB-1 mostrou significativa redução de atividade de reparo de substratos de MMR e mais importante, aumento de metagênese de mtDNA, implicando essa proteína em prevenção

de mutação, enquanto que a expressão reduzida de YB-1 resultou em diminuição de respiração celular, sugerindo mal funcionamento mitocondrial (SOUZA-PINTO, DE et al., 2009; CAMPOS, PRISCILA C et al., 2011).

É importante verificar que tanto *T. cruzi* quanto *T. brucei* apresentam um homólogo ao gene YB-1. Em colaboração com o grupo do Professor Richard McCulloch (Universidade de Glasgow), verificamos que cepas de *T. brucei* deficientes no gene homólogo ao YB-1 são mais sensíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Quando um gene de *Schistosoma mansoni* homólogo ao gene YB-1 (SmYB-1) era expresso na cepa de *T. brucei* deficiente, a proteína de *S. mansoni* era capaz de complementar a sensibilidade ao tratamento com peróxido de hidrogênio. O mesmo fenótipo era verificado quando o gene SmYB-1 era expresso em uma cepa de *T. brucei* deficiente no gene MSH2, ou seja, ele era capaz de complementar a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio da cepa MSH2 deficiente. Entretanto, o dado mais curioso foi a sensibilidade aumentada ao peróxido de hidrogênio de cepas selvagens que expressava o gene SmYB-1, ou seja, em células selvagens a expressão da proteína heteróloga interferia nos mecanismos de reparo que eram realizados pelas proteínas MSH2 e o homólogo de YB-1 de *T. brucei*. Esses dados sugerem que vias complementares estão atuando para manter a estabilidade do material genético mitocondrial em Tripanosomatídeos.

A ausência de estabilidade de microssatélites em cepas deficientes no MMR em *T. cruzi* é um dado singular em toda a literatura e pode sugerir que esse organismo adota outras estratégias para manter a estabilidade genômica. Novos estudos serão realizados para entendermos qual o real papel do MMR nesse organismo e quais poderiam ser as outras vias que atuam em associação com o MMR para manter a estabilidade do material genético.

## CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi possível verificar que o *Trypanosoma cruzi* apresenta uma alta estabilidade de microssatélites mitocondriais e nucleares, mesmo após o tratamento com baixas doses de água oxigenada. Os genes MSH2 e MSH6 do reparo de erro de pareamento apresentam uma atividade marginal na manutenção da estabilidade verificada. Será importante verificar quais vias de reparo podem estar atuando no *T. cruzi*, em conjunto com o reparo de erro de pareamento, para manter a estabilidade do genoma.

## REFERÊNCIAS

ALVINO, E.; MARRA, G.; PAGANI, E. High-frequency microsatellite instability is associated with defective DNA mismatch repair in human melanoma. **Journal of investigative ...**, v. 118, n. 1, p. 79–86, 2002. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/jid/journal/v118/n1/abs/5601363a.html>>. Acesso em: 11/8/2012.

ANDRADE, L. O.; GALVÃO, L. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Memórias do Instituto ...**, v. 105, n. 6, p. 834–837, 2010. SciELO Brasil. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000600018&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000600018&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11/8/2012.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and ...**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S01668519990035X>>. Acesso em: 11/8/2012.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C. R. S. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental ...**, v. 100, n. 4, p. 269–275, 2002. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489402000243>>. Acesso em: 11/8/2012.

ANDRADE, LUCIANA O; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–23, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1249>>. Acesso em: 1/8/2012.

ARAÚJO, A. B.; CASTAGNO, V. D.; GALLINA, T.; AIRES, E. Prevalência da doença de Chagas em gestantes da região sul do Rio Grande do Sul Prevalence of Chagas disease among pregnant women in the southern region of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 732–733, 2009.

AUGUSTO-PINTO, L.; BARTHOLOMEU, D. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 272, n. 1-2, p. 323–33, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470539>>. Acesso em: 11/8/2012.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 117–126, 2003. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/164/1/117.short>>. Acesso em: 11/8/2012.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F. M. DA; et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 9, n. 12, p. 1319–26, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598264>>. .

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. 159–173, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03804.x>>. Acesso em: 11/8/2012.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 573–80, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/8/2012.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 416–22, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020726>>. Acesso em: 20/7/2012.

BOITEUX, S.; GELLON, L.; GUIBOURT, N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. **Free radical biology & medicine**, v. 32, n. 12, p. 1244–53, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057762>>. Acesso em: 11/8/2012.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2nd ed. Guanabara Koogan, 2000.

BRENIÈRE, S. F.; MOROCHI, W.; BOSSENO, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. **Acta tropica**, v. 71, n. 3, p. 269–83, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879736>>. .

BROOKS, A. J. **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

BUERMEYER, A. Mammalian DNA mismatch repair. **Annual review of ...**, 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.genet.33.1.533>>. Acesso em: 11/8/2012.

CAMPOS, PRISCILA C; SILVA, V. G.; FURTADO, C. et al. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 176, n. 1, p. 8–16, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3142612&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21/12/2012.

CANNAVO, E.; MARRA, GIANCARLO; SABATES-BELLVER, J. et al. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. **Cancer research**, v. 65, n. 23, p. 10759–66, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322221>>. Acesso em: 17/7/2012.

CHAGAS, C. Chagas, nova tripanozomíase humana Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. ,1909.

CHI, N. W.; KOLODNER, R. D. Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29984–92, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961998>>. Acesso em: 16/8/2012.

COHEN, H.; DANIN-POLEG, Y.; COHEN, C. Mono-nucleotide repeats (MNRs): a neglected polymorphism for generating high density genetic maps in silico. **Human genetics**, v. 115, n. 3, p. 213–20, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232733>>. Acesso em: 22/8/2012.

COLUSSI, C.; PARLANTI, E.; DEGAN, P. et al. Removes DNA 8-oxodGMP Incorporated from the Oxidized dNTP Pool. , v. 12, n. 02, p. 912–918, 2002.

COURA, J. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762007000900018&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762007000900018&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11/8/2012.

COURA, JOSÉ RODRIGUES. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , n. August, p. 113–22, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992371>>. .

CULLIGAN, K. Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. **Nucleic acids ...**, v. 28, n. 2, p. 463–71, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16/8/2012.

DAMIA, G.; D'INCALCI, M. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 43, n. 12, p. 1791–801, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588740>>. Acesso em: 11/8/2012.

DEGTYAREVA, N. Caenorhabditis elegans DNA mismatch repair gene msh-2 is required for microsatellite stability and maintenance of genome integrity. **Proceedings of the ...**, v. 99, n. 4, p. 2158–63, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/4/2158.short>>. Acesso em: 11/8/2012.

DEWEESE, T. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Proceedings of the ...**, v. 95, n. 20, p. 11915–20, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11/8/2012.

DIAS, C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do trypanosoma cruzi no brasil routes for transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil. , p. 68–72, 2011.

DOCAMPO, R.; SOUZA, W. DE. Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. **Nature Reviews ...**, v. 3, n. 3, p. 251–61, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738951>>. Acesso em: 10/8/2012.

DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M.; MALC, E.; CIESLA, Z. Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae: involvement of the MSH1-dependent pathway. **DNA repair**, v. 3, n. 4, p. 403–11, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010316>>. Acesso em: 25/8/2012.

ECKERT, K. A.; HILE, S. E. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. **Molecular carcinogenesis**, v. 48, n. 4, p. 379–88, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10/8/2012.

EGASHIRA, A.; YAMAUCHI, K.; YOSHIYAMA, K. et al. Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. **DNA repair**, v. 1, n. 11, p. 881–93, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531017>>. Acesso em: 11/8/2012.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, DANIELLA C; et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>>. Acesso em: 17/7/2012.

EPPLEN, T.; AKKARD, A. D. Microsatellites. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. p.1–4, 2011.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–91, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599990>>. Acesso em: 15/8/2012.

FERNANDES, E. R. D. Q. G. D. S. E. **Instabilidade de microssatélites por técnicas de biologia molecular em amostras de pacientes jovens com carcinoma colorretal processadas rotineiramente para diagnóstico anátomopatológico** Patologia, 2007. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

FERNANDES, O; SANTOS, S.; JUNQUEIRA, A; et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 195–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677714>>. .

FERNANDES, O; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A; et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 807–11, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660469>>. .

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica ...**, p. 61–68, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42301997000100014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42301997000100014&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11/8/2012.

FREITAS, J.M. DE; AUGUSTO-PINTO, LUIZ; PIMENTA, J.R. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24, 2006.

FRIEDBERG, E. C. .; WALKER, G. C.; SIEDE, W. **DNA Repair and Mutagenesis**. Washington, DC: SM Press, 1995.

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, n. c, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11/8/2012.

FURTADO, C.; KUNRATH-LIMA, M.; RAJÃO, M. A. et al. Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. (S. Korolev, Ed.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42484, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042484>>. Acesso em: 3/8/2012.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I. A. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936–939, 2003.

GEIERSBACH, K. B.; SAMOWITZ, W. S. Microsatellite instability and colorectal cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 10, p. 1269–77, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970482>>. Acesso em: 17/7/2012.

GRAGG, H. Base composition of mononucleotide runs affects DNA polymerase slippage and removal of frameshift intermediates by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular ...**, v. 22, n. 24, p. 8756–8762, 2002. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/22/24/8756.short>>. Acesso em: 22/8/2012.

GRYNBERG, P.; PASSOS-SILVA, D. G.; MOURÃO, M. D. M. et al. Trypanosoma cruzi gene expression in response to gamma radiation. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e29596, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256153&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/7/2012.

GUEDES, P. M. M.; VELOSO, V. M. Trypanosoma cruzi high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagledogs. **Memórias do Instituto ...**, v. 102, n. 2, p. 141–7, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0074-02762007000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0074-02762007000200003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 10/8/2012.

GUPTA, S.; WEN, J.-J.; GARG, N. J. Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 190354, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2696642&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/7/2012.

HABANO, W; NAKAMURA, S; SUGAI, T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. **Oncogene**, v. 17, n. 15, p. 1931–7, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788436>>. .

HABANO, WATARU; SUGAI, TAMOTSU; NAKAMURA, SI. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. **Gastroenterology**, p. 835–841, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508500701697>>. Acesso em: 21/8/2012.

HAJDUK, S.; OCHSENREITER, T. RNA editing in kinetoplastids. **RNA biology**, v. 7, n. 2, p. 229–36, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220308>>. Acesso em: 15/8/2012.

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**, v. 8, n. 6, p. 739–51, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/7/2012.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–74, 2001. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35077232>>. Acesso em: 15/7/2012.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 31-32, p. 5787–99, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759763>>. Acesso em: 25/7/2012.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A. et al. NIH Public Access. , v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2006.

IYER, R.; PLUCIENNIK, A. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem ...**, v. 106, n. 2, p. 302–23, 2006. Disponível em: <[http://www-lehre.img.bio.uni-goettingen.de/Vorlesung\\_SS\\_2007/Kramer/pdf/mismatch\\_repair\\_review.pdf](http://www-lehre.img.bio.uni-goettingen.de/Vorlesung_SS_2007/Kramer/pdf/mismatch_repair_review.pdf)>. Acesso em: 11/8/2012.

JACKSON, A. L.; CHEN, R.; LOEB, L.A. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12468, 1998. National Acad Sciences.

KADYROV, F. A.; DZANTIEV, L.; CONSTANTIN, N.; MODRICH, PAUL. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 297–308, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873062>>. Acesso em: 17/7/2012.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: a proposal. **Biological research**, v. 43, n. 3, p. 307–16, 2010.

KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, PAUL T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4333–4, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=384744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

KOIDE, R.; KOBAYASHI, S. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? **Human molecular ...**, v. 8, n. 11, p. 2047–53, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484774>>. Acesso em: 17/8/2012.

LAURA, R. The *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10 strain maxicircle sequence: the third musketeer. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 58, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.doaj.org/doaj?func=abstract&id=702698>>. Acesso em: 23/8/2012.

LEVINSON, G.; GUTNAN, G. A. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escheychia coli* K-12. , v. 15, n. 13, p. 5323–5338, 1987.

LING, X.-L.; FANG, D.-C.; WANG, R.-Q.; YANG, S.-M.; FANG, L. Mitochondrial microsatellite instability in gastric cancer and its precancerous lesions. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 10, n. 6, p. 800–3, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040020>>. .

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363–9, 2005. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471-4922\(05\)00169-8](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471-4922(05)00169-8)>. Acesso em: 11/8/2012.

LOEB, LAWRENCE A. A Mutator Phenotype in Cancer. **Cancer Research**, p. 3230–3239, 2001.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Memórias do Instituto ...**, v. 99, n. 1, p. 1–12, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762004000100001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762004000100001&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11/8/2012.

MACHADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. ... **Research/Reviews in ...**, v. 612, n. 1, p. 40–57, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574205000414>>. Acesso em: 21/8/2012.

MACHADO-SILVA, A.; TEIXEIRA, SANTUZA M R; FRANCO, GLÓRIA R; et al. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262734>>. Acesso em: 19/7/2012.

MACPHERSON, P.; BARONE, F.; MAGA, G. et al. 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutSalpha. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 16, p. 5094–105, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1233161&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/7/2012.

MASON, P. A. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 1052–1058, 2003. Disponível em: <<http://www.nar.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkg167>>. Acesso em: 14/8/2012.

MAZUREK, A.; BERARDINI, M.; FISHEL, R. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8260–6, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756455>>. Acesso em: 17/7/2012.

MENEZES, C.; COSTA, G. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug development research**, v. 72, n. 6, p. 471–479, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267887>>. Acesso em: 11/8/2012.

MILES, M. A; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D. et al. The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509–28, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691868>>. Acesso em: 10/8/2012.

MIR, L. Genômica: Ciências da Vida. (L. Mir, Ed.), p. 1114, 2004. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Genômica:+Ciências+da+vida#0>>. Acesso em: 11/8/2012.

MIRKIN, S. M. Expandable DNA repeats and human disease. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 932–40, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581576>>. Acesso em: 12/7/2012.

MODRICH, P; LAHUE, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. **Annual review of biochemistry**, v. 65, p. 101–33, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811176>>. Acesso em: 11/8/2012.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C. et al. Host cell actin remodelling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **MOLECULAR MECHANISMS OF PARASITE INVASION**, 2008. Springer New York.

NI, T. T.; MARSISCHKY, G. T.; KOLODNER, R. D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. **Molecular cell**, v. 4, n. 3, p. 439–44, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518225>>. .

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A M. et al. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3776–80, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

OWCZARZY, R.; TATAUROV, A. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids ...**, v. 36, n. April, p. 163–169, 2008. Disponível em: <[http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl\\_2/W163.short](http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl_2/W163.short)>. Acesso em: 24/8/2012.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatologic clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095528>>. Acesso em: 11/8/2012.

PASSOS-SILVA, D. G.; RAJÃO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, p. 840768, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2952945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/7/2012.

PELED, J.; SELLERS, R. Msh6 protects mature B cells from lymphoma by preserving genomic stability. **The American journal of ...**, v. 177, n. 5, p. 2597–608, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2966815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/8/2012.

PIMENTA, JULIANA RAMOS; MACEDO, ANDREA MARA; PENA, SERGIO DANILO. **Análises filogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA**, 2002. Universidade Federal de Minas Gerais.

PINTO, L. A. **Geração de Variabilidade Genética do *Trypanosoma cruzi* na Doença de Chagas: Um Modelo Baseado no Estudo do Reparo de Erros de Pareamento do DNA**, 2004. Universidade Federal de Minas Gerais.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RAJÃO, M. DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination. **Molecular ...**, v. 71, n. 1, p. 185–97, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2008.06521.x/full>>. Acesso em: 11/8/2012.

RICHARD, G.-F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 4, p. 686–727, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2593564&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/7/2012.

RUSSO, M.; BLASI, M.; CHIERA, F. The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. ... **and cellular biology**, v. 24, n. 1, p. 465–474, 2004. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/24/1/465.short>>. Acesso em: 25/8/2012.

RUSSO, M. T.; LUCA, G. DE; DEGAN, P.; BIGNAMI, M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. **Mutation research**, v. 614, n. 1-2, p. 69–76, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769088>>. Acesso em: 11/8/2012.

SALA, M. Efecto de la infección aguda por diferentes cepas de Trypanosoma cruzi sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón. **Parasitología ...**, v. 61, n. 1-2, p. 69 – 73, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-77122006000100010&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-77122006000100010&script=sci_arttext&lng=pt)>. Acesso em: 11/8/2012.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 2001.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365–71, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072791>>. Acesso em: 11/8/2012.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 2, p. 211–5, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=310356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/8/2012.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 579–608, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527292>>. Acesso em: 20/7/2012.

SHAPIRO, T A.; KLEIN, V. A.; ENGLUND, P T. Isolation of kinetoplast DNA. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 94, p. 61–7, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j2130v1733475555/>>. Acesso em: 16/8/2012.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 117–43, 1995. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.mi.49.100195.001001>>. Acesso em: 10/8/2012.

SHOKAL, U.; SHARMA, P. C. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 5, p. 599–613, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3401689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SIA, E.; BUTLER, C. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae. **Proceedings of the ...**, v. 97, n. 1, p. 250–5, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15/8/2012.

SIA, E.; DOMINSKA, M. Isolation and characterization of point mutations in mismatch repair genes that destabilize microsatellites in yeast. **Molecular and cellular ...**, v. 21, n. 23, p. 8157–8167, 2001. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/21/23/8157.short>>. Acesso em: 11/8/2012.

SILVA, C. F. T. DA; MACHADO, CARLOS RENATO; TEIXEIRA, SANTUZA MARIA RIBEIRO. **Reparo de DNA em dois patógenos humanos: caracterização do gene IMP4 de Schistosoma mansini e estudos acerca do MMR, Sistema GO e taxa de mutação em Trypanosoma cruzi**, 2009. Universidade Federal de Minas Gerais.

SLUPPHAUG, G. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p. 231–251, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510703001738>>. Acesso em: 13/7/2012.

SOUZA, W. Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269–85, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366>>. Acesso em: 10/8/2012.

SOUZA, W. Structural organization of Trypanosoma cruzi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, n. May, p. 89–100, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753463>>. Acesso em: 10/8/2012.

SOUZA, W.; CAVALCANTI, D. P. DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: a review. **Trends in Cell and Molecular Biology**, ..., p. 89–104, 2007. Research Trends. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20093054529.html;jsessionid=9988895E89A2FDE7E26DE9DBA8C1E1A4>>. Acesso em: 10/8/2012.

SOUZA-PINTO, N. C. DE; MASON, P. A.; HASHIGUCHI, K. et al. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. **DNA repair**, v. 8, n. 6, p. 704–19, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2693314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/8/2012.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, n. 6443, p. 274–6, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8371783>>. Acesso em: 11/8/2012.

STUART, K.; FEAGIN, J. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. **International Review of Cytology**, v. 141, n. null, p. 65–88, 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62063-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62063-X)>. Acesso em: 10/8/2012.

THIBODEAU, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5109, p. 816–9, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8484122>>. .

TIBAYRENC, M; WARD, P.; MOYA, A; AYALA, F. J. Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115–9, 1986. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=322802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

TIBAYRENC, MICHEL. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998. Elsevier.

TOTH, G. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 967–981, 2000. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.10.7.967>>. Acesso em: 18/7/2012.

UMAR, A; KUNKEL, T. A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 238, n. 2, p. 297–307, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681938>>. .

VALADARES, H. M. S.; PIMENTA, JULIANA RAMOS; FREITAS, JORGE MARCELO DE; et al. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 7, p. 839–50, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154957>>. Acesso em: 22/10/2012.

VIGUERA, E.; CANCEILL, D.; EHRLICH, S. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. **The EMBO journal**, v. 20, n. 10, p. 2587–95, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/8/2012.

WATERS, L. S.; MINESINGER, B. K.; WILTROUT, M. E. et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 73, n. 1, p. 134–54, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11/8/2012.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC genomics**, v. 7, p. 60, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1559615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/7/2012.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet No. 340. 2010. **World Health Organization website**, 2010. Disponível em: <[http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Chagas+disease+\(American+trypanosomiasis\)+Fact+Sheet+No.+340#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Chagas+disease+(American+trypanosomiasis)+Fact+Sheet+No.+340#0)>. Acesso em: 11/8/2012.

Who, how, what and where? **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S8–9, 2010. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09222>>. Acesso em: 16/8/2012.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 3, p. 384–92, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230539>>. Acesso em: 11/8/2012.

WIND, N. DE; DEKKER, M.; BERNIS, A.; RADMAN, M.; RIELE, H. TE. Inactivation of the mouse *Msh2* gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 321–30, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628020>>. Acesso em: 11/8/2012.

WIND, N. DE; HAYS, J. B. Mismatch repair: praying for genome stability. **Current biology : CB**, v. 11, n. 14, p. R545–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509249>>. Acesso em: 11/8/2012.

WYRZYKOWSKI, J.; VOLKERT, M. R. The Escherichia coli Methyl-Directed Mismatch Repair System Repairs Base Pairs Containing Oxidative Lesions. , v. 185, n. 5, p. 1701–1704, 2003.

ZIENOLDDINY, S.; RYBERG, D.; HAUGEN, A. Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines development. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1521–1526, 2000.

ZINGALES, B; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S. et al. 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. 1051–4, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>>. .

ZINGALES, B; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H. et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 105–12, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504338>>. .

## ANEXOS

Sequências dos iniciadores desenvolvidos neste trabalho

Iniciador	Sequência 5'→3'
Amx1Fw	5' TTATGAGAAAATAATTTTCGTTATACTTAATATC 3'
Amx1Rv	5'CATTTAATCTATAGTATAAGTCTGTGTATTC 3'
Amx2Fw	5' GAGATCAAATAAATTAATAATATCAAAAAATAATG 3'
Amx2Rv	5' CAATCTATTGGATTTTGAGTAGTTAGACTTC 3'
Tmx1Fw	5' GGTCTATTCTTCACATTTAATATCATATTTTGTACG 3'
Tmx1Rv	5' CAATTACAAATAAACAACGTATTACAAAA 3'
Tmx2Fw	5' GGATTTTATTGTTTCATAATTATATTAGGGTTAA 3'
Tmx2Rv	5' CAGAATATATAATTTATCAGAAAAGATATTAATCC 3'
EsmMitFwM13tail	5' GTTTTCCCAGTCACGACGAAAGAACAAGAAAGGAGAGAGAGG 3'
EsmMitFw	5' GAAAGAACAAGAAAGGAGAGAGAGG 3'
EsmMitRv	5' CTTTATAAAAGTTTTTTGCTTACTAACACAACCTTAG 3'