

ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA

TESE DOUTORADO

**O Papel de Proteínas da Família Y-box de  
Parasitas na Resposta ao Estresse Oxidativo**



Belo Horizonte, Abril de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**O Papel de Proteínas da Família Y-box de Parasitos na  
Resposta ao Estresse Oxidativo**

Elizângela Almeida Rocha

**Orientadora:** Dra. Glória Regina Franco

**Co-orientadores:** Dra. Marcela Drummond

Dr. Carlos Renato Machado

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Belo Horizonte, Abril de 2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, responsável maior pelas minhas conquistas.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Fapemig, pela oportunidade e pela concessão da bolsa de estudos e pela oportunidade de fazer o doutorado sanduíche, experiência única em minha vida.

À *University of Glasgow* por permitir que eu desenvolvesse o meu projeto de doutorado sanduíche, onde obtive excelentes resultados.

À professora Glória Regina Franco, pelas valiosas colaborações e sugestões para o desenvolvimento desse trabalho, pelo incentivo, pelos conselhos, pela paciência, pelos puxões de orelha. Pela preocupação, enfim pelo enorme carinho, jamais terei palavras suficientes para agradecer tudo o que ela fez e faz por mim.

Ao prof. Carlos Renato Machado (Nem), pela oportunidade, respeito, apoio, confiança, pelas várias cobranças e por toda a empolgação com os resultados quando eu não acreditava que eles poderiam representar alguma coisa.

À Dra. Marcela Drummond pelo apoio, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Genética Bioquímica (LGB), por ter me ensinado quase todas as técnicas que sei hoje em Biologia Molecular, pela paciência em me ensinar, pela confiança, pelo respeito, pelo apoio, pelos puxões de orelha nos momentos certos, por não ter me abandonado quando saí do LGB e nem quando eu fui para Glasgow, enfim obrigada por tudo.

À professora Andrea Mara Macedo por ter me acolhido e me apresentado ao LGB e por não ter me deixado desistir do doutorado sanduíche. Se eu atravessasse o oceano, com certeza a Andrea contribuiu para isso.

Ao professor Dawidson de Assis e ao professor Ronaldo Nagem, pelas valiosas colaborações e sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Richard McCulloch por me acolher em Glasgow, pela preocupação, pela enorme empolgação com os resultados e pela enorme paciência ao conversar comigo.

À banca por aceitarem participar desse momento importante da minha vida.

À Neuza pela preocupação e pela amizade super agradável. Por cuidar tão bem do LGB e como sempre digo, é uma peça fundamental para o bom funcionamento do laboratório.

À Celise, a Graziela e ao Orlando por conduzirem tão bem a secretaria, por trabalharem com eficiência tornando a parte burocrática menos dolorosa.

Aos alunos e ex alunos do LGB que contribuíram imensamente para o desenvolvimento desse trabalho, especialmente ao Heron, a Marianna Kunrath, ao Pedro e a Silvia que me ajudaram muito para a realização desse projeto. A Mainá pela imensa ajuda na submissão do paper. A Mariana Boroni, a Michele e a Isabela pela terceirização na extração do RNA. Ao Bruno por formatar as imagens obtidas do confocal. À Cíntia e a Dra Marina Mourão pelo fornecimento dos parasitos.

A minhas conhecidas, que se tornaram colegas e que hoje são grandes amigas, Michele (Flor 1), Mariana Costa (Flor 2), Marianna Kunrath (Babys), Mariana Boroni (Mari Bobs), Silvia, Isabela (Isa), Juliana (Ju), Pricila e Ceres, obrigada por me aguentarem, por ouvirem minhas reclamações, pelos conselhos, pelo carinho, por tornarem os meus dias agradáveis, enfim, obrigada por serem minhas grandes amigas, com certeza meus dias teriam sido muito mais difíceis se vocês não estivessem ao meu lado.

A Isa por tentar tornar a minha estadia em Glasgow menos dolorosa, ficando horas conversando comigo pela internet, pelas várias ajudas nos meus experimentos com interpretações e dicas para melhorar. A Ju por sempre ter uma solução para meus problemas e pelos valiosos conselhos. A Carol pela imensa amizade e por tornar os meus dias na UFMG super divertidos. Ao João Pedro pelas dicas de experimento, por ter sido um irmão e ter facilitado a minha vida em Glasgow, com certeza sem ele a minha adaptação não teria sido tão boa. A Viviane, minha mais recente amiga, por fazer alguns experimentos que não pude finalizar em Glasgow e pelas longas conversas pela internet.

Aos amigos que conheci em Glasgow, a Catarina, Andréa, Manuela, Karina, Rodrigo, Beck, Tehseen e a Juliana, que tornaram os meus dias agradáveis e quentes em uma cidade úmida, fria e chuvosa.

Aos meus pais, pela minha formação, razão da minha existência, pela confiança e por sempre acreditarem no meu potencial.

A minhas irmãs, Aleci e Rosângela, pela força, confiança em meu potencial, por aguentarem as minhas reclamações, meus momentos de estresse e sempre terem uma palavra de incentivo e carinho. Aos meus irmãos (César, Claudevan, Waldeir e Avanir) que, mesmo de longe, sempre torceram pelo meu sucesso, acreditando no meu potencial, e sempre com uma palavra de apoio e a mão estendida para me ajudar. A minhas cunhadas pelo apoio e carinho e aos meus sobrinhos simplesmente por existirem tornando os meus dias cada dia mais feliz.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Doenças tropicais negligenciadas .....	2
1.1.1 Esquistossomose e o <i>Schistosoma mansoni</i> .....	2
1.1.2 Tripanossomíase: família <i>Trypanosomatidae</i> .....	9
1.1.3 Genoma e expressão gênica em <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> .....	15
1.2 Reparo do DNA .....	17
1.3 Estresse Oxidativo .....	23
1.4 Proteínas da Família Y-box .....	24
1.4.1 Proteínas Y-box e a Regulação Gênica .....	26
1.4.2 Proteínas Y-box e o Reparo de DNA .....	28
1.4.3 A proteína SMYB1 .....	29
1.4.4 A proteína RBP16.....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivo Geral .....	35
2.2 Objetivos Específicos .....	35
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
3.1 Ensaio com o <i>S. mansoni</i> .....	37
3.1.1 Localização subcelular da proteína SMYB1 nas diversas fases do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> por ensaios de imunohistoquímica .....	37
3.2 Ensaio com o <i>T. cruzi</i> .....	38
3.2.1 Superexpressão da proteína SMYB1 em clones de <i>T. cruzi</i> heminocautes para o gene <i>MSH2</i> .....	38
3.2.2 Avaliação da expressão do gene SMYB1 em parasitos <i>T. cruzi</i> .....	43
3.2.3 Tratamento dos parasitos <i>T. cruzi</i> com diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio .....	44
3.2.4 Imunolocalização de SMYB1 nos diferentes clones de <i>T. cruzi</i> .....	45
3.3 Ensaio com o <i>T. brucei</i> .....	45
3.3.1 Expressão da proteína SMYB1 em <i>T. brucei</i> nocaute para o gene <i>MSH2</i> ....	45
3.3.2 Tratamento dos parasitos com diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio.....	50
3.3.3 Silenciamento do transcrito de RBP16 em <i>T. brucei</i> pelo mecanismo de RNA de interferência .....	51
3.3.4 Avaliação da expressão do gene RBP16 em <i>T. brucei</i> .....	53
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
4.1 A proteína SMYB1 se localiza no citoplasma celular em diversas fases do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> .....	57
4.2 Linhagem de <i>T. cruzi</i> superexpressando SMYB1 .....	60
4.3 Linhagens de <i>T. brucei</i> expressando a proteína SMYB1 .....	63
4.4 A proteína SMYB1 não afeta o crescimento das cepas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> .....	66
4.5 Efeito da proteína SMYB1 na sobrevivência dos parasitos <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> selvagens submetidos a estresse induzido por peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	68
4.6 SMYB1 é capaz de complementar a função desempenhada por MSH2 em <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> frente ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	70
4.7 Localização subcelular da proteína SMYB1 em cepas selvagens e heminocautes de <i>T. cruzi</i> .....	72

4.8 Silenciamento do transcrito de RBP16 em T. brucei pelo mecanismo de RNA de interferência.....	73
4.9 Linhagens de T. brucei contendo o vetor de indução do silenciamento de RBP16 .	74
4.10 Nível de expressão gênica de RBP16 e o efeito do seu silenciamento no crescimento T. brucei .....	74
4.11 Efeito de RBP16 na sobrevivência do parasito T. brucei frente ao tratamento com agentes genotóxicos.....	77
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>97</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição global da esquistossomose estimada para o ano 2010. ....	3
<b>Figura 2:</b> Distribuição da esquistossomose de acordo com o nível de prevalência no Brasil.....	3
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do ciclo de vida de parasitos do gênero <i>Schistosoma</i> . .....	5
<b>Figura 4:</b> <i>T. cruzi</i> e suas principais formas ao longo do ciclo de vida. ....	10
<b>Figura 5:</b> Ciclo do parasito <i>T. cruzi</i> . ....	12
<b>Figura 6:</b> Ciclo do parasito <i>T. brucei</i> . ....	14
<b>Figura 7:</b> Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências .....	19
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do sistema de reparo por erros de pareamento (MMR). ....	21
<b>Figura 9:</b> Modelo estrutural proposto para o domínio CSD da proteína SMYB1 de <i>S. mansoni</i> . ....	30
<b>Figura 10:</b> Localização da proteína SMYB1 nativa nos diversos estágios do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> por experimentos de imunohistoquímica. ....	58
<b>Figura 11:</b> A proteína SMYB1 nativa localiza-se no citoplasma de vermes adultos machos e fêmeas. de <i>S. mansoni</i> . ....	59
<b>Figura 12:</b> A proteína SMYB1 apresenta distribuição uniforme ao longo do corpo de vermes adultos machos e fêmeas de <i>S. mansoni</i> . ....	60
<b>Figura 13:</b> PCR de colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo pROCK-SMYB1. ....	61
<b>Figura 14:</b> PCR de DNA total extraído de cepas selvagens e nocautes de <i>T. cruzi</i> transfectadas com pROCK-SMYB1. ....	62
<b>Figura 15:</b> PCR de cDNA das cepas selvagens e heminocautes de <i>T. cruzi</i> transfectados com pROCK-SMYB1. ....	63
<b>Figura 16:</b> PCR de colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo pRM482-SMYB1. ....	64
<b>Figura 17:</b> PCR de DNA total extraído de cepas selvagens TbWT e nocautes TbMSH2 -/- de <i>T. brucei</i> transfectadas com pRM482-SMYB1. ....	65
<b>Figura 18:</b> PCR de cDNA das cepas selvagens e nocautes de <i>T. brucei</i> transfectadas com o vetor pRM482-SMYB1. ....	66
<b>Figura 19:</b> Curva de crescimento para verificar o efeito da expressão de SMYB1 em cepas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> . ....	67
<b>Figura 20:</b> Curva de crescimento de cepas de <i>T. cruzi</i> selvagem (TcWT) e transfectadas com os vetor vazio pROCKneo (TcWTpROCK). ....	68
<b>Figura 21:</b> Curva de sobrevivência dos parasitos <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> selvagens expressando SMYB1 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio. ....	69
<b>Figura 22:</b> Curva de sobrevivência dos parasitos <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> heminocaute e nocaute para MSH2 expressando SMYB1 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio. ....	71
<b>Figura 23:</b> Localização subcelular da proteína SMYB1 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por imunofluorescência. ....	73

<b>Figura 24:</b> . PCR em tempo real para verificar o nível de silenciamento do transcrito de RBP16 no parasito <i>T. brucei</i> . .....	<b>76</b>
<b>Figura 25:</b> Curva de crescimento para verificar o efeito do silenciamento de RBP16 em cepas <i>T. brucei</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 26:</b> Efeito do tratamento com cisplatina na sobrevivência do parasito <i>T. brucei</i> silenciado para RBP16. ....	<b>78</b>
<b>Figura 27:</b> Efeito do tratamento com MMS na sobrevivência do parasito <i>T. brucei</i> silenciado para RBP16.. ....	<b>79</b>
<b>Figura 28:</b> Efeito do tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na sobrevivência do parasito <i>T. brucei</i> silenciado para RBP16. ....	<b>80</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>8-oxoG</b>	7,8-diidro-8-oxoguanina
<b>Ago1</b>	Argonauta 1
<b>AP</b>	Apurínicos/apirimidínicos
<b>ASF/SF2</b>	<i>Serine arginine-rich (SR) proteins</i>
<b>BER</b>	Reparo por excisão de bases
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CDDP</b>	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina
<b>COI</b>	Citocromo oxidase
<b>CSD</b>	<i>Cold Shock Domain</i>
<b>CspA</b>	Proteínas de choque frio de <i>Escherichia coli</i>
<b>CspB</b>	Proteínas de choque frio de <i>Bacillus subtilis</i>
<b>CYb</b>	Apocitocromo b
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
<b>DSB</b>	<i>Double Strand Break</i>
<b>dsRNA</b>	RNA dupla-fita
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>eIF4F</b>	Fator 4F inicial da tradução em eucariotos
<b>EMSA</b>	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
<b>ESTs</b>	Etiquetas de Sequências Expressas
<b>gRNAs</b>	RNAs guias
<b>HLA-DRA</b>	<i>Class II histocompatibility antigen - DR alpha chain</i>
<b>HRR</b>	Reparo por recombinação homóloga
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>InDels</b>	Alças de inserção/deleção
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>LB</b>	<i>Luria Broth</i>
<b>LIT</b>	<i>Liver Infusion Tryptone</i>
<b>MBP</b>	<i>Maltose Binding Protein</i>
<b>MCF7</b>	<i>Michigan Cancer Foundation - 7</i>
<b>MDR</b>	<i>Multidrug resistance</i>
<b>MHCII</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II

<b>MMR</b>	Reparo de erros de pareamento de bases
<b>MMS</b>	Metilmetanosulfonato
<b>MNNG</b>	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
<b>MSH</b>	Homólogo de mutS em Eucariotos
<b>MOPS</b>	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
<b>MRP1</b>	<i>Multidrug resistance associated protein 1</i>
<b>MRP2</b>	<i>Multidrug resistance associated protein 2</i>
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>ND4</b>	Subunidade 4 desidrogenase do NADH
<b>NEIL1</b>	<i>Nei Endonuclease VIII-like 1</i>
<b>NEIL2</b>	<i>Nei Endonuclease VIII-like 2</i>
<b>NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeos
<b>NHEJ</b>	<i>Non-Homologous End Joining</i>
<b>NTHL1</b>	Proteína de ligação a endonuclease III
<b>OGG1</b>	7,8-diidro-8-oxoguanina DNA glicosilase
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PABP</b>	Proteína de ligação à cauda poli-A
<b>PARP</b>	<i>Poly-(ADP-ribose) polymerase</i>
<b>PBS</b>	Tampão salina-fosfato
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>q-PCR</b>	PCR quantitativa
<b>qRT-PCR</b>	PCR quantitativa em tempo real
<b>RBP16</b>	Proteína de ligação ao RNA mitocondrial
<b>RBPs</b>	Proteínas de ligação ao RNA
<b>RGG</b>	Repetições de argininas e glicinas
<b>RL</b>	Reparo por reversão da lesão
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>RQ</b>	Quantificação relativa
<b>rRNAs</b>	RNA ribossomais
<b>SAGE</b>	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino

<b>siRNAs</b>	Pequenos RNAs de interferência
<b>SmAgo2/3/4</b>	<i>Argonaute proteins de S. mansoni</i>
<b>SmCB1</b>	<i>Cathepsin B-like endopeptidase 1 de S. mansoni</i>
<b>Smc-GK1</b>	<i>S. mansoni cGMP-dependent protein kinase</i>
<b>SmD3</b>	<i>Small ribonucleoprotein particle protein</i>
<b>SmDicer1</b>	<i>S. mansoni Dicer 1 protein</i>
<b>SmMef2</b>	<i>S. mansoni Myocyte enhancer factor 2</i>
<b>SmPKA-C</b>	<i>S. mansoni cAMP-dependent protein kinase</i>
<b>SmPKC1</b>	<i>S. mansoni protein kinase C1</i>
<b>SmPUR-α</b>	<i>S. mansoni PUR-alpha</i>
<b>SmRNP</b>	<i>S. mansoni ribonucleoprotein</i>
<b>SmSMT3B</b>	<i>S. mansoni suppressor of mif two 3 homolog 2</i>
<b>SmSMT3C</b>	<i>S. mansoni suppressor of mif two 3 homolog 1</i>
<b>SMYB1</b>	<i>S. mansoni Y-box binding protein 1</i>
<b>SmZF1</b>	<i>S. mansoni Zinc Finger protein 1</i>
<b>snRNPs</b>	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
<b>SSB</b>	<i>Single-Stranded DNA Binding protein</i>
<b>TAE</b>	Tampão tris-acetato-EDTA
<b>TcOGG1</b>	<i>8-oxoguanina DNA glicosilase de T. cruzi</i>
<b>TE</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>UvrD</b>	<i>DNA-dependent ATPase I and helicase II</i>
<b>VSG</b>	<i>Variant Surface Glycoprotein</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>
<b>XPA</b>	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
<b>YB-1</b>	<i>Human Y-box binding protein</i>
<b>YBP</b>	<i>Y-box binding proteins</i>

## RESUMO

Proteínas da família Y-box (YBP) são consideradas reguladores multifuncionais da expressão gênica e, geralmente, apresentam dois domínios característicos: um altamente conservado de ligação a ácidos nucleicos (CSD - *cold shock domain*) e um C-terminal pouco conservado (*Tail* ou cauda). Vários estudos têm demonstrado o papel de algumas YBP na resposta celular ao estresse causado por agentes genotóxicos, na capacidade de interagir com lesões e erro de pareamento de bases no DNA, além da interação com algumas proteínas das vias de reparo do DNA evidenciando que as YBP podem participar nos mecanismos de reparo do DNA. SMYB1 é uma proteína de *Schistosoma mansoni* que apresenta grande similaridade entre seu domínio CSD e domínios correlatos em outros membros dessa família de proteínas. *S. mansoni*, o parasito trematódeo responsável pela esquistossomose, exibe um ciclo de vida complexo com alternância de fases entre um hospedeiro intermediário e um definitivo, que vivem em ambientes diferentes. A caracterização de proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica é de grande importância para o entendimento dos eventos moleculares que controlam mudanças fisiológicas e morfológicas em tais organismos. O presente estudo visa ampliar o conhecimento acerca da proteína SMYB1 e sua função biológica. Para isso, foram realizados ensaios de localização de SMYB1 em diferentes fases do desenvolvimento de *S. mansoni*, detectando a proteína nos estágios de ovo, vermes adultos macho e fêmea, cercária, miracídio e esquistossômulos, sempre no citoplasma. A localização citoplasmática da proteína corrobora achados anteriores do nosso grupo que mostraram a sua habilidade de interação com moléculas de RNA. A interação com mRNAs realizada por outros membros da família YBP é bem estabelecida e sugere sua possível função na regulação de eventos pós-transcricionais da expressão gênica. O papel de SMYB1 na proteção contra o estresse oxidativo no DNA foi também avaliado. Para isso, os protozoários *Trypanosoma cruzi* heminocaute para o gene *MSH2* (homólogo de *mutS* em Eucariotos) e *Trypanosoma brucei* nocaute para o gene *MSH2* foram utilizados como modelo e verificamos que SMYB1 é capaz de complementar a função desempenhada por *MSH2* tanto em *T. cruzi* quanto em *T. brucei*. As cepas expressando SMYB1 foram mais resistentes ao tratamento com peróxido de hidrogênio, sugerindo que a proteína possa reconhecer lesões oxidativas no DNA (incluindo a 8-oxoG, que tem sua produção aumentada na presença de peróxido de hidrogênio) e ativar uma resposta a essa lesão.

RBP16, ortóloga de SMYB1, é uma proteína de ligação a RNA mitocondrial de *T. brucei* cujo domínio *cold shock* apresenta entre 33% e 38% de identidade com o CSD de outras proteínas eucarióticas da família YBP. Assim sendo, outro objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de RBP16 em parasitos selvagens frente ao tratamento com agentes genotóxicos. Ao avaliar o efeito do silenciamento de RBP16 em *T. brucei*, verificamos que seu gene é essencial para o crescimento da forma sanguínea do parasito e para a resposta ao estresse oxidativo. No entanto, a diminuição nos níveis da proteína não aumenta a sensibilidade das células aos danos causados pela cisplatina e pelo metilmetanosulfonato (MMS). Os processos de reparo de DNA são cruciais para o sucesso parasitário do *T. cruzi* e *T. brucei* e, dessa forma, o maior entendimento dessas vias pode levar a uma melhor compreensão da biologia dos tripanossomatídeos e à elaboração de novas estratégias para o tratamento das doenças causadas por esses parasitos.

## ABSTRACT

Y-box binding proteins (YBP) are considered multifunctional regulators of gene expression that present two characteristic domains: a highly conserved nucleic acid binding domain (cold shock domain, CSD) and a less conserved C-terminal domain (tail domain). Several studies have demonstrated the role of some YBP in the cellular response to stress caused by genotoxic agents, the ability to interact with injuries and DNA mismatch repair, as well as interaction with some proteins of the DNA repair pathways showing that the YBP may participate in DNA repair processes. SMYB1 is a *Schistosoma mansoni* protein that presents a CSD highly similar to CSDs from other YBP family members. *S. mansoni*, the etiologic agent of schistosomiasis, is a trematode parasite with a complex life cycle that alternates between two different hosts and also lives in diverse environments. The characterization of proteins involved in the regulation of gene expression is of great importance for the understanding of molecular events that control physiological and morphological changes in such organisms. The present study aims to increase the current knowledge about the SMYB1 protein and its biological function. To this end, immunolocalization experiments were performed in different *S. mansoni* life cycle stages, revealing the presence of this protein in the cytoplasm of eggs, male and female adult worms, cercaria, miracidia and schistosomulae. The cytoplasmic localization of SMYB1 is in agreement with previous findings from our research group that have shown its ability to interact with RNA molecules. The interaction with mRNAs by other YBP members is well-established and suggests a possible function in the regulation of post-transcriptional gene expression events. The role of SMYB1 in the protection against oxidative stress was also evaluated. To reach this goal, we have obtained MSH2 single knockout lines of *Trypanosoma cruzi* MSH2 double knockout lines of *Trypanosoma brucei* and verified that SMYB1 is able to complement the function of MSH2 in both parasites. SMYB1-expressing strains were more resistant to hydrogen peroxide treatment, suggesting that this protein may recognize oxidative lesions in the DNA (including 8-oxoG, which is increased in the presence of hydrogen peroxide) and a response to that injury.

RBP16, an ortholog of SMYB1, is a mitochondrial RNA binding protein from *Trypanosoma brucei* that contains a CSD 33-38% identical to CSDs of other eukaryotic YBPs. Therefore, another aim of this work was to evaluate the role of RBP16 in wild-type parasites and the behaviour of such organisms in the presence of genotoxic agents.

Evaluating the effect of RBP16 silencing in *T. brucei*, we have verified that this is an essential gene for parasite growth and response to oxidative stress. Nevertheless, the decreasing of protein levels did not increase cell sensitivity to DNA damages caused by cisplatin and metilmetanosulfonate. DNA repair processes are crucial to the parasitic success of both *T. cruzi* and *T. brucei* and, therefore, a better understanding of the mechanisms involved in the repair of damaged DNA may help to explain the biology of *Trypanosomatids* and lead to the development of new strategies for the treatment of diseases caused by such parasites.

# **1. INTRODUÇÃO**

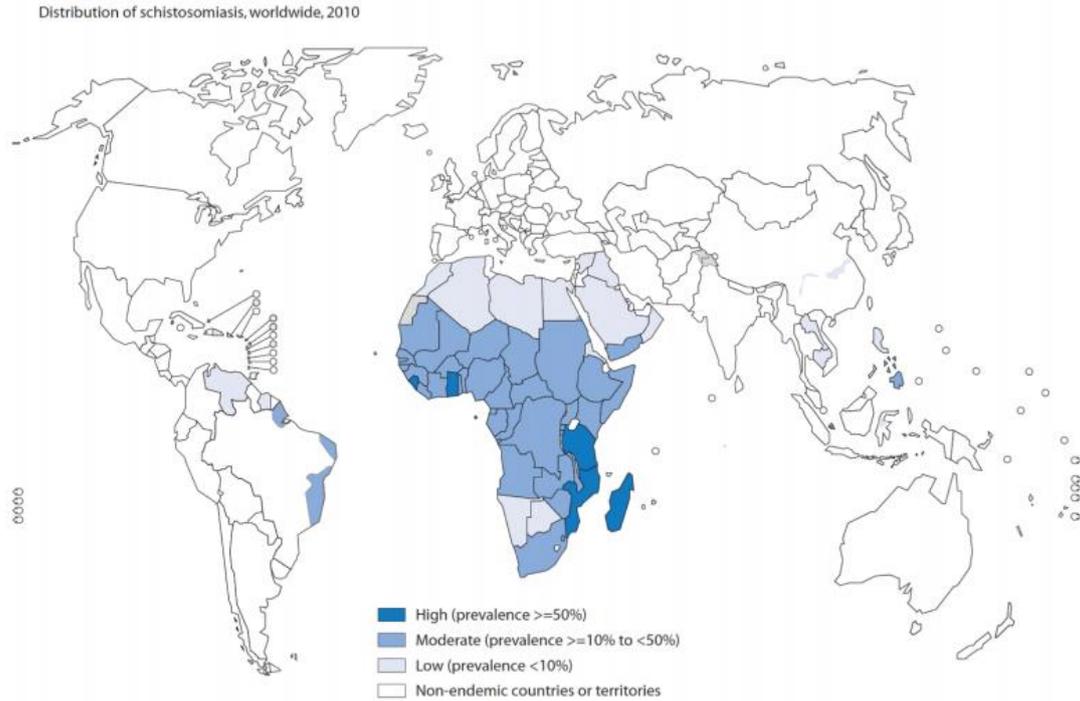
### 1.1 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças infecciosas tem um significativo impacto na saúde humana sendo em sua maioria causadas por parasitos que pertencem as chamadas doenças da pobreza, ou doenças tropicais negligenciadas, as quais contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade social, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países onde ocorrem (Ndjonka et al., 2013). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com um ou mais agentes causadores destas doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (WHO, 2011). Dentre as várias doenças negligenciadas pode-se citar os agentes causadores das tripanossomíases, leishmanioses, esquistossomoses, dentre outras (Ndjonka et al., 2013).

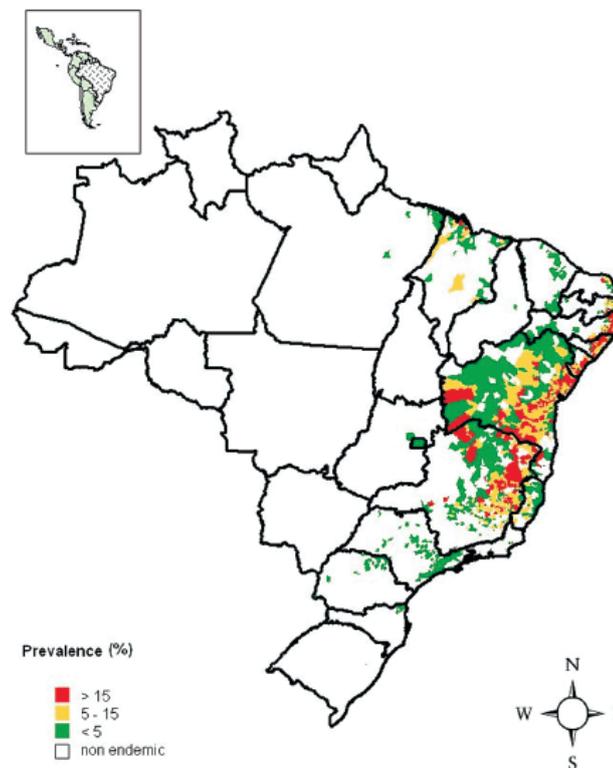
#### 1.1.1 Esquistossomose e o *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma doença parasitária tropical crônica e debilitante com alto índice de prevalência mundial, atingindo mais de 240 milhões de pessoas em 77 países dos continentes americano, africano e asiático. Estima-se que aproximadamente 700 milhões de pessoas residam em áreas endêmicas e estejam expostas aos riscos de infecção (WHO, 2012). Assim, essa é considerada a segunda mais importante doença parasitária tropical em termos de morbidade e mortalidade, perdendo apenas para a malária (Fenwick et al., 2009).

A esquistossomose é causada por trematódeos digenéticos da família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma*, sendo as espécies *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi* causadoras da esquistossomose intestinal e a espécie *S. haematobium* causadora da esquistossomose do plexo urinário vesical. Das cinco espécies de importância para o homem, somente *S. mansoni* é endêmica nas Américas, ocorrendo principalmente no Brasil, Suriname, Venezuela e Ilhas do Caribe (WHO, 2012) (Figura 1). No Brasil, existem cerca de 6 milhões de indivíduos infectados e 25 milhões expostos ao risco de contaminação, distribuídos em uma faixa endêmica que se estende do estado do Rio Grande do Norte até Minas Gerais (Carvalho et al., 2008, Sales et al., 2009, Brasil, 2011) (Figura 2).



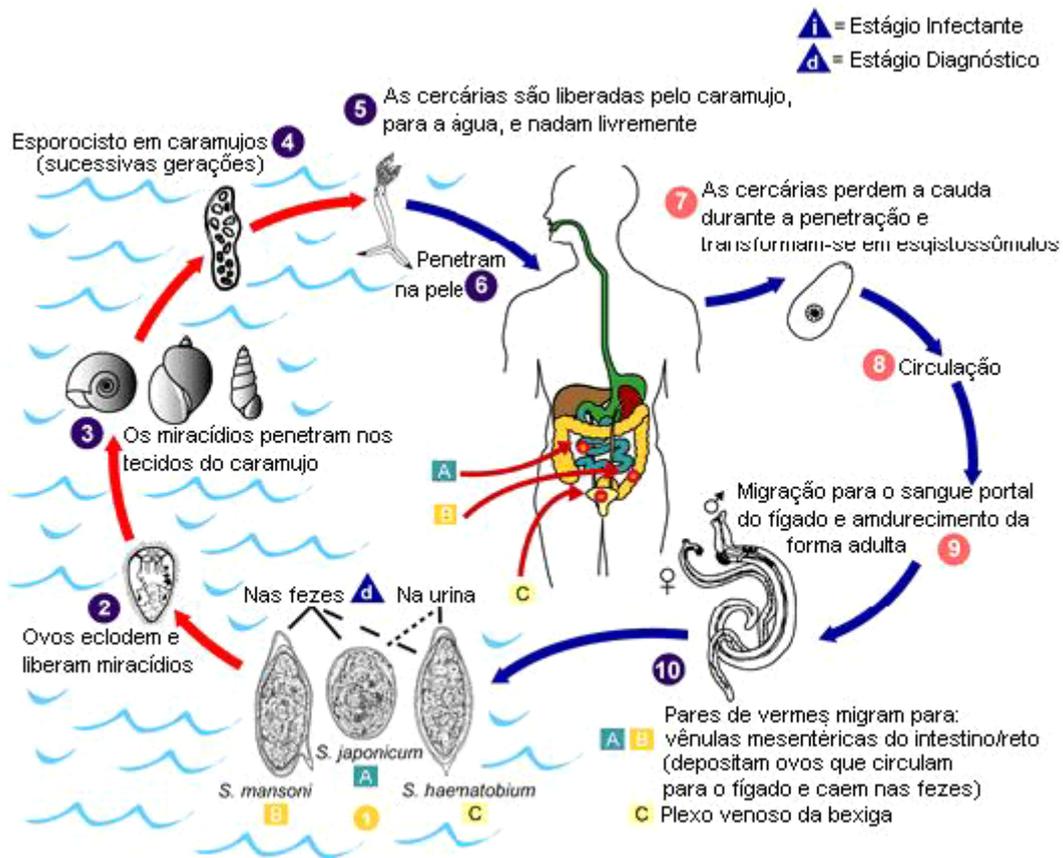
**Figura 1: Distribuição global da esquistossomose estimada para o ano 2010.** Reproduzida de WHO (2012). Diferentes tonalidades em azul representam a prevalência da infecção em indivíduos na população.



**Figura 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com o nível de prevalência no Brasil.** (Fonte: Amaral e colaboradores (2006)).

O controle da esquistossomose depende quase que exclusivamente do tratamento com o fármaco praziquantel. Assim, a quimioterapia baseada nesse fármaco tornou-se uma estratégia global no controle da esquistossomose e segundo o guia de quimioterapia preventiva da OMS a administração de drogas em massa é a estratégia de controle recomendada para o controle da esquistossomose (Zhang et al., 2010). No entanto, o uso do praziquantel possui algumas limitações, como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (Hotez et al., 2010). Além disso, os tratamentos não previnem contra reinfecções (Bethony and Loukas, 2008, Sturrock, 2001, Fenwick, 2006, Taylor, 2008) e não mata formas jovens durante as fases iniciais da infecção (Pica-Mattoccia and Cioli, 2004). O mecanismo de resistência a essas drogas ainda permanece desconhecido (Wang et al., 2012).

Todos os esquistossomos de interesse médico possuem essencialmente o mesmo ciclo de vida, que se caracteriza pela presença de alternância de uma fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem e uma fase assexuada no hospedeiro invertebrado. No Brasil, o principal hospedeiro invertebrado do *S. mansoni* é o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*. Durante a fase adulta, os parasitos vivem no sistema porta intra-hepático de seu hospedeiro definitivo vertebrado. Com a maturação sexual, os vermes adultos migram, acasalados, para as veias mesentéricas inferiores. O macho possui um canal ginecóforo longitudinal capaz de abrigar a fêmea durante toda a vida adulta. São nas veias mesentéricas inferiores onde ocorre a postura dos ovos que, depois de maduros, chegam à luz intestinal e são eliminados junto com as fezes do hospedeiro. Os ovos maduros contêm um miracídio já formado em seu interior, o qual eclode assim que o ovo atinge a água. O miracídio então penetra em seu hospedeiro intermediário, no interior do qual se transforma em esporocisto primário. Este, por sua vez, sofre algumas modificações e passa a ser chamado de esporocisto secundário, contendo em seu interior cercárias desenvolvidas, ou em desenvolvimento. As cercárias emergem dos esporocistos e passam ao meio exterior. Na água, nadam ativamente até atingirem o hospedeiro definitivo, onde penetram através da pele ou mucosas. No interior do hospedeiro definitivo os parasitos são inicialmente denominados esquistossômulos e migram pelo tecido subcutâneo até penetrarem em um vaso, quando então são levados até os pulmões e daí para o sistema porta, onde amadurecem, fechando o ciclo (Figura 3) (Neves, 2005).



**Figura 3: Esquema representativo do ciclo de vida de parasitos do gênero *Schistosoma*.** Durante seu ciclo de vida, parasitos deste gênero passam por três diferentes ambientes, com seis morfologias distintas. Fonte: adaptado de *Center for Disease Control* (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

O primeiro rascunho do genoma do *S. mansoni* mostrou que este possuía 363 milhões de bases dispostas em oito pares de cromossomos, sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (Berriman et al., 2009). A fêmea do parasito é heterogamética (ZW) e o macho é homogamético (ZZ), sendo o sexo determinado no zigoto por um mecanismo cromossomal. Recentemente com a nova montagem do genoma do *S. mansoni*, o número de genes passou de 11.809 para 10.852 genes preditos. O novo genoma apresenta então 364,5 milhões de bases, sendo 86% dessas mapeadas nos cromossomos. Esses dados foram obtidos através da união dos dados publicados anteriormente, obtidos por sequenciamento de Sanger, e os novos dados gerados por sequenciamentos de DNA de nova geração, utilizando vermes adultos advindos de um único miracídio (Protasio et al., 2012). Nessa nova avaliação do genoma foram identificados eventos de *trans-splicing* em 11% dos genes preditos, assim como possíveis erros de sequenciamento e montagem das sequências. Além disso,

a estrutura de 45% dos genes até então descobertos foi refinada utilizando-se dados de RNA-Seq, identificando assim novos genes e variantes de *splicing* (Protasio et al., 2012).

O genoma do *S. mansoni* apresenta ainda regiões de íntrons grandes de aproximadamente 1.692 pb (Berriman et al., 2009) e estruturas incomuns denominadas de MEGs (*Micro Exons Genes*). Os MEGs são genes que apresentam pequenos éxons (6 a 36 pb) que compreendem 75% da sequência codificante, sendo flanqueados por éxons convencionais, aumentando a variabilidade dos transcritos por *splicing* alternativo (Berriman et al., 2009, DeMarco et al., 2010).

O sequenciamento do genoma do *S. mansoni* trouxe muitas informações que podem ser extremamente úteis em estratégias de tratamento, ou de vacinação e que servirão como guia para a condução da pesquisa relacionada à esquistossomose nos próximos anos. Por exemplo, foram evidenciadas, na análise do genoma do *S. mansoni*, expansões nas famílias das proteases e deficiências no metabolismo de lipídeos (Berriman et al., 2009), que podem ser relacionadas diretamente ao ciclo de vida destes parasitos.

### **1.1.1.1 Regulação da expressão gênica em *S. mansoni***

Sabe-se que proteínas regulatórias são extremamente importantes para os organismos, principalmente aqueles que apresentam ciclos de vida com alternância de características morfológicas e fisiológicas em resposta a diferentes ambientes, como é o caso de helmintos parasitos. Para completar seu ciclo de vida, o *S. mansoni* exibe seis diferentes fases, cada uma com morfologia e fisiologia características. Desta maneira, o parasito representa um sistema biológico interessante e, sobretudo, desafiante, para se estudar os processos de regulação da expressão gênica, uma vez que este processo garante a adaptação do mesmo às transformações dos ambientes pelos quais ele passa (El-Ansary and Al-Daihan, 2005, Jolly et al., 2007, Fantappie et al., 2008).

Células de eucariotos possuem vários mecanismos para o controle da expressão de genes, incluindo o início da transcrição, o *splicing* do mRNA, a estabilidade do mRNA, o início da tradução e eventos pós-traducionais, tais como a estabilidade, processamento e modificação química das proteínas (Day and Tuite, 1998, Mata et al., 2005). Há muitos anos, entretanto, estudos da regulação gênica focavam apenas no controle da transcrição através da seleção e ativação de promotores transcripcionais.

Estudos recentes, no entanto, tem focado nos mecanismos envolvidos na regulação gênica pós-transcricional. O controle pós-transcricional é mediado por várias combinações de proteínas de ligação ao RNA (RBPs) que determinam o destino dos transcritos e regulam coordenadamente subconjuntos específicos de mRNAs. Recentemente, com a descoberta dos RNAs pequenos, verificou-se que esses RNAs (RNAs pequenos interferentes e os micro RNAs), juntamente com complexos de proteínas efetoras, podem atuar na regulação gênica através da inibição da expressão de genes, controlando a degradação do mRNA, ou induzindo a repressão da tradução do mRNA (Dykxhoorn, 2005, Mata et al., 2005). Recentemente, alguns estudos com o parasito *S. mansoni* buscam por transcritos que estejam relacionados à regulação gênica em nível transcricional, pós-transcricional e traducional. O gene SmDicer1, por exemplo, é expresso em vários estágios do ciclo de vida do *S. mansoni* e está relacionado ao controle da expressão gênica pós-transcricional (Krautz-Peterson and Skelly, 2008). Gomes e colaboradores (2009), ao verificarem o nível dos transcritos de SmDicer1 e SmAgo2/3/4 (proteínas relacionadas as vias de miRNA) em cercárias, vermes adultos, ovos e esquistossômulos observaram que SmDicer1 e SmAgo2/3/4 são diferencialmente expressos durante o desenvolvimento dos esquistossômulos, sugerindo uma atuação desses transcritos no controle da expressão gênica durante o ciclo de vida do *S. mansoni*. Já Leutner e colaboradores (2011), ao analisarem o genoma do *S. mansoni* identificaram Smc-GK1, homólogo de cGKs de eucariotos superiores. Smc-GK1 foi detectado como sendo transcrito de forma gênero-independente em esquistossomos adultos e foi observado ocorrência de transcritos de SmcGK1 senso e antisenso, o que sugere que a expressão deste gene é controlada em nível pós-transcricional.

Em outros estudos que utilizam técnicas de expressão gênica em larga escala, como microarranjo e RNA-Seq, foi verificado um padrão de expressão gênica diferencial em diversos genes durante as fases de cercárias, esquistossômulos e esporocistos, demonstrando que dos 31 genes estudados, envolvidos com o desenvolvimento do parasito, 18 foram mais expressos em esporocistos que em cercárias e em esquistossômulos (Parker-Manuel et al., 2011, Han et al., 2009). Em uma análise inicial do transcriptoma do *S. mansoni* foi sugerido que os genes diferencialmente expressos podem chegar a 1000 em cada estágio (Verjovski-Almeida et al., 2004, Verjovski-Almeida et al., 2003), evidenciando que o estudo de proteínas envolvidas na regulação gênica em nível de transcrição, pós-transcrição e tradução são

importantes para o entendimento dos mecanismos que envolvem tais regulações e para o entendimento do ciclo de vida do parasito (Han et al., 2009).

Muitas publicações têm focado na identificação e caracterização de genes/proteínas estágio, sexo, ou tecido específicas, utilizando técnicas como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), microarranjos gênicos, proteômica e outras técnicas de análise de genes individualmente (Hoffmann et al., 2001, Knobloch et al., 2002, Sajid et al., 2003, Michel et al., 2003, Chalmers et al., 2008). Como alguns exemplos destes genes/proteínas de expressão diferencial, podemos citar: (1) o gene codificador de SmPKA-C que parece ser diferencialmente regulado ao longo do desenvolvimento do parasito. SmPKA-C é a subunidade catalítica de uma proteína quinase dependente de AMP cíclico necessária para a viabilidade de cercárias e pode desempenhar papel importante na reprodução de vermes adultos (Swierczewski and Davies, 2010); (2) o gene tecido-específico *TK4*, que codifica para uma tirosina quinase, cujos transcritos foram encontrados em todos os estágios de vida do parasito. Nos vermes adultos, estes transcritos foram encontrados apenas no parênquima, subtegumento e, principalmente, nos oócitos e espermátócitos, indicando uma possível função da proteína no desenvolvimento das células germinativas do parasito (Knobloch et al., 2002); (3) outro gene caracterizado foi o *SmCBI* (*cathepsin B-like endopeptidase I*), que codifica para uma proteína que está presente apenas no lúmen e gastroderme do intestino de vermes adultos (Sajid et al., 2003); (4) o gene codificador da proteína SmMef2 (*myocyte enhancer factor 2*), homólogo aos genes codificadores de proteínas conservadas da família Mef2 também foi estudado, sendo demonstrada sua expressão em diversas fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, assim como a atuação da proteína SmMef2 como um ativador transcricional (Milligan and Jolly, 2012); (5) também o nosso grupo caracterizou o gene codificador da proteína SmZF1 que contém dedos de zinco. A proteína foi encontrada no núcleo das células nos estágios de cercária, esquistossômulo e macho adulto do parasito e ausente em fêmeas adultas, indicando que SmZF1 deva ser uma proteína sexo-específica (Drummond et al., 2009).

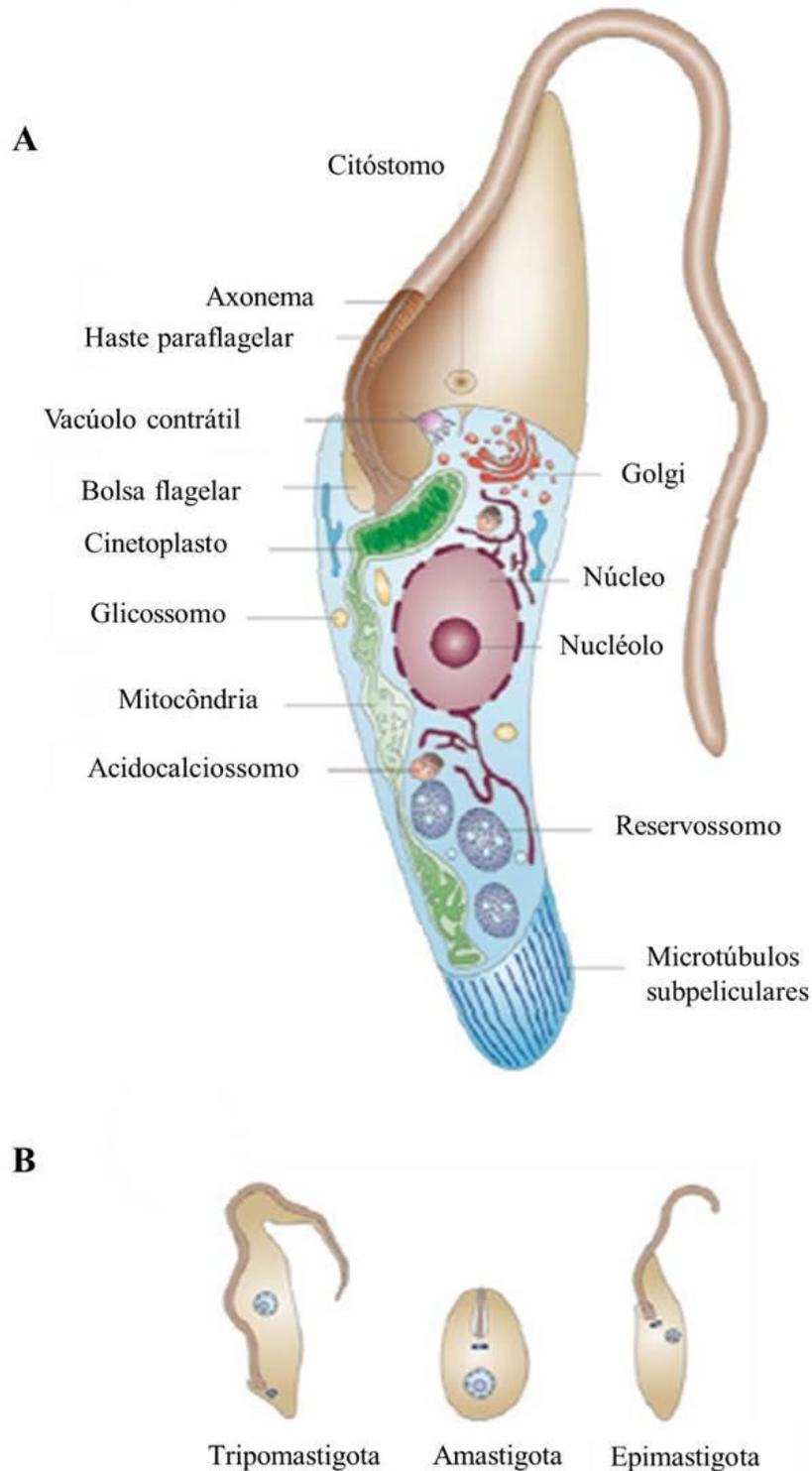
Há, entretanto, muito a ser pesquisado, principalmente no que diz respeito a processos regulatórios, que levam à ativação ou repressão de genes durante as fases do ciclo de vida e da organização geral ou específica de certas partes do genoma. Dessa forma, para melhor se entender a regulação gênica em *S. mansoni* é necessário não só identificar fatores de transcrição, coativadores e corepressores, fatores de remodelamento da cromatina que controlam esse processo molecular e elementos

regulatórios na região promotora de genes (Fantappie et al., 2008), como também proteínas relacionadas ao controle pós-transcricional e ao controle traducional, ou até mesmo proteínas capazes de atuarem em todos esses eventos. Vários esforços vêm sendo empregados com o objetivo de descrever proteínas relacionadas à regulação gênica atuantes no parasito, mas muito há ainda a se descobrir, dada a complexidade do seu genoma. Diante disso, estudos que visem entender os eventos moleculares que controlam as mudanças morfológicas do parasito são de suma importância para o entendimento do desenvolvimento da esquistossomose.

### **1.1.2 Tripanossomíase: família *Trypanosomatidae***

Os tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* spp. são os agentes causadores da doença de Chagas, tripanossomíase africana (ou doença do sono) e leishmanioses, respectivamente. Esses protozoários patogênicos afetam aproximadamente 27 milhões de pessoas em países em desenvolvimento nas regiões tropicais e subtropicais (Nussbaum et al., 2010). Esses parasitos pertencem à ordem Kinetoplastidea, que se caracteriza pela presença de uma única mitocôndria que se ramifica por toda a célula. Dentro da mitocôndria está localizado o cinetoplasto, uma organela que possui grande conteúdo de DNA (kDNA) e se localiza próximo ao corpo basal do flagelo dos tripanossomatídeos. Além disso, os parasitos possuem uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário assume (Figura 4a) (Brisse et al., 2000).

A região mitocondrial é composta por uma rede de vários milhares de minicírculos (30% do DNA da célula) e algumas dezenas de maxicírculos que formam o DNA do cinetoplasto (kDNA) (Souza, 2009). A localização do cinetoplasto é importante na especificação das formas em que os parasitos podem ser encontrados durante o ciclo biológico (Figura 4b). Os minicírculos codificam os gRNAs, que modificam os transcritos dos maxicírculos pelo processo de edição. Já os maxicírculos são correspondentes ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores que codificam os rRNAs mitocondriais e as subunidades do complexo respiratório (Souza, 2009).



**Figura 4:** *T. cruzi* e suas principais formas ao longo do ciclo de vida. **A** - representação esquemática de uma seção longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi*. **B** - as principais formas do parasito são definidas pelo seu formato, pela presença e adesão do flagelo e pela posição do corpo basal, do cinetoplasto e do núcleo. A forma epimastigota é encontrada no vetor e as formas amastigota e tripomastigota são encontradas no hospedeiro vertebrado, intra e extracelularmente, respectivamente. Adaptado de Docampo e colaboradores (2005).

Os cinetoplastídeos apresentam características não usuais relacionadas à expressão gênica, possivelmente devido à sua grande divergência em relação aos demais eucariotos (Teixeira and daRocha, 2003). A mitocôndria única possui funções biológicas importantes para uma resposta rápida a mudanças ambientais e ao ciclo de vida desses parasitos (Ammerman et al., 2008). Além disso, esses organismos apresentam transcrição policistrônica, regulação da expressão gênica principalmente através de mecanismos pós-transcricionais e outros processos biológicos distintos dos demais eucariotos (Teixeira and daRocha, 2003).

Os tripanossomatídeos apresentam um ciclo de vida digenético com alteração de fases envolvendo um hospedeiro intermediário, o inseto, e um hospedeiro definitivo, podendo ser o homem ou outros mamíferos. Dessa forma, cada estágio do ciclo de vida desses parasitos se diferencia por suas capacidades catabólicas e biossintéticas para se adaptarem ao ambiente do hospedeiro (Brennand et al., 2011).

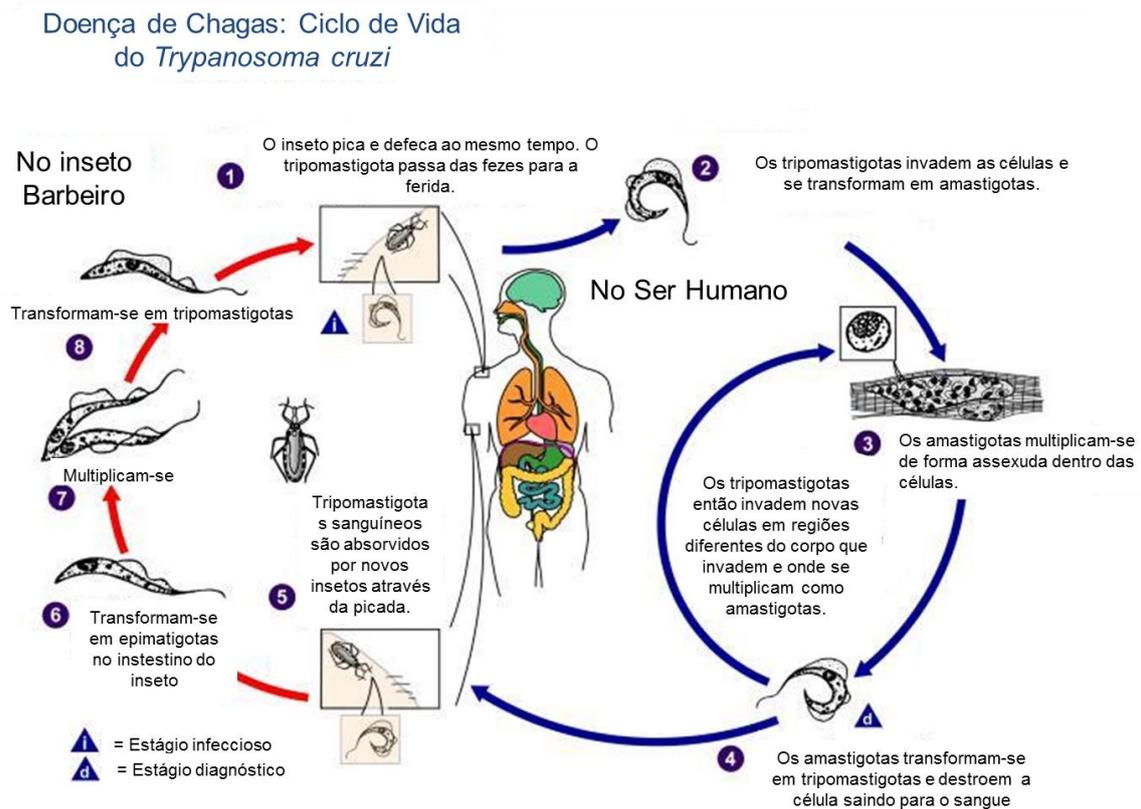
### **1.1.2.1 Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi***

Segundo a OMS, a doença de Chagas acomete 10 milhões de indivíduos e representa um risco para uma população de 25 milhões de pessoas da América Latina, geograficamente distribuídas desde o México até o sul da Argentina, onde a enfermidade tem caráter endêmico (WHO, 2010). No entanto, países não endêmicos, como os Estados Unidos e Espanha, vêm apresentando a doença de Chagas como um problema de saúde emergente devido ao influxo de imigrantes provenientes de países endêmicos (Schmunis, 2007). No Brasil predominam os casos crônicos decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. A forma aguda da doença tem prevalência bem menor, com 1007 casos registrados no período de 2000 a 2010 (Brasil, 2010).

A transmissão do parasito *T. cruzi* para humanos ocorre principalmente através das fezes contaminadas dos barbeiros hemípteros da subfamília Triatominae, podendo ocorrer também por transfusão sanguínea, infecção congênita, ou mais raramente, através de transplante de órgãos, acidentes de laboratório e alimentos contaminados (Lambrecht, 1965, Prata, 2001).

O ciclo de vida do parasito alterna-se entre hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos, e insetos hemípteros hematófagos, com diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros. A infecção é iniciada no momento do

repasto sanguíneo, quando as fezes do hospedeiro invertebrado contendo formas tripomastigotas do parasito entram em contato com a mucosa dos olhos, nariz, boca ou com a pele lesionada, permitindo que as tripomastigotas atinjam a corrente sanguínea. No hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas infectam células e, em seguida, diferenciam-se em formas amastigotas replicativas que se dividem por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, esses parasitos se diferenciam em tripomastigotas não replicativas que emergem do tecido e atingem a corrente sanguínea, onde circulam por um tempo antes de penetrar em uma nova célula e reiniciar o ciclo de infecção. O hospedeiro invertebrado adquire a forma tripomastigota circulante após o repasto sanguíneo de animais (ciclo silvestre) ou homem (ciclo doméstico) infectados. No interior do trato digestivo do inseto, as tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas replicativas que, em seguida, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas que ao serem eliminados com as fezes podem dar início a um novo ciclo (Figura 5) (Brenner, 1973, Prata, 2001).



**Figura 5: Ciclo do parasito *T. cruzi*.** O ciclo de vida deste parasito alterna-se entre hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos, e insetos Reduviídeos hematófagos da família Triatominae. O parasito atinge diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros: formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicos infectivos em vetores hematófagos e formas amastigotas intracelulares replicativas e tripomastigotas na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos. Fonte: adaptado de *Center for Disease Control* (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

Desde 1970, os medicamentos usados para o tratamento da doença de Chagas são benznidazol ou nifurtimox (drogas nitroheterocíclicas) que precisam ser ativadas dentro do parasito. Esses fármacos atuam nas formas tripomastigotas e amastigotas do parasito, o que reduzem consideravelmente os níveis de parasitemia, a gravidade e a letalidade na fase aguda da doença. Entretanto, são bem menos eficazes na fase crônica, não se obtendo, nesse estágio, sucesso terapêutico em mais de 20 % das pessoas tratadas (Cancado, 1999). Dessa forma, notamos que o maior entendimento da biologia do parasito é necessário para o desenvolvimento de novas drogas.

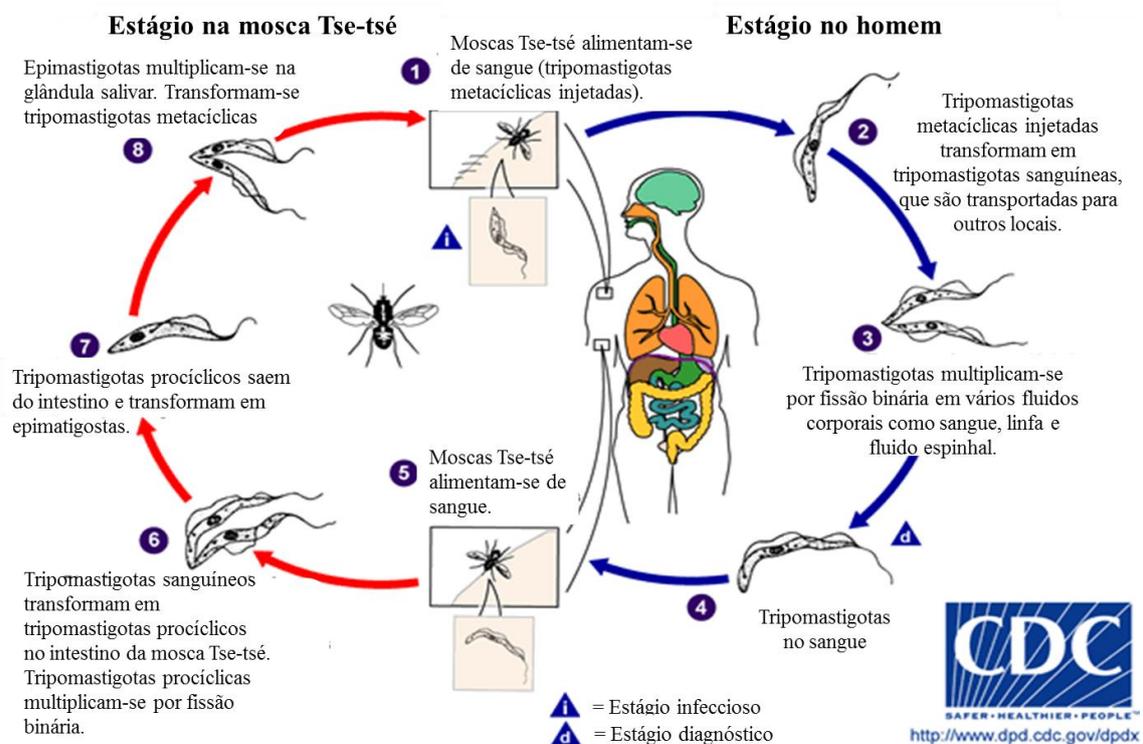
### 1.1.2.2 Doença do Sono e o *Trypanosoma brucei*

A doença do sono, ou tripanossomíase africana, é causada pelo agente etiológico *T. brucei*, que causa mortalidade e morbidade generalizada em seres humanos e animais na África Sub-saariana, sendo que, aproximadamente um bilhão de pessoas estão afetadas com essa parasitose no mundo (Geiger et al., 2011). O *T. brucei* é classificado em três subespécies: *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*. O *T. brucei brucei* não infecta humanos, mas causa a tripanossomíase em animais, levando a perdas econômicas de aproximadamente 4,5 bilhões de dólares anuais para a agricultura africana. O *T. brucei gambiense* é responsável pela forma crônica da doença em humanos que atinge a África Central e Ocidental, e o *T. brucei rhodesiense* é responsável pela forma aguda da doença em humanos na África Oriental (Hajduk et al., 1992, Smith et al., 1995, Smith and Hajduk, 1995). O parasito é transmitido pela mosca *tsé-tsé* (*Glossina spp.*) e persiste no sangue do hospedeiro infectado (Simarro et al., 2008, Lopez et al., 2011).

Ao contrário do *T. cruzi*, que vive intracelularmente, o *T. brucei* apresenta um estilo de vida extracelular, o que leva a uma maior exposição do parasito ao sistema imune do hospedeiro. Para escapar da resposta imune mediada por anticorpos, o *T. brucei* utiliza a variação antigênica, que envolve os genes de glicoproteínas de superfície variante (ou VSG, *Variant Surface Glycoprotein*), que são expressas na superfície celular (Barry et al., 2005).

Assim como a doença de Chagas e a esquistossomose, o ciclo biológico do parasito causador da doença do sono também envolve a alternância de fases entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. As formas tripomastigotas do *T. brucei* são transmitidas aos seres humanos por meio da picada da mosca *tsé-tsé* contaminada com o

parasito (Njiokou et al., 2006). A forma tripomastigota do *T. brucei* multiplica-se nos fluidos corporais (sangue e fluido extracelular nos tecidos) sem invadir as células e, finalmente, se diferencia na forma sanguínea (Matthews, 2005). Após três dias da picada, o parasito multiplica-se no sangue, evadindo o sistema imune do hospedeiro pelo processo de variação antigênica. As formas metacíclicas e sanguíneas são cobertas por uma camada de VSGs, que protege o parasito do ataque do hospedeiro (Barry and McCulloch, 2001). Já no hospedeiro intermediário, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas procíclicas e sucessivamente elas se diferenciam em formas epimastigotas que, ao se multiplicarem nas glândulas salivares do inseto, dão origem às formas tripomastigotas metacíclicas, reiniciando-se o ciclo (Figura 6).



**Figura 6: Ciclo do parasito *T. brucei*.** O ciclo de vida deste parasito alterna-se entre hospedeiros vertebrados e insetos (mosca Tse-Tsé). O parasito atinge diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros: formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas procíclicas infectivos em vetores hematófagos e formas tripomastigotas metacíclico e tripomastigota sanguínea na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. Fonte: adaptado de Center for Disease Control (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

A doença do sono evolui em duas fases: na primeira fase (hemolinfática), o parasito se prolifera no sangue e na linfa. Durante essa fase, o paciente não desenvolve sintomas específicos e, portanto, a doença é difícil de ser diagnosticada. Já a segunda

fase é caracterizada pelas desordens neurológicas causadas pela presença dos parasitos no sistema nervoso central que cruzam as barreiras sanguíneas do cérebro (Geiger et al., 2011). A diferenciação de uma forma em outra induz mudanças na superfície do parasito, um evento bastante importante para a sua sobrevivência. Além disso, os tripanossomas desenvolveram mecanismos que permitem a sua adaptação a mudanças ambientais abruptas, nutricionais e de temperatura quando eles passam do hospedeiro definitivo (mamífero) para o intermediário (inseto) (Geiger et al., 2011).

O tratamento da doença do Sono depende do estágio de desenvolvimento desta. Para a forma aguda são usados dois medicamentos em sua fase inicial, a pentamidina e a suramina, enquanto para o segundo estágio é usado o melarsoprol (Barrett et al., 2007). A forma crônica da doença é tratada com pentamidina e melarsoprol para a fase inicial e fase secundária, respectivamente. O tratamento da doença é difícil, de custo elevado e apresenta efeitos colaterais para o homem. Até o momento, não há profilaxia quimioterápica nem métodos específicos e de baixo custo que permitam o diagnóstico precoce do parasito em amostras de sangue humano (Geiger et al., 2011).

### **1.1.3 Genoma e expressão gênica em *T. cruzi* e *T. brucei***

Diversas características em comum dos genomas de *T. cruzi* e *T. brucei* foram evidenciadas após a publicação do genoma completo desses parasitos. Os genes codificadores estão, de forma geral, arranjados em longos *clusters* de dezenas a centenas de genes na mesma fita de DNA (El-Sayed et al., 2005a). O genoma do *T. cruzi* (da cepa híbrida CL Brener) consiste de um genoma haplóide de aproximadamente 55 Mb, contendo cerca de 12.000 genes preditos e apresenta como principal característica o fato de possuir uma grande porção (50%) de sequências repetitivas. Essas sequências repetitivas correspondem a grandes famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed et al., 2005b). Já o genoma de *T. brucei* consiste de aproximadamente 26 Mb e contém 9.068 genes preditos, incluindo aproximadamente 900 pseudogenes, aproximadamente 1.700 genes específicos do parasito e 806 genes VSGs na região subtelomérica (Berriman et al., 2005). O genoma nuclear contém um número indeterminado de cromossomos pequenos e médios (30 a 700 Kb) (Wickstead et al., 2004, Melville et al., 1998) conhecidos por codificar sequências semelhantes as regiões subteloméricas dos cromossomos grandes (Bringaud et al., 2002). Os cromossomos intermediários e os cromossomos pequenos são encontrados apenas em *T.*

*brucei* e sua função está exclusivamente relacionada ao processo de variação antigênica (Ersfeld, 2011).

Existem diversos estudos relacionados à caracterização da diversidade genética em *T. cruzi*, tendo em vista que diferentes grupos desse parasito apresentam diferenças na taxa de crescimento, constituição antigênica, patogenicidade, suscetibilidade à droga, número e tamanho de cromossomos e conteúdo do DNA, além de variação em seu aspecto morfológico, podendo apresentar formas delgadas, intermediárias e largas (Buscaglia and Di Noia, 2003). Em um primeiro momento, foram sugeridos duas principais linhagens, *T. cruzi I* e *T. cruzi II* (Zingales et al., 2009, Momen, 1999). Entretanto, estudos utilizando genes mitocondriais e nucleares, rDNA 24S $\alpha$ , dentre outros, indicaram a existência de uma terceira linhagem denominada *T. cruzi III* (Augusto-Pinto et al., 2003, de Freitas et al., 2006, Machado and Ayala, 2001, Robello et al., 2000). Em 2009, Zingales e colaboradores (Zingales et al., 2009) incluíram 3 novos grupos, *T. cruzi IV*, *V* e *VI*. Esses grupos incluíram, dentre outras cepas, as cepas híbridas que não puderam ser agrupadas em nenhuma das linhagens definidas anteriormente e que agora foram classificadas como *T. cruzi V* e *VI*.

Em *T. brucei* o mecanismo de geração de variabilidade é conhecido como variação antigênica. Como mencionado anteriormente, o *T. brucei* se reproduz extracelularmente no hospedeiro mamífero e não possui estágio intracelular, sendo, portanto, exposto ao constante ataque da imunidade mediada por anticorpos, que é contornado pelas VSGs. Os parasitos, entretanto, expressam um único tipo de VSG de cada vez ao longo da infecção. Essa VSG é trocada periodicamente por uma VSG imunologicamente distinta, possibilitando a evasão do sistema imune direcionado contra a VSG anterior, prolongando a infecção. As VSGs expressas são encontradas em sítios de expressão ativa e se localizam próximo aos telômeros. Há mais de 1000 VSGs inativas encontradas em regiões internas dos cromossomos, além da VSG expressa. É sabido que a recombinação é um dos mecanismos responsáveis pela troca de VSG expressa, o que permite a translocação de uma VSG inativa para o sítio de expressão ativa. Esse mecanismo permite também a geração de outras VSG ativas a partir de VSGs silenciosas ou pseudogenes de VSGs (Machado and Ayala, 2001, McCulloch and Horn, 2009, Stockdale et al., 2008).

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre em nível pós-transcricional. Em tripanossomatídeos, os transcritos primários constituem longas sequências de mRNA policistrônicos, nas quais os genes são separados por pequenas

sequências intergênicas. Apesar de pertencerem a uma mesma unidade gênica transcricional, genes diferentes podem apresentar padrões de expressão diferentes graças aos vários mecanismos de controle pós-transcricional presentes nesses organismos (Vanhamme and Pays, 1995). Assim, os principais processos pelos quais a expressão gênica é regulada nesses parasitos são o *trans-splicing* e poliadenilação do RNA, mecanismos que regulam a meia-vida do RNA e a síntese protéica (Teixeira and daRocha, 2003). Ávila e Goldenberg (2010) demonstraram que muitos genes, apesar de apresentarem transcrição constitutiva, têm seus mRNAs diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida em *T. cruzi*, mostrando assim um forte indício de que a regulação ocorre ao nível pós-transcricional.

Para se estudar o efeito da expressão gênica em diversos organismos, um método bastante utilizado atualmente é o silenciamento por interferência do RNA. Entretanto, dentre os tripanossomatídeos, somente o *T. brucei* apresenta o gene AGO1, bem como o ortólogo da Dicer, componentes da maquinaria de RNAi. O silenciamento por interferência do RNA é amplamente utilizado em *T. brucei* para a diminuição da expressão gênica (Shi et al., 2006a, Shi et al., 2006b).

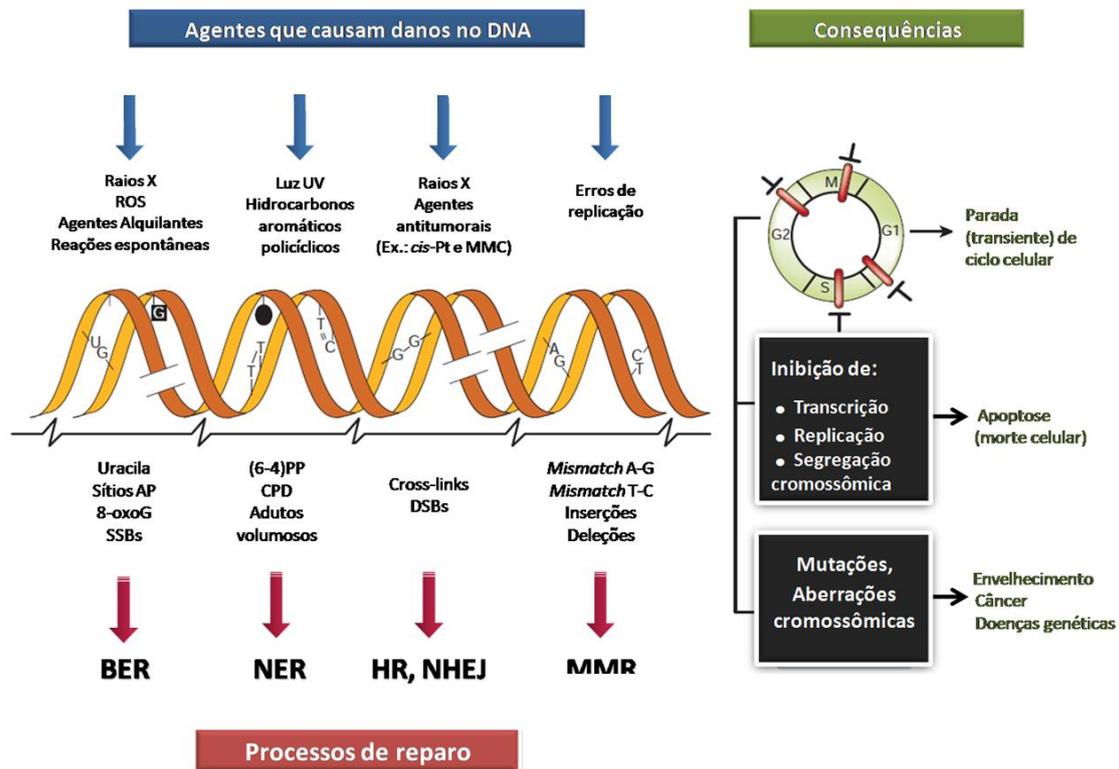
### 1.2 Reparo do DNA

A manutenção da integridade genômica é crucial para o metabolismo do DNA e depende de um correto funcionamento das maquinarias de replicação e reparo existentes, além de processos de recombinação (Buermeyer et al., 1999, de Boer, 2002). Como sabemos, o DNA está constantemente exposto a danos induzidos por agentes endógenos e exógenos. Dentre esses agentes podemos citar: (1) aqueles geradores de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, por exemplo), que são responsáveis por uma das lesões mais comuns sofridas pelo DNA, a produção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxoG) (Aust and Eveleigh, 1999, DeFedericis et al., 2006, Slupphaug et al., 2003); (2) o *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina ou MNNG, agente metilante altamente mutagênico e carcinogênico, capaz de desencadear uma interrupção no ciclo celular e/ou apoptose (Cejka and Jiricny, 2008, Beardsley et al., 2005); (3) o agente quimioterápico *cis*-diaminodicloroplatina (também conhecida como CDDP ou cisplatina), que induz à formação de adutos de platina na posição N7 de purinas do DNA e, se não reparados, podem levar à ativação de vias apoptóticas (Stojic et al., 2004); (4) e o agente alquilante metilmetanosulfonato ou MMS, que reage com o

DNA provocando metilação em guaninas (para 7-metilguanina) e adeninas (para 3-metiladenina) (Beranek, 1990, Lundin et al., 2005), o que pode levar ao bloqueio da replicação, resultando em parada de ciclo celular na fase S, aberrações cromossômicas, apoptose, entre outros (Engelward et al., 1998). Se esses danos gerados no DNA não são reparados, eles podem ocasionar mutações e resultar em disfunção celular, incluindo proliferação celular não controlada (de Boer, 2002).

Ao considerarmos a complexidade da molécula de DNA, diferentes tipos de lesões com os mais variados graus de severidade podem ser observadas, evidenciando a necessidade do reparo. O reparo do DNA é um processo bioquimicamente complexo, o qual emprega inúmeras proteínas que auxiliam na remoção de lesões e na manutenção da integridade do genoma. Sabe-se que a habilidade de um organismo de se reproduzir está fortemente relacionada ao desafio de copiar fielmente o seu genoma, além de manter sua estabilidade após sucessivos ciclos de divisão celular (Buermeyer et al., 1999, de Boer, 2002). Assim, o conhecimento acerca dos mecanismos de reparo de DNA é essencial ao entendimento do genoma de um indivíduo afetado ao longo do seu tempo de vida e como os processos de reparo de DNA são eficientemente conduzidos, através de diferentes caminhos.

As principais vias relacionadas ao reparo do DNA em eucariotos são o reparo por união de extremidades não-homólogas (NHEJ) e o reparo por recombinação homóloga (HRR), que lidam com quebras duplas no DNA (DSB); o sistema de reparo de erros de pareamento (MMR), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o reparo por excisão de bases (BER), cujos substratos são bases ou nucleotídeos aberrantes em uma das fitas do DNA ou alças de inserção/deleção (InDels); e o reparo por reversão da lesão (RL), que não requer molde para a síntese de DNA e tem como função principal a remoção de grupos metil anômalos ou dímeros de timina, sem causar quebra na dupla hélice (Figura 7). Estas vias operam de maneira coordenada de forma a minimizar o dano na informação genética. Como consequência, a perda de um destes mecanismos pode levar a um acúmulo de mutações e/ou morte celular (de Boer, 2002, Gill and Fast, 2007).



**Figura 7: Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências.** Exemplos de agentes que causam danos no DNA (porção superior), algumas lesões geradas por estes agentes (porção média) e mecanismos de reparo mais relevantes responsáveis por sua remoção ou correção (porção inferior). Consequências: a porção superior mostra os efeitos agudos de danos no DNA na progressão do ciclo celular, que resultam em atraso nas fases G1, S, G2 e M. A porção média mostra os efeitos agudos no metabolismo de DNA, que resultam em morte celular. A porção inferior mostra as consequências em longo prazo de injúrias no DNA, que incluem modificações permanentes na sequência de DNA (mutações de ponto, que afetam genes individuais, ou aberrações cromossômicas, que envolvem largas porções do cromossomo e podem afetar múltiplos genes) e seus efeitos biológicos. Abreviações: cis-Pt e MMC, cisplatina e mitomicina C, respectivamente (ambos fazem crosslinking com DNA); (6-4)PP e CPD, fotoproducto 6-4 e dímero de ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). Figura adaptada de Hoeijmakers (2001).

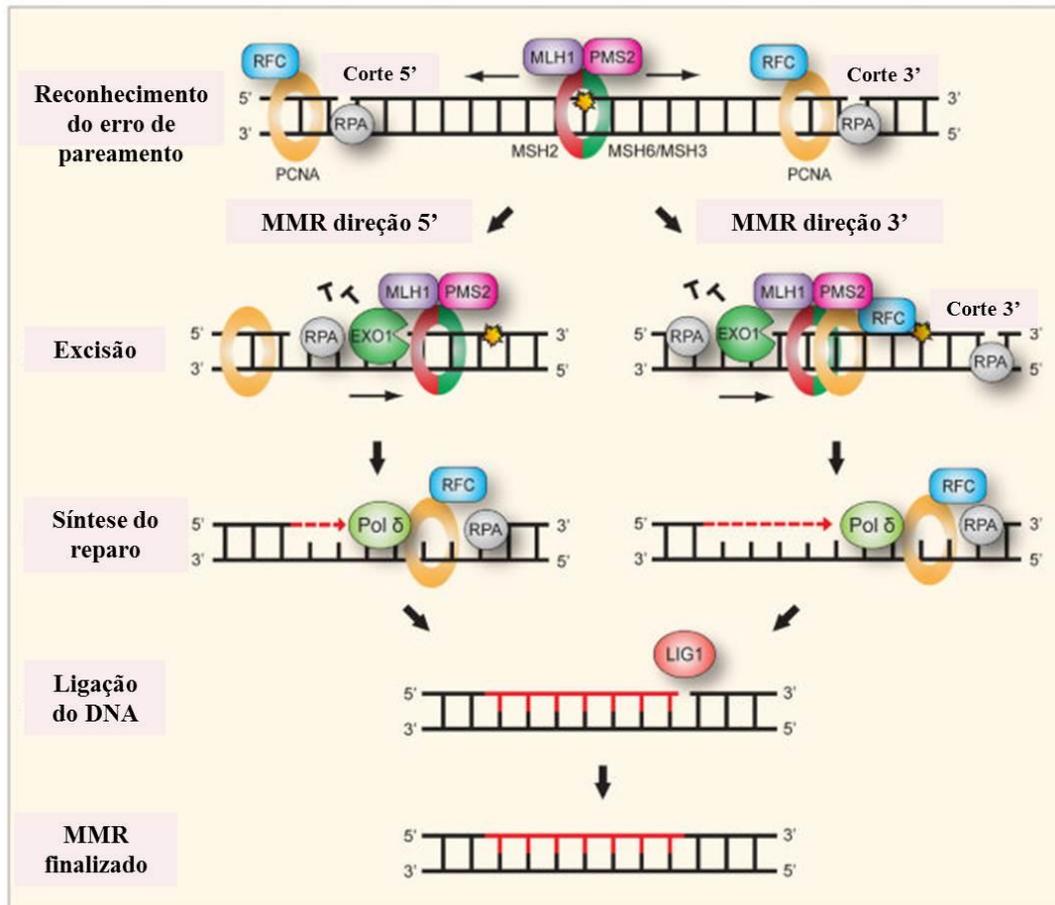
A maquinaria de reparo de DNA, em especial o MMR, é essencial para a manutenção da estabilidade do DNA. É importante ressaltar que essas vias não são suficientes para reparar todos os danos sofridos pelo DNA, o que de forma sutil permite a variabilidade genética (de Boer, 2002, Machado et al., 2006, Elena and Lenski, 2003).

O reparo de erro de pareamento (MMR) é a via encontrada em procariotos e eucariotos para correção de erros de pareamento de bases e alças de inserção/deleção (Indels) gerados durante a replicação e recombinação do DNA. Após o reconhecimento da lesão e da fita de DNA recém-sintetizada que carrega o erro de replicação, o MMR

pós-replicativo excisa o fragmento de DNA danificado, permite a ressíntese de DNA e a ligação dos fragmentos (Schofield and Hsieh, 2003, Passos-Silva et al., 2010).

Em procariotos, a via é iniciada com a presença das proteínas MutS, MutL (ambas ATPases) e MutH (endonuclease metil-dependente), que apresentam atividade específica para determinadas sequências (Junop et al., 2003). O reconhecimento do erro se dá através de um dímero MutS. Em seguida, o dímero MutL interage fisicamente com MutS e recruta MutH. A proteína MutH, ativada pelo dímero MutL, é capaz de reconhecer a fita recém sintetizada devido à presença de sequências GATC não metiladas e dá origem à excisão da base não pareada através de um corte na fita não metilada (Golyasnaya and Tsvetkova, 2006). Juntamente com a ação de outras proteínas como a UvrD (helicase II) e a SSB (*Single-Stranded DNA Binding protein*) uma sequência de DNA contendo a base incorreta é excisada e, através da ação da DNA polimerase III, uma nova fita é sintetizada e o corte selado pela DNA Ligase.

O conhecimento da via MMR em procariotos permitiu elucidar boa parte dessa via em eucariotos. Os homólogos para MutS e MutL, chamados MSH e MLH, respectivamente, formam heterocomplexos que exercem funções múltiplas, tais como reconhecimento e reparo de erros de pareamento, alças de inserções ou deleções e junções de *Holliday*. Isso evidencia que o MMR em eucariotos apresenta maior complexidade que em procariotos (Figura 8).



**Figura 8: Representação esquemática do sistema de reparo por erros de pareamento (MMR).** O mecanismo de reparo por erro de pareamento de bases (MMR) consiste de 4 fases consecutivas: (1) Reconhecimento e ligação do erro de pareamento ocorre através dos complexos MSH2-MSH6 ou MSH2-MSH3. MSH2-MSH6 reconhecem o erro de pareamento base-base, insere e deleta de 1 a 2 nucleotídeos no *loop*, enquanto MSH2-MSH3 tem preferência por uma grande inserção-deleção no *loop*. A ligação de MSH2-MSH6 (ou MSH2-MSH3) recruta o complexo MLH1-PMS2 para formar um complexo ternário. O PCNA recruta proteínas MMR para a forquilha de replicação enquanto RFC carrega PCNA. Um corte ou *gap* na fita de DNA específica é suficiente para direcionar o reparo nas direções 5' ou 3'. PCNA parece ser essencial para o direcionamento do MMR na direção 3' mas não na direção 5'. (2) A excisão é realizada pela exonuclese EXO1 (5'-3') em ambas as direções 3' e 5' do DNA. O MMR na direção 5' ocorre de forma direta pela atividade de EXO1, entretanto o MMR na direção 3' ocorre, de forma indireta, ou seja, primeiro a endonuclese PMS2 é ativada pela presença do corte 3' e estimulada por RFC, PCNA e ATP, introduzindo um segundo corte na direção 5' para que ocorra o reparo e finalmente, a EXO1 é ativada. RPA liga-se para proteger a fita simples do DNA durante a excisão e facilitar o reparo do DNA. (3) O reparo é realizado pela pol  $\delta$ . (4) A ligação dos cortes depois da síntese é realizada pela LIG1. Adaptado de Jeppesen (2011).

Como podemos notar, o estudo de proteínas relacionadas à via MMR é de suma importância para se entender os processos de manutenção da integridade do DNA. Duas

proteínas importantes envolvidas nesse processo são MSH1 e MSH2. Essas proteínas pertencem à classe MSH, que apresenta seis isoformas (MSH 1-6) (Marsischky et al., 1996, Fishel and Wilson, 1997, Reenan and Kolodner, 1992, New et al., 1993, Burns et al., 1994, Hollingsworth et al., 1995). A importância da proteína MSH1 para a manutenção da estabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA) já foi descrita em leveduras *S. cerevisiae* e sua mutação causa instabilidade em tais moléculas (Pogorzala et al., 2009, Mookerjee et al., 2005). Já a proteína MSH2, presente na maioria dos heterocomplexos funcionais, indica um papel central na execução do MMR no DNA nuclear de eucariotos (Alani et al., 1997). Além disso, esta proteína parece estar envolvida em uma via de proteção do DNA mitocondrial contra o dano oxidativo em *T. cruzi* (Machado-Silva et al., 2008), bem como no controle de danos oxidativos no DNA em fibroblastos de embriões de camundongo (Russo et al., 2009). A interação com homólogos de MutL e outras proteínas altera a especificidade de MSH2, permitindo que ela atue em substratos variados e vias diversas (Furtado, 2009).

O gene MSH2 já foi caracterizado em tripanossomatídeos. Em *T. cruzi*, a proteína MSH2 possui três isoformas protéicas distintas e cada uma pertencente a um haplogrupo de cepas, o que pode gerar variações na eficiência do MMR entre os haplogrupos do parasito (Augusto-Pinto et al., 2003). Campos e colaboradores (2010) a fim de investigar o papel do MMR em *T. cruzi* gerou linhagens heminocautes para o gene *Tcmsh2*, o que evidenciou que além do seu papel no MMR, a proteína TcMSH2 parece exercer uma função MMR independente importante na resposta ao estresse oxidativo. Em *T. brucei*, MSH2 foi estudada juntamente com MLH1 através de mutações nesses dois genes, o que resultou em uma diminuição da atividade de MMR nuclear (Bell and McCulloch, 2003). Além disso, a MSH2 em *T. brucei* (TbMSH2) parece ter um papel adicional no reparo de dano oxidativo, independente ao MMR (Machado-Silva et al., 2008).

Estratégias de manipulação gênica são de suma importância para entender a função gênica em um organismo. Dentre os diversos mecanismos utilizados para estudar a função gênica, podemos citar a deleção gênica, a super-expressão, o silenciamento, a complementação de mutantes, a inserção de gene repórter e a determinação da localização sub-celular da proteína. A utilização de organismos nocautes e heminocautes para uma proteína já conhecida como a MSH2 é importante para verificar se determinada proteína, no caso proteínas da família Y-box que podem

reconhecer lesão no DNA como citado anteriormente, são capazes de complementar a função desempenhada por aquelas proteínas com função de reparo já conhecidas.

### 1.3 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no balanço entre a produção de ROS (espécies reativas de oxigênios) e as defesas antioxidantes (Halliwell, 1994). As consequências desse estresse incluem modificações nas proteínas intracelulares, lipídeos e nos DNAs mitocondrial e nuclear (Brierley and Martin, 2013, Finkel and Holbrook, 2000).

ROS são radicais livres (moléculas com um elétron não pareado) derivado do oxigênio molecular sendo formados na célula como produtos secundários da respiração aeróbica. ROS envolve uma variedade de espécies químicas incluindo o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os quais podem ser gerados de forma exógena ou intracelular através de várias fontes diferentes (Finkel and Holbrook, 2000). A radiação ionizante, luz ultravioleta, toxinas do ambiente, quimioterápicos e citocinas inflamatórias são exemplos de processos exógenos produtores de ROS (Finkel and Holbrook, 2000). Quanto aos processos intracelulares, a maioria é derivado da fosforilação oxidativa mitocondrial, dessa forma, os complexos respiratórios doam elétrons para o oxigênio molecular produzindo ânions superóxidos e peróxidos (Tobe, 2013). A produção dos radicais superóxidos na mitocôndria ocorrem em dois pontos na cadeia transportadora de elétrons: o complexo I (NADH desidrogenase) e no complexo III (Ubiquinona-Citocromo C redutase), sendo que em condições metabólicas normais, o complexo III é o principal ponto de produção de ROS (Turrens, 1997).

O superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e os radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ) são considerados radicais livres verdadeiros uma vez que apresentam elétrons não pareados na camada de valência, já o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é definido como um agente pró-oxidante não-radical, e apesar de apresentar baixa reatividade, é capaz de gerar dano oxidativo uma vez que pode se difundir através de membranas biológicas e gerar o radical  $\bullet OH$  através das reações de Haber-Weiss (participação do  $O_2^{\bullet-}$ ) ou Fenton (catalisada por  $Fe^{2+}$ ). O radical  $\bullet OH$  é o mais potente oxidante conhecido, apresenta meia-vida curta ( $10^{-9}$ ), age no local gerado causando vários danos a macromoléculas ao seu redor como aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (Novo and Parola, 2008).

Vários tipos de modificações causadas por ROS ao DNA já foram identificadas, sendo estimada a formação de 10000 bases oxidadas por dia por célula de mamífero (Lindahl and Wood, 1999). Dentre essas modificações, podemos citar as lesões de bases, sítios AP, lesões de desoxirribose, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e *crosslinks*, muitas das quais apresentam propriedades citotóxicas e/ou mutagênicas (Cadet et al., 1997, van Loon et al., 2010). Dentre as lesões oxidativas mais comuns no DNA pode-se citar a 7,8-dihidro-8-oxoadenina (8-oxoA); uracila glicol; timina glicol; 5-hidroxicitosina (5-hidroxi-C); 5-hidroxiuracila (5-hidroxi-U); etenoadenina (eteno-A) e 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (faPy-A) (van Loon et al., 2010).

### 1.4 Proteínas da Família Y-box

As proteínas Y-box consistem de uma família de proteínas encontradas na maioria dos organismos vivos, com algumas exceções, como em *Saccharomyces cerevisiae* (Evdokimova et al., 2006). São proteínas multifuncionais que se ligam a DNA, a RNA e a uma variedade de proteínas. As proteínas Y-box estão envolvidas na replicação e reparo do DNA, transcrição, *splicing* do pré-mRNA e tradução do mRNA (Skabkina et al. 2005; Eliseeva et al. 2011) e no reparo de erro de pareamento de bases mitocondrial (de Souza-Pinto et al., 2009). Didier e colaboradores (1988) descreveram a primeira proteína Y-box em humanos (designada YB-1), capaz de interagir com o elemento Y-box presente na região promotora de genes. Tal elemento apresenta em seu núcleo a sequência invertida 5' – CCAAT – 3', capaz de interagir com diferentes famílias de fatores de transcrição (Dorn et al., 1987, Benoist and Mathis, 1990). Foi, então, demonstrado o papel da proteína YB-1 humana na regulação negativa da expressão do gene do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II, HLA-DRA. Desde então, outras proteínas similares a YB-1 foram descritas e formam a família de fatores que se ligam ao elemento Y-box e são expressas em diversos tecidos humanos, além de estarem presentes em outros organismos (Spitkovsky et al., 1992, Adams et al., 1995, Ito et al., 1994, Grant and Deeley, 1993, Tafuri and Wolffe, 1992, Skehel and Bartsch, 1994).

Proteínas Y-box possuem na sua extremidade amino-terminal um domínio conservado de ligação a ácidos nucleicos, o domínio de choque frio, do inglês *Cold Shock Domain* (CSD). Este domínio foi assim designado devido à sua semelhança com as proteínas de choque frio de *Escherichia coli* (CspA) e *Bacillus subtilis* (CspB)

(Wistow, 1990). Essas proteínas são expressas quando estas são submetidas a uma queda de temperatura (de 37°C para 10°C) e são responsáveis pela indução da expressão de genes de choque frio (Goldstein et al., 1990, Willimsky et al., 1992) que podem estar relacionados a eventos transcricionais, pós-transcricionais e traducionais (Horn et al., 2007). As estruturas tridimensionais de CspA e CspB já foram determinadas por difração de raios-X e por Ressonância Nuclear Magnética, mostrando que elas se enovelam como um  $\beta$ -barril fechado, composto por duas folhas  $\beta$  antiparalelas (Schindelin et al., 1993, Schnuchel et al., 1993, Newkirk et al., 1994, Mihailovich et al., 2010). O sítio de ligação aos ácidos nucleicos se encontra na superfície da folha  $\beta$  amino-terminal, onde existe um arranjo de aminoácidos positivos que podem interagir com os ácidos nucleicos, juntamente com as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (Schindelin et al., 1993). Todos esses resíduos são conservados no domínio CSD das proteínas que se ligam ao elemento Y-box. Na sua forma cristalizada, CspB forma um dímero que é estabilizado por seis pontes de hidrogênio ligando duas fitas  $\beta$  antiparalelas adjacentes (Schindelin et al., 1993). Kloks e colaboradores (2002), descreveram a primeira estrutura do domínio CSD de um membro eucariótico da família de proteínas Y-box, a proteína YB-1 de humanos. Os resultados demonstraram que as propriedades estruturais desse domínio são altamente conservadas de bactérias a humanos.

O domínio carboxi-terminal das proteínas Y-box não é muito conservado entre os vários membros da família. Em geral, proteínas Y-box de vertebrados apresentam, neste domínio, regiões alternadas de aminoácidos ácidos e básicos, apresentando um elevado conteúdo de argininas. Estes últimos estão tipicamente dispostos em grupamentos de até quatro resíduos, que são intercalados por regiões acídicas, formando o que se supõe ser um zíper de cargas. O zíper de cargas seria então responsável pela multimerização destes fatores, o que pode facilitar a interação destas proteínas tanto com DNA, quanto com RNA (Ozer et al., 1990, Ito et al., 1994, Wolffe et al., 1992, Tafuri and Wolffe, 1992, Wolffe, 1994). No entanto, quando isolados, estes domínios interagem fracamente com ácidos nucleicos (Matsumoto and Wolffe, 1998). Em invertebrados, tais como *Aplysia californica* e *Drosophila melanogaster*, o domínio carboxi-terminal não apresenta regiões acídicas e contém múltiplas repetições de argininas e glicinas (RGG) (Matsumoto and Wolffe, 1998). O motivo RGG está presente em proteínas que interagem com RNA. Alguns autores sugerem que a ligação

desse domínio ao RNA ocorre independente da sequência (Burd and Dreyfuss, 1994). Já em *Caenorhabditis elegans*, esse domínio apresenta motivos dedos de zinco, característicos de interação com DNA, mas também envolvidos em interações proteína-proteína. A exata função do domínio carboxi-terminal das proteínas Y-box ainda não é conhecida, mas, por ser a região mais distinta entre os vários membros da família, acredita-se que este possa ser responsável pelos distintos papéis biológicos desses fatores (Matsumoto and Wolffe, 1998).

As proteínas Y-box são consideradas reguladores multifuncionais de expressão gênica e, como tal, participam de uma variedade de funções celulares, tais como indução do sistema de reparo de DNA, proliferação celular, resistência a drogas e respostas a estresse por sinais extracelulares, além da regulação transcricional, pós-transcricional e traducional. Algumas dessas funções fazem com que as proteínas Y-box sejam importantes na proteção de células, principalmente de mamíferos, contra efeitos citotóxicos induzidos pelos danos no DNA (Kohno et al., 2003, Schitteck et al., 2007). Proteínas pertencentes a essa família podem atuar como um fator de transcrição oncogênico que são ativados em resposta a vários estresses genotóxicos (Hyogotani et al., 2012). Além disso, essas proteínas vêm sendo utilizadas como fator prognóstico de diversos tipos de câncer, sobretudo de mama, ovário, pulmão e osteosarcoma (Chatterjee et al., 2008), sendo utilizadas como marcador indicativo de tumores malignos (Eliseeva et al., 2011). São também consideradas como um alvo promissor para a terapia contra essa doença (Kuwano et al., 2004).

### **1.4.1 Proteínas Y-box e a Regulação Gênica**

Como já mencionado anteriormente, as proteínas da família Y-box podem participar na regulação gênica em nível transcricional, traducional e pós-transcricional. Entretanto o mecanismo particular de ação de YB-1 na transcrição gênica ainda não é bem estabelecido, embora exista muitos estudos sobre a transcrição de alguns genes regulados pelas proteínas da família Y-box. A proteína YB-1 pode ativar ou reprimir a transcrição gênica por diferentes vias, podendo interagir diretamente com os elementos Y-box e selecionar sequências para regular os genes alvos. Podem atuar mediando a expressão gênica de modo independente ao elemento Y-box interagindo com outros fatores de transcrição como o p53 (Okamoto et al., 2000), AP-1 (Lasham et al., 2000), smad3 (Higashi et al., 2003), além de se ligar a fita única nos promotores, conhecidas

como sítios sensitivos (S1), inibindo ou ativando outros fatores de transcrição do DNA (Kohno et al., 2003). Dessa forma, as proteínas da família Y-box podem interagir com o DNA quando este está associado com outras proteínas (Eliseeva et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que a proteína YB-1 pode estimular a transcrição do gene *MDR1* (gene de resistência a multidrogas) que codifica a P-glicoproteína (Stein et al., 2001, Toh et al., 1998). Estudos recentes demonstraram que a interação de YB-1 com o promotor *MDR1* é dependente da proteína APE1 formando complexo com a histona acetiltransferase p300. Evidenciando que YB-1 regula a transcrição do gene *MDR1* formando complexo com outras proteínas (Eliseeva et al., 2011). Por outro lado, as proteínas Y-box podem inibir a transcrição de genes como o *VEGF*. YB-1 interage com a fita não codificante do DNA e outra proteína Y-box (dbpA) interage com a fita codificante do DNA no promotor de *VEGF*, estabilizando a fita única do promotor evitando a interação com outros fatores de transcrição e levando assim a inibição da transcrição (Coles et al., 2002, Coles et al., 2005).

A proteína YB-1 também pode agir como ativador ou inibidor da tradução de acordo com a razão entre YB-1/mRNA nas células, entretanto a maioria dos trabalhos enfatizam a inibição desse processo (Kohno et al., 2003). Baixos níveis de YB-1 na célula facilita a ligação ao Cap do mRNA e ativa a tradução, enquanto altos níveis de YB-1 leva a inibição da interação de proteínas de ligação ao Cap e aumenta a estabilidade do RNA levando a inibição do processo de tradução (Evdokimova et al., 1998). A YB-1 é capaz de inibir a tradução em sistemas de células livres como também em culturas celulares de mamíferos (Sakura et al., 1988, Davydova et al., 1997, Minich et al., 1990, Evdokimova et al., 1995). A inibição da tradução é observada *a priori* no estágio de iniciação pela associação do mRNA com as subunidades pequenas ribossomais de modo que o mRNA é encontrado como um constituinte de mRNPs livres. YB-1 estimula a síntese de proteínas somente no estágio de iniciação sem nenhum efeito na elongação e terminação do processo de tradução (Evdokimova et al., 1998). A YB-1 desloca o Fator 4G inicial da tradução em eucariotos (eIF4G) do complexo no mRNA (Nekrasov et al., 2003) Assim, o domínio CSD de YB-1 interage com o Cap ou com as regiões adjacentes do mRNA, que resulta no deslocamento de eIF4F e suas subunidades eIF4G, eIF4A e eIF4B o que leva a inibição da tradução no estágio de iniciação (Nekrasov et al., 2003, Bader et al., 2003). Por outro lado, quando YB-1 é removida do lisado celular ou altas concentrações de mRNA são encontradas, a tradução é interrompida e ao adicionar YB-1 ao lisado celular, ocorre a ativação da

tradução (Evdokimova et al., 1998, Minich and Ovchinnikov, 1992, Matsumoto et al., 1996).

YB-1 e seus ortólogos podem eficientemente estabilizar os mRNAs prevenindo sua degradação em células e lisados celulares. O domínio CSD possui uma função crítica na estabilização do mRNA. A elevada razão de YB-1/mRNA promove a estabilização do mRNA, que está associada com a liberação do mRNA dos polissomos e da parada da sua tradução. A estabilidade do mRNA foi observada nos mRNAs de vida curta e de vida longa tal como o mRNA de *TNF $\alpha$*  (Evdokimova et al., 2001). Resumindo, a estabilização do mRNA causada pela ação de YB-1 ocorre por um mecanismo independente da desestabilização de elementos ricos em AU (*ARE AU-rich elements*) no 3' UTR do mRNA porém dependente da razão YB-1/RNA (Eliseeva et al., 2011).

### 1.4.2 Proteínas Y-box e o Reparo de DNA

Nos últimos anos, vários estudos vêm mostrando o papel das proteínas da família Y-box na resposta celular ao estresse causado por agentes genotóxicos. Inicialmente, proteínas da família Y-box foram caracterizadas como fatores de transcrição e como componentes do complexo mRNP, por se ligarem a RNA. Hasegawa e colaboradores (1991) mostraram que a proteína YB-1 se liga a uma grande variedade de sequências de DNA e essas ligações ocorrem de forma “promíscua”. Além disso, eles mostraram que YB-1 tem uma maior afinidade de ligação a DNAs depurinados do que a DNAs intactos e o grau de especificidade dessa interação com o DNA é influenciada pelo  $Mg^{2+}$ . A partir dessas observações, foi sugerido por esses autores que as proteínas YB-1 podem estar envolvidas também no reparo de DNA.

Já foi demonstrada a ação de YB-1 na resposta ao estresse celular causado por agentes genotóxicos como cisplatina, luz ultravioleta e mitomicina C e a sua interação com as DNA glicosilases NTHL1 (proteína de ligação a endonuclease III) e NEIL2 (uma DNA glicosilase bifuncional capaz de processar lesões, incluindo sítios AP, não somente na fita dupla, como também na fita simples do DNA) (Hasegawa et al., 1991, Izumi et al., 2001, Ohga et al., 1996, Ise et al., 1999). DNAs glicosilases são enzimas importantes na primeira fase do reparo por excisão de bases (BER), reconhecendo lesões e catalizando a liberação das nucleobases danificadas. Além disso, elas possuem

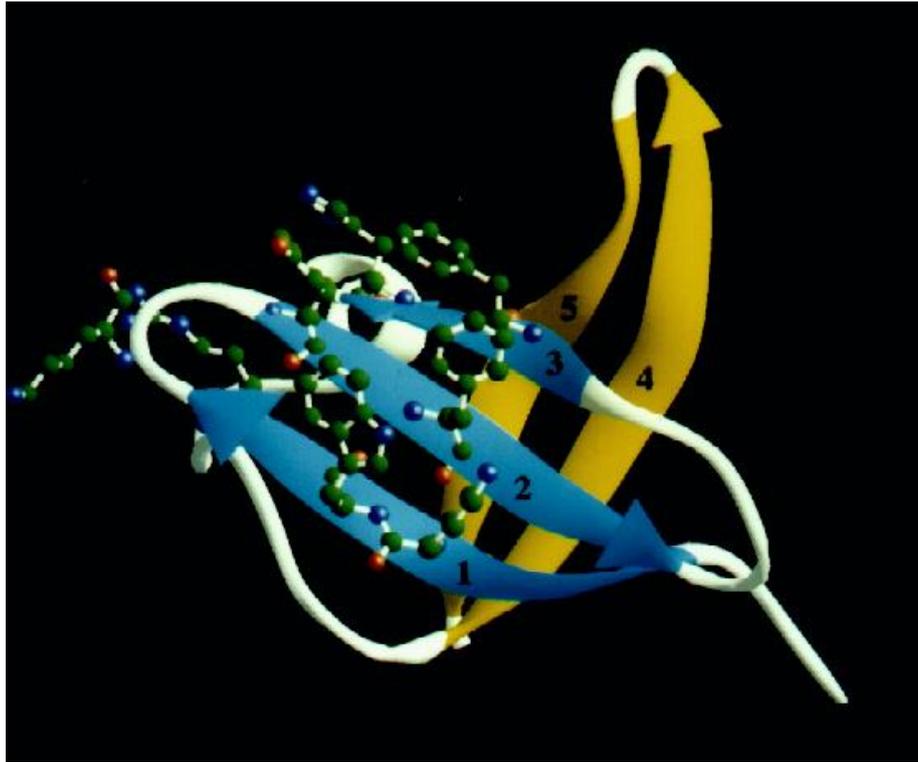
atividade de liase associadas aos sítios apurínicos/apirimidínicos (AP), quebrando a fita de DNA danificada no sítio abásico (Dianov and Allinson, 2007).

Em experimentos *in vitro* por cromatografia de afinidade e por análises de imunofluorescência foi demonstrado que várias proteínas de reparo do DNA podem interagir com YB-1, reforçando a hipótese que essa proteína multifuncional está envolvida no reparo dos danos no DNA (Gaudreault et al., 2004). O fato de YB-1 interagir com lesões e erro de pareamento de bases no DNA e atuar nas atividades das DNAs glicosilases NEIL2 e NTHL1 evidenciam que esta proteína possa atuar tanto na via de reparo por erro de pareamento de bases (MMR) quanto no BER.

### 1.4.3 A proteína SMYB1

Durante o programa de sequenciamento e identificação de transcritos de *S. mansoni* pela estratégia de produção de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs), foram isolados, de uma biblioteca de vermes adultos, cinco cDNAs que apresentavam similaridade ao cDNA codificador da proteína humana YB-1 (Franco et al., 1997a). A caracterização desses transcritos revelou que o cDNA completo codifica uma proteína de 217 aminoácidos, então designada SMYB1. Seu mRNA está presente em todas as fases do ciclo de vida do parasito, sendo sua expressão elevada em vermes adultos (Franco et al., 1997b).

A proteína SMYB1 possui uma massa molecular teórica de 23,9 KDa, com um domínio N-terminal (CSD) de 8,14 KDa e um domínio C-terminal (cauda) de 12,9 KDa. Seu domínio N-terminal apresenta em torno de 64% de similaridade com domínios de choque frio de outros membros da família de proteínas Y-box e é formado por 5 fitas  $\beta$  antiparalelas, divididas em 2 folhas  $\beta$ , formando um  $\beta$ -barril fechado (Franco et al., 1997b). Na superfície das folhas  $\beta$  encontram-se aminoácidos aromáticos e básicos, que são os supostos sítios de interação com os ácidos nucleicos. Em estudos de modelagem computacional por homologia com CspA e CspB foi demonstrado que o domínio CSD de SMYB1 tem uma topologia semelhante a estas proteínas bacterianas, sendo a região de ligação a ácidos nucleicos bastante conservada (Figura 9) (Franco et al., 1997b).



**Figura 9: Modelo estrutural proposto para o domínio CSD da proteína SMYB1 de *S. mansoni*.** O desenho mostra 5 fitas  $\beta$  anti-paralelas dispostas em 2 folhas  $\beta$  formando um  $\beta$ -barril fechado. Os resíduos hidrofóbicos e básicos, supostos sítios de interação com ácidos nucleicos, estão localizados na superfície da folha  $\beta$  amino-terminal mostrada em azul (Franco et al., 1997b).

O domínio C-terminal da proteína SMYB1 é extremamente básico, apresentando alto conteúdo de arginina (22,9 %) e glicinas (31,2 %). Tentativas de alinhar este domínio com outras proteínas Y-box demonstraram uma similaridade muito baixa, o que de certa forma não foi surpreendente, uma vez que as regiões carboxi-terminais das diversas proteínas Y-box não são muito conservadas. Para esse domínio foi então sugerida a formação de um sanduíche de folhas  $\beta$ , semelhante ao encontrado na fibroína da seda, onde as cadeias laterais das argininas estariam apontadas para fora e os hidrogênios das glicinas estariam voltados para a interface do sanduíche. Essa disposição é compatível com um domínio de interação inespecífica com ácidos nucleicos e, até mesmo, importante para interações com outras proteínas (Franco et al., 1997b).

Devido à similaridade de SMYB1 com proteínas Y-box de outros organismos, acrescido da importância das mesmas para o controle da expressão gênica, já foram realizados, pelo nosso grupo, diversos estudos funcionais com a proteína recombinante

MBP-SMYB1. Tais estudos caracterizaram-na como um membro da família de proteínas Y-box. Embora a exata função da proteína no parasito não tenha sido ainda determinada, deduz-se que ela esteja envolvida em processos de regulação gênica em *S. mansoni* (Valadao et al., 2002).

Em 2002, Valadão e colaboradores demonstraram por ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) que a proteína SMYB1 é capaz de interagir com moléculas de DNA fita dupla e fita simples e a oligonucleotídeos contendo o motivo CCAAT. Além disso, a proteína também é capaz de se ligar a moléculas de RNA independente da presença do motivo CCAAT. Foi verificado que a interação de SMYB1 com DNA ocorre principalmente através do domínio CSD, uma vez que o domínio CSD sozinho é suficiente para se ligar ao DNA e reconhecer oligonucleotídeos contendo o elemento CCAAT, enquanto que, para o domínio cauda (*Tail*) é necessário uma concentração bastante elevada de proteína para que ocorra tal ligação. Ao comparar as interações de SMYB1 com DNA e RNA foi verificado que estas exibem padrões distintos, uma vez que os dois domínios separados (CSD e cauda) ligam-se fracamente ao RNA, evidenciando que são necessários os dois domínios juntos para uma forte ligação ao RNA, enquanto o domínio N-terminal sozinho é suficiente para sua interação específica com o DNA (Valadao et al., 2002).

Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* por ensaio de duplo híbrido em leveduras e por *pull down*, respectivamente, que SMYB1 é capaz de interagir com uma proteína multifuncional de *S. mansoni*, a proteína SmPUR- $\alpha$  que é capaz de se ligar a sequências ricas em pirimidinas (de Oliveira et al., 2004). SMYB1 também é capaz de formar homodímeros e de se ligar com a proteína SmD3 semelhante a proteína de *Drosophila melanogaster* (SmRNP) importante na montagem de complexos de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNPs) (Valadão, 2002). Estes complexos são formados por pequenos RNAs e proteínas específicas (Lehmeier et al., 1990) que podem formar, por exemplos, os *spliceosomes*, onde eles catalizam o processamento dos precursores de mRNA. Foi verificado então que SMYB1 é capaz de formar homodímeros (SMYB1-SMYB1) e heterodímeros (SMYB1-SmPUR- $\alpha$  e SMYB1-SmRNP) e essas interações ocorrem através do domínio cauda de SMYB1 (Valadão, 2002). Só para ressaltar, a interação de SMYB1 com uma proteína envolvida no processamento do mRNA é bastante interessante e pode sugerir que ela participe da maquinaria molecular que regula, transporta e estabiliza as moléculas de RNA.

### 1.4.4 A proteína RBP16

RBP16 é uma proteína de *T. brucei* de ligação ao RNA mitocondrial, ortóloga de SMYB1 e pertencente à família Y-box, sendo capaz de regular a edição e a estabilidade do RNA (Hayman and Read, 1999, Pelletier and Read, 2003). A sequência do seu cDNA prediz uma proteína com massa molecular teórica de 16 KDa e, além disso, indica a presença de três regiões distintas: uma sequência importante de exportação e clivagem na mitocôndria, o domínio CSD N-terminal e a região C-terminal rica em argininas e glicinas (RGG) (Hayman and Read, 1999). A presença de uma sequência de *spliced leader* no cDNA de RBP16 indica que ela é codificada no núcleo, embora tenha sido purificada de vesículas mitocondriais (Hayman and Read, 1999). O seu transporte para a mitocôndria ocorre provavelmente por uma via de clivagem do peptídeo sinalizador para a sua localização naquela organela (Hayman and Read, 1999).

O domínio CSD de RBP16 exibe maior similaridade ao domínio CSD de proteínas procarióticas (43-46% de identidade) do que proteínas eucarióticas (33-38% de identidade). O domínio C-terminal RGG é composto por 57 aminoácidos, sendo 14% deles argininas e 32% glicinas. A presença do motivo RGG de ligação a RNA (Burd and Dreyfuss, 1994) reforça a capacidade desta proteína de interagir com moléculas de RNA (Hayman and Read, 1999). Dessa forma, a extensiva similaridade do domínio CSD de RBP16 com proteínas bacterianas de choque frio, proteínas Y-box de eucariotos e a presença do motivo RGG no domínio C-terminal define RBP16 como um membro da família de proteínas Y-box. A RBP16 foi o primeiro membro dessa família de proteínas identificada em protozoários, bem como em organelas (Hayman and Read, 1999).

A proteína RBP16 foi inicialmente identificada como uma proteína capaz de se ligar a moléculas de RNA mitocondrial, regulando a sua edição e estabilidade (Hayman and Read, 1999, Pelletier et al., 2000). Segundo esses autores, a proteína possui alta afinidade pela cauda oligo (U) dos RNAs guia (gRNAs). Os RNAs guias são RNAs pequenos que modificam a informação genética do RNA cinetoplastídeo pela adição e/ou deleção de resíduos de uridina, durante a edição do mRNA mitocondrial em tripanossomatídeos (Blum et al., 1990, McManus et al., 2000). Os gRNAs apresentam uma âncora na região 5', uma sequência com a informação dos nucleotídeos que serão inseridos e uma cauda oligo (U) na região 3' (Blum et al., 1990, Stuart and Panigrahi, 2002). O processo de edição do mRNA inicia pela formação de um duplex formado pela

âncora da região 5' do gRNA e pela sequência da região 3' do pré-mRNA a ser editado, esse duplex (pré-mRNA-gRNA) interage com um complexo multiprotéico que catalisa a edição do mRNA. A porção central de cada gRNA contém a sequência da informação genética que permite a edição de 25 a 35 nucleotídeos no mRNA pela inserção e/ou deleção de resíduos de uridinas (Stuart and Panigrahi, 2002). Em experimentos *in vitro*, foi demonstrado que o domínio CSD de RBP16 é o responsável pela alta afinidade da proteína à cauda oligo (U) dos gRNAs. Já o domínio C-terminal exibe baixa afinidade por essas regiões, e está relacionado ao anelamento do pré-mRNA com os gRNAs. Utilizando experimentos de imunoprecipitação e estudos de *crosslinking*, Hayman e Read (1999) mostraram que RBP16 é capaz de se ligar a aproximadamente 30% dos gRNAs totais.

Foi demonstrado também que RBP16 é capaz de se associar aos rRNAs 9S e 12S, sugerindo funções regulatórias da expressão gênica mitocondrial. Em especial, RBP16 atua na regulação da estabilidade de um subconjunto de mRNAs na mitocôndria de *T. brucei* (Hayman and Read, 1999, Militello et al., 2000, Goulah and Read, 2007). Essa habilidade de RBP16 de se ligar a várias classes de RNA sugere o desempenho de múltiplas funções na expressão gênica mitocondrial de *T. brucei*, como tem sido evidenciado em proteínas Y-box em outros sistemas (Matsumoto and Wolffe, 1998).

A proteína RBP16 é também capaz de interagir com outras proteínas. Um exemplo é a p22, uma proteína mitocondrial presente em *T. brucei* similar à proteína p32 humana, que é um componente do fator de *splicing* de pré-mRNA ASF/SF2 (Krainer et al., 1991, Hayman et al., 2001). Essa função de RBP16 vem ao encontro das propriedades de ligação a proteínas desempenhada por membros da família Y-box (Matsumoto and Wolffe, 1998).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa avaliar o papel da proteína SMYB1 de *S. mansoni* e do seu ortólogo RBP16 de *T. brucei* na proteção contra o estresse oxidativo em tripanossomatídeos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1- Imunolocalizar a proteína SMYB1 nas diversas fases do ciclo de vida do parasito *S. mansoni*.
- 2- Superexpressar a proteína SMYB1 em clones de *T. cruzi* heminocautes para o gene *MSH2* e avaliar o comportamento dos clones frente ao estresse oxidativo.
- 3- Expressar a proteína SMYB1 em clones de *T. brucei* nocautes para o gene *MSH2* e avaliar o comportamento dos clones frente ao estresse oxidativo.
- 4- Realizar o silenciamento pelo mecanismo de RNA de interferência do transcrito de RBP16 em parasitos de *T. brucei* selvagens e avaliar o comportamento dos clones frente a agentes genotóxicos.

# **3. METODOLOGIA**

### 3.1 Ensaio com o *S. mansoni*

#### 3.1.1 Localização subcelular da proteína SMYB1 nas diversas fases do ciclo de vida de *S. mansoni* por ensaios de imunohistoquímica

Secções parafinizadas de vermes adultos machos e fêmeas e fígados de camundongos infectados com ovos de *S. mansoni* foram desparafinizadas em três banhos de xilol, hidratadas em uma série de banhos de etanol (duas vezes em etanol 100 % e uma vez em etanol em cada uma das concentrações de 95, 70, 50 e 25 %) e então lavadas três vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4 %. Após isso, foram lavadas novamente três vezes com PBS e permeabilizadas com solução de PBS com 0,1 % de Triton X-100. Logo após, as amostras foram bloqueadas em solução de bloqueio ((PBS – Tween 0,05 % com 10 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*)) em câmara úmida a 4 °C por aproximadamente 16 horas. Depois de bloqueadas, as amostras foram incubadas por 16 horas em câmara úmida com anticorpo de coelho anti-SMYB1 diluído 1:30 em solução de bloqueio diluída 10 vezes em PBS. Para o controle negativo, o soro pré-imune do coelho imunizado para produção do soro anti – SMYB1 foi utilizado nestas mesmas condições. As lâminas foram então lavadas por cinco vezes em PBS e incubadas por 1 hora em câmara úmida com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Cy-5 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.), diluído 1:400 e faloidina – Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluída 1:50 para marcação dos filamentos de actina, em solução de bloqueio diluída 10 vezes. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com iodeto de propídio (20 µg/µL) diluído 1:1500 em solução de bloqueio diluída 10 vezes por 10 minutos em câmara úmida. Por fim, mais uma etapa de lavagem foi realizada e as lâminas foram montadas utilizando solução de montagem (10 % Tris HCl 1 M pH 8,0 e 90 % de glicerol). Os anticorpos policlonais anti-MBP/SMYB1 (anti-SMYB1) utilizados nesse trabalho foram obtidos por Valadão (1998). Os vermes adultos e os ovos parafinizados foram gentilmente cedidos pela Dra. Cíntia Rezende (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB – UFMG).

Além do protocolo acima descrito, que envolveu secções de vermes adultos e ovos, outro, denominado *whole mount*, foi também empregado para os experimentos de imunohistoquímica. Este protocolo utiliza amostras dos organismos inteiros e não secções dos mesmos e foi utilizado para os estágios de cercária, miracídio e esquistossômulo.

Para estes experimentos foram utilizados aproximadamente 50 µL de solução contendo cercárias, 100 µL de solução contendo miracídios e 100 µL de solução contendo esquistossômulos previamente fixados em Omnifix. Os parasitos foram incubados com 1 mL de solução permeabilizante (0,1 % Triton X-100, 1 % p/v BSA e 0,1 % p/v azida sódica em PBS pH 7,4) por 3 horas a 4 ° C sob agitação. As amostras foram, em seguida, incubadas com o anticorpo anti-SMYB1 diluído 1:60 em solução permeabilizante a 4 °C por aproximadamente 16 horas. Para o controle negativo, o soro pré-imune foi utilizado nestas mesmas condições. Procedeu-se com seis lavagens de 15 minutos cada em solução permeabilizante a 4 °C e as amostras foram então incubadas por 4 horas com anticorpo secundário diluído 1:1000 em solução permeabilizante contendo faloidina – Alexa Fluor 488 diluída 1:200. Após isso, a solução foi trocada para uma contendo iodeto de propídio diluído 1:5000 em solução permeabilizante na qual as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4 °C. Prosseguiu-se com cinco lavagens com solução permeabilizante e as lâminas foram montadas utilizando solução de montagem. As cercárias, os esquistossômulos e os miracídios utilizados foram gentilmente cedidos pela Dra. Marina de Moraes Mourão (CPqRR/FIOCRUZ).

As fluorescências foram diretamente capturadas em microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 META utilizando lentes objetivas de imersão com um aumento de 63x no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas com o programa Zeiss LSM Image Examiner e capturadas com o auxílio do Prof. Dawidson Assis Gomes (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB – UFMG). O programa Photoshop CS3 versão 10.0 foi utilizado para a montagem final das figuras.

### **3.2 Ensaaios com o *T. cruzi***

#### **3.2.1 Superexpressão da proteína SMYB1 em clones de *T. cruzi* heminocautes para o gene *MSH2***

##### **3.2.1.1 Amplificação do cDNA de SMYB1 e construção do plasmídeo recombinante pGEM-SMYB1**

O fragmento de cDNA codificador de SMYB1 foi amplificado através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir da biblioteca AW2 de cDNA de vermes

adultos produzida pela Rede Genoma de Minas Gerais (<http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br/content/Schistosoma-mansoni-transcriptome-project>). A amplificação foi realizada utilizando os iniciadores YBfwXbaI (5'-TCTAGAATGGCGGACACTAGACC-3' e YBrevSalI (5'-GTCGACGATCAGAGAATTTTAAGCGTC-3'), apresentando sítios para as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI*, respectivamente (o sítio de restrição de cada enzima está sublinhado na sequência do iniciador correspondente). A reação de PCR continha 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B 1x (Phoneutria - 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,05 U da enzima AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen) e 1 µL de cDNA (proveniente da biblioteca) em um volume final de 10 µL. A reação foi realizada em termociclador PT-100 utilizando o seguinte programa:

- primeira desnaturação a 95 °C por 6 minutos e 25 ciclos de:

- desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
- anelamento dos iniciadores a 58 °C por 1 minuto;
- extensão a 72 °C por 1 minuto;

- extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após a PCR, o produto da amplificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio utilizando tampão TAE e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). O fragmento de interesse de 678 pb foi puncionado do gel e purificado utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme especificação do fabricante. O DNA recuperado foi ressuspendido em um volume final de 30 µL de água MiliQ autoclavada. Em seguida, incubou-se todo o produto da purificação com 200 µM de dATP, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B 1x. Essa etapa foi realizada uma vez que a enzima AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase tem atividade exonucleásica 3' – 5' capaz de remover as deoxiadeninas 3' terminais dos produtos de PCR. As deoxiadeninas são necessárias para a ligação ao vetor pGEM-T, que apresenta deoxitimidinas terminais. A reação foi então levada para termociclador PT-100 à temperatura de 72 °C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi purificada utilizando-se Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, como descrito acima.

O amplicon gerado foi então clonado no vetor pGEM-T (Promega) (NCBI gi: 5701825 e mapa do vetor no Anexo I) conforme instruções do fabricante. A ligação foi

realizada durante a noite a 4 °C. O plasmídeo gerado (pGEM-T-SMYB1) (3 µL da ligação) foi usado na transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes (60 µL). Para a transformação, as células incubadas com o plasmídeo foram submetidas a uma descarga elétrica de 3400 volts por 2,5 milisegundos em eletroporador (BioRad). Em seguida foram adicionados 500 µL de meio 2xYT líquido (1,6 % p/v bactotripton, 1,0 % p/v extrato de levedura e 0,5% p/v NaCl) e as células foram incubadas por 45 minutos a 37 °C sob agitação (180 rpm). Uma alíquota das células transformadas foi plaqueada em placas de cultura contendo 2xYT ágar (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% de ágar) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Algumas colônias foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto através de PCR de colônias. Os clones selecionados foram isolados direto da placa (utilizando-se um palito estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. Cada reação continha 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador (YBfwXbaI e YBrevSalI), 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B (Phoneutria) em um volume final de 10 µL. Foi também produzido um controle negativo (sem adição de DNA). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PT-100 utilizando o mesmo programa já descrito anteriormente.

Após a PCR, os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder). Para obtenção do DNA plasmidial foram selecionados três clones positivos, os quais foram inoculados em tubos contendo 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A incubação foi feita por 16 horas a 37 °C sob agitação a 180 rpm. Os DNAs plasmidiais foram então purificados utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) conforme especificação do fabricante e dosados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

Aproximadamente 250 ng de cada plasmídeo foram utilizados para sequenciamento em MegaBACE 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare), utilizando 10 pmol do iniciador e 4 µL do kit DYEnamic ET Dye Terminator – MegaBACE (GE Healthcare). A qualidade das sequências obtidas foi aferida através dos parâmetros de PHRED (Ewing and Green, 1998, Ewing et al., 1998), utilizando a ferramenta PHPH (disponível em <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). As sequências geradas

foram alinhadas utilizando os softwares MultAlin (Corpet, 1988) e analisadas conforme similaridade com ESTs de *S. mansoni*, utilizando a ferramenta BLASTN (Altschul et al., 1990).

### 3.2.1.2 Construção do plasmídeo recombinante pROCK-SMYB1

O plasmídeo recombinante pGEM-T-SMYB1 foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI* (Promega) para liberar o fragmento SMYB1 e o vetor pROCK-Rev1 (mapa do vetor no Anexo II) foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *SlaI* para retirar o fragmento *Rev1* de aproximadamente 1800 pb, deixando as pontas livres para a ligação de SMYB1. As condições de digestão foram iguais para os dois vetores, sendo utilizados ~2µg de DNA. As digestões foram feitas em tampão D (Promega), na concentração especificada pelo fabricante, com 1 U de cada enzima e 1 µg/µL de BSA. As reações foram incubadas a 37° C durante a noite. Só para ressaltar, a sequência do gene SMYB1 apresenta o sítio da enzima *SlaI* e por isso a enzima *SalI*, que gera um sítio compatível para a ligação de fragmentos gerados pela digestão com a enzima *SlaI*, foi utilizada para a liberação do gene SMYB1 do vetor pGEM-T.

As digestões foram visualizadas em gel de agarose 1% em tampão TAE, corado com brometo de etídio, utilizando-se, para comparação, os vetores pGEM-T-SMYB1 e pROCK-Rev1 não digeridos. O fragmento de interesse de 678 pb (SMYB1) proveniente do pGEM-T-SMYB1 e o vetor pROCK digerido proveniente de pROCK-Rev1 (8000 pb) foram puncionados do gel e purificados utilizando-se Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, conforme especificação do fabricante, sendo, então, ressuspensos em um volume final de 40 µL de água MiliQ autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

A ligação do fragmento correspondente ao cDNA codificador para SMYB1, purificado na etapa anterior, ao vetor de superexpressão pROCK foi feita obedecendo-se a razão molar fragmento/vetor igual a 3:1. A ligação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 6 unidades de T4 DNA ligase (GE Healthcare) em tampão de ligação. Foram utilizados ~50 ng de vetor e ~1,8 µg do fragmento para a ligação. A reação foi incubada a 16° C por 16 horas.

O plasmídeo gerado (pROCK-SMYB1) foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes (60 µL). A presença do fragmento foi então verificada por PCR de colônias e 3 clones foram selecionados e sequenciados. O protocolo para a

transformação, a PCR de colônias, a miniprep e o sequenciamento foram realizados conforme descrito no item 3.2.1.1.

### **3.2.1.3 Transfecção do parasito *T. cruzi* selvagem e do parasito *T. cruzi* heminocaute para o gene *MSH2***

Formas epimastigotas do clone CL Brener selvagem e heminocaute para o gene *MSH2* (*MSH2+/-*) (Campos *et al.*, 2010) de *T. cruzi*, foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone - liver digest neutralized* 5mg/mL, NaCl 4 mg/mL, bactotriptose 5 mg/mL, KCl 0,4 mg/mL, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mg/mL, dextrose 2 mg/mL, hemin 0,2 % 10 mL em NaOH 0,05 M, pH 7,3) contendo 10 % de soro fetal bovino (Cultilab) e os antibióticos penicilina (100 U/mL e estreptomicina (100 µg/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) contendo eritrosina (4 %) e posteriormente, os parasitos vivos foram contados em câmara citométrica de Neubauer.

A transfecção dos parasitos foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Para cada transfecção, 100 µg do vetor apropriado pROCK-SMYB1 ou pROCK foram linearizados com a enzima *NotI*, precipitados com isopropanol e solubilizados em 50 µL de água miliQ estéril. Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados em PBS e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8,0, e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a uma concentração final de 1 x 10<sup>8</sup> células/mL. Em uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser* de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de pROCK-SMYB1. Em seguida foi aplicado o choque elétrico de dois pulsos de 0,3 kV e 500 µF, com intervalos de 30 segundos entre cada pulso utilizando o aparelho *Bio-Rad gene pulser*. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo onde sofreram seleção por aproximadamente 6 semanas através do cultivo na presença dos antibióticos apropriados para cada cultura. Para *T. cruzi* selvagem transfectado com vetor pROCK-SMYB1 e com pROCK vazio foi utilizado 200 µg/mL de antibiótico G418, similar a neomicina. Para a cultura de *T. cruzi* heminocaute transfectada com o vetor pROCK-SMYB1 e com o vetor pROCK vazio, além de 200

$\mu\text{g/mL}$  de G418 foi utilizado também 200  $\mu\text{g/mL}$  de higromicina, que é a droga de seleção dos heminocautes.

Com a transfecção, foram gerados os seguintes parasitos, utilizados posteriormente nesse estudo: selvagem (TcWT), selvagem com o vetor pROCK-SMYB1 (TcWT-SMYB1), selvagem com o vetor vazio pROCK (TcWT-pROCK), heminocaute (TcMSH2+/-), heminocaute com o vetor pROCK-SMYB1 (TcMSH2-SMYB1) e heminocaute com o vetor pROCK vazio (TcMSH2-pROCK).

### 3.2.2 Avaliação da expressão do gene SMYB1 em parasitos *T. cruzi*

Formas epimastigotas das culturas TcWT, TcWT-SMYB1, TcMSH2 e TcMSH2-SMYB1 em fase exponencial de crescimento foram utilizadas para a extração de RNA total. A extração de RNA total foi feita através da utilização do TRIzol® Reagent (Invitrogen) e do RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Os protocolos de ambos foram combinados de forma a obter uma amostra mais limpa e de melhor qualidade. Aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/mL foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Os sedimentos obtidos foram lavados em PBS 1X, centrifugados e ressuspendidos em 800  $\mu\text{l}$  de Trizol (Invitrogen Life Technologies). Após 5 min de repouso à temperatura ambiente, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio e a solução foi novamente deixada em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada por 15 min a 9000 rpm a 4°C e a fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo tubo. Foi então adicionado 1 volume de etanol 75% gelado à fase aquosa e a solução resultante foi transferida para a mini coluna do Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Realizou-se então uma centrifugação por 15 min a 9000 rpm a 4°C. Após, seguiu-se o protocolo do Kit RNeasy Mini Kit a partir da adição do tampão RW1.

Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I *RNase-Free* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico. Para comprovar que o RNA não estava contaminado com DNA genômico foi realizada PCR, com volume final de 15  $\mu\text{l}$ , contendo 1  $\mu\text{l}$  do RNA, 1X de tampão de reação 10X PCR Buffer, minus Mg, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador GAPDH2fw *Forward* (5'- CGGTGGACGGTGTGTCGGTG -3') e GAPDH2rev *Reverse* (5'- CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG -3'), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP e 1 unidade de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Ambion®).

A reação foi realizada em termociclador PT-100 utilizando o seguinte programa:

- primeira desnaturação a 95 °C por 6 minutos e 25 ciclos de:
  - desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
  - anelamento dos iniciadores a 60 °C por 1 minuto;
  - extensão a 72 °C por 1 minuto;
- extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após a PCR, o produto da amplificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio utilizando tampão TAE e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen).

Com o intuito de verificar a integridade e qualidade do RNA, 1 µg da amostra foi analisado por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% (p/v) (MOPS 1X, formaldeído 5%) corado com brometo de etídio. As amostras de RNA foram então quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Um micrograma de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, que foi realizada utilizando iniciadores oligodT e o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do cDNA codificador da proteína SMYB1 foi realizada utilizando os iniciadores YBfwXbaI e YBrevSalI. O protocolo para a PCR foi realizado conforme descrito no item 3.2.1.1.

### **3.2.3 Tratamento dos parasitos *T. cruzi* com diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio**

Para a curva de sobrevivência, os parasitos WT, TcWT-SMYB1, TcWT-pROCK, TcMSH2+/-, TcMSH2-SMYB1 e TcMSH2-pROCK com concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL foram expostas a doses de 50, 75 e 100 µM de peróxido de hidrogênio (Sigma) por 20 minutos em PBS. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, ressuspendidas em meio LIT e distribuídas em alíquotas de 1 mL em placas contendo 24 poços e mantidos em câmara úmida. Controles foram realizados na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após 72 horas a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica de Neubauer, na presença do corante vital eritrosina. A média dos valores obtidos foi plotada em uma curva de sobrevivência com desvio padrão. Para as análises estatísticas foram usados os *software GraphPad Prism*.

### 3.2.4 Imunolocalização de SMYB1 nos diferentes clones de *T. cruzi*

A localização de SMYB1 em formas epimastigotas do clone selvagem (TcWT-SMYB1) e heminocaute MSH2+/- (TcMSH2-SMYB1) de *T. cruzi*, tratados (75µM de peróxidos de hidrogênio) e não tratados, foi realizada através de imunolocalização com anticorpo policlonal anti-MBP/SMYB1 (anti-SMYB1) (Valadão, 1998). Os parasitos foram sedimentados por centrifugação e concentrados para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em PBS. Dez microlitros da suspensão celular foram aplicados em lâmina e tratada com solução de PBS suplementada com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e as células foram incubadas com PBS + Triton X-100 0,1% por 5 minutos, lavadas novamente e bloqueadas com PBS + BSA 1% por 30 minutos. Anticorpos primários anti-SMYB1 foram diluídos na proporção 1:60 em PBS + 0,1% de BSA e aplicados na lâmina por 16 horas. No dia seguinte a lâmina foi lavada e incubada por 1 hora em câmara úmida com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Cy-5 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) diluído 1:400 em PBS. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com DAPI na concentração de 10 µg/mL. As lâminas foram então seladas com *Vectashield* e as imagens capturadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon E600 equipado com uma câmera DXM 1200 F. As imagens foram analisadas utilizando os Programas Photoshop CS3 versão 10.0 e Image J.

### 3.3 Ensaaios com o *T. brucei*

#### 3.3.1 Expressão da proteína SMYB1 em *T. brucei* nocaute para o gene *MSH2*

##### 3.3.1.1 Amplificação do cDNA de SMYB1 e construção do plasmídeo recombinante pGEM-SMYB1

A amplificação do cDNA codificador da proteína SMYB1 foi realizada utilizando os iniciadores YBfwEcoRV (5`-GATATCATGGCGGACTAGACC-3`) e YBrevMluI (5`-ACGCGTGATCAGAGAATTTTAAGCGTC-3`), apresentando sítios para as enzima de restrição *EcoRV* e *MluI*, respectivamente (o sítio de restrição de cada enzima está sublinhado na sequência do iniciador correspondente). A reação de PCR continha 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de Phusion<sup>®</sup> High-

Fidelity Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) em tampão de reação HF 5x (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) e 2 µL de cDNA (proveniente da biblioteca AW2), em um volume final de 50 µL. A reação foi realizada em termociclador (TECHNE-TC-3000) utilizando o seguinte programa:

- primeira desnaturação a 98 °C por 30 segundos e 35 ciclos de:

- desnaturação a 98 °C por 10 segundos;
- anelamento dos iniciadores a 58 °C por 30 segundos;
- extensão a 72 °C por 40 segundos;

- extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a PCR, a amplificação foi avaliada utilizando eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com *SYBR*<sup>®</sup> *Safe* (Life Technologies) e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). O fragmento de interesse de 678 pb foi puncionado do gel e purificado utilizando-se o *Kit Qiaquick gel extraction* (Qiagen) conforme especificação do fabricante. O DNA recuperado foi ressuspendido em um volume final de 30µL de água MiliQ autoclavada. Em seguida, incubou-se todo o produto da purificação com 200 µM de dATP, 1 U de Taq Thermo DNA polimerase (New England Biolabs) em tampão de reação 1B 1x para adição de deoxiadeninas na extremidade 3' dos produtos de PCR. A reação foi então levada para termociclador (TECHNE-TC-3000) sob temperatura de 72 °C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi purificada utilizando-se o *Kit Qiaquick gel extraction* (Qiagen), como descrito acima.

O amplicon gerado foi então clonado no vetor pGEM-T (Promega) (NCBI gi: 5701825) conforme instruções do fabricante. A ligação foi realizada durante a noite a 4 °C. O plasmídeo gerado (pGEM-SMYB1) (3 µL) foi usado na transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes (50 µL). Para a transformação, as células incubadas com o plasmídeo foram mantidas no gelo por 30 minutos. Em seguida, foram submetidas ao choque térmico, com incubação por 30 segundos a 42 °C e incubadas imediatamente no gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 250 µL de meio líquido *Luria Broth* (LB - 0,5% extrato de levedura, 0,1% triptona, 0,5% NaCl pH 7,0) e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação (180 rpm). Uma alíquota das células transformadas foi plaqueada em placas de cultura contendo meio LB ágar 0,5% extrato de levedura, 1% g triptona, 0,5% NaCl, pH 7.0) e 1,2% ágar

(Melford), suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Algumas colônias foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto utilizando PCR de colônias. Os clones selecionados foram isolados direto da placa (utilizando-se um palito estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. Cada reação continha 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador (YBfwEcoRV e YBrevMluI), 1,25 U Taq DNA polimerase (New England Biolabs) em tampão de reação *ThermoPol* 1x (10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Triton X-100, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) em um volume final de 25 µL. Foi também produzido um controle negativo (sem adição de DNA). A reação foi realizada em termociclador (TECHNE-TC-3000) utilizando o seguinte programa:

- primeira desnaturação a 95 °C por 30 segundos e 30 ciclos de:

- desnaturação a 95 °C por 20 segundos;
- anelamento dos iniciadores a 58 °C por 30 segundos;
- extensão a 72 °C por 40 segundos;

- extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a PCR, a amplificação foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com *SYBR*<sup>®</sup> *Safe* e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). Para obtenção do DNA plasmidial foram selecionados três clones positivos, os quais foram inoculados em tubos contendo 3 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A incubação foi feita por 16 horas a 37 °C sob agitação a 230 rpm. Os DNAs plasmidiais foram então purificados utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) conforme especificação do fabricante e a amostra quantificada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

O sequenciamento do DNA plasmidial foi realizado através do serviço de sequenciamento da University of Dundee ([www.dnaseq.co.uk](http://www.dnaseq.co.uk)). A qualidade das sequências obtidas foi aferida através dos parâmetros de PHRED (Ewing and Green, 1998, Ewing et al., 1998), utilizando a ferramenta PHPH (disponível em <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). As sequências geradas foram alinhadas utilizando os softwares MultAlin (Corpet, 1988) e analisadas conforme similaridade com ESTs de *S. mansoni*, utilizando a ferramenta BLASTN (Altschul et al., 1990).

### 3.3.1.2 Construção do plasmídeo recombinante pRM482-SMYB1

O plasmídeo recombinante pGEM-SMYB1 foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRV* e *MuI* (New England Biolabs) para liberar o fragmento SMYB1. Da mesma maneira, o vetor pRM482 (Proudfoot and McCulloch, 2005) foi digerido com essas enzimas para deixar as extremidades livres para a ligação de SMYB1. As condições de digestão foram iguais para os dois vetores, sendo utilizados ~2 µg de DNA. As digestões foram feitas em tampão apropriado para cada enzima, na concentração especificada pelo fabricante, com 1 U de cada enzima e BSA 1 µg/µL. As reações foram incubadas a 37° C por 2 horas.

As digestões do vetor pRM482 e do vetor pGEM-SMYB1 foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão TAE, corado com SYBR Safe, utilizando-se, para comparação, os vetores pGEM-SMYB1 e pRM482 não digeridos. O fragmento de interesse de 678 pb (SMYB1) proveniente do pGEM-SMYB1 e o vetor pRM482 digerido foram puncionados do gel e purificados utilizando-se Kit *Qiaquick gel extraction* (Qiagen), conforme especificação do fabricante, sendo, então, ressuspensos em um volume final de 30 µL de água MiliQ autoclavada. A quantificação da amostra de DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

A ligação do fragmento correspondente ao cDNA codificador para SMYB1, purificado na etapa anterior, ao vetor de expressão pRM482 foi feita obedecendo-se a razão molar fragmento/vetor igual a 3:1. A ligação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 6 unidades de T4 DNA ligase (New England Biolabs) em tampão de ligação. Foram utilizados ~50 ng de vetor e ~1,8 µg do fragmento para a ligação. A reação foi incubada a 16° C por 16 horas.

O plasmídeo gerado (pRM482-SMYB1) foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes (50 µL). O protocolo para a transformação, a PCR de colônias, a miniprep e o sequenciamento foram realizados conforme descrito no item 3.3.1.1. Os vetores foram então linearizados para a transfecção, precipitados com etanol e visualizados em gel de agarose 1% corado com SYBR safe®.

### 3.3.1.3 Transfecção do parasito *T. brucei* selvagem e do parasito *T. brucei* nocaute para o gene *MSH2*

Para a transfecção do parasito *T. brucei* foi utilizada a forma sanguínea da cepa selvagem 427 (Cross, 1975) e da cepa nocaute para o gene *MSH2* (*MSH2*<sup>-/-</sup>) (Bell et

al., 2004). Todas as cepas foram cultivadas na fase logarítmica de crescimento (densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/mL) em meio HMI-9 (hipoxantina, L-cisteína, ácido pirúvico, timidina, ácido batocuproedisulfônico e  $\beta$ -mercaptoetanol) (Invitrogen) (Hirumi and Hirumi, 1994). O meio completo foi preparado pela adição de 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) ao meio HMI-9. As células foram repicadas de duas a três vezes por semana e crescidas em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>.

A transfecção das formas sanguíneas selvagem e nocaute (MSH2<sup>-/-</sup>) de *T. brucei* foi realizada por eletroporação com 10 µg dos vetores pRM482 vazio, ou pRM482-SMYB1. O vetor pRM482 possui o gene de resistência ao antibiótico G418. Células na fase logarítmica de crescimento ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram centrifugadas e ressuspendidas em 100 µL de tampão *Amaxa Human T-cell* (Lonza). Em seguida, foi adicionado o vetor de interesse e a eletroporação foi efetuada, com apenas um pulso, utilizando o *Gene Pulser II* (Bio-Rad) a 1.5 kV e 25 mF de capacitância. Após a eletroporação foi realizada uma diluição seriada com a mistura de células e DNAs. Para isso, a mistura foi diluída em 30 mL de meio HMI-9, dessa solução pegou-se 3 mL e misturou-se com 27 mL de meio HMI-9 e por fim, dessa última mistura, pegou-se 3 mL e misturou-se com 27 mL de meio HMI-9. A última diluição foi, então, distribuída em placas de 24 poços, colocando-se 1 mL por poço, e realizada a incubação a 37°C.

Para a seleção dos transfectados foram adicionadas as drogas seletivas para cada cultura após 8 horas da transfecção. Para a cultura selvagem com os vetores pRM482 e pRM482-SMYB1 foi adicionado 1,3 µg/mL de G418 e para as culturas nocaute foram adicionados 0,5 µg/mL de puomicina, 2,5 µg/mL de blasticidina e 1,3 µg/mL de G418. As células foram novamente incubadas a 37°C por 6 dias, tempo suficiente para que as células não resistentes morressem na presença do antibiótico e as células resistentes fossem detectadas.

Com a transfecção, foram gerados os seguintes parasitos, utilizados posteriormente nesse estudo: selvagem: TbWT, selvagem com o vetor pRM482-SMYB1: TbWT-SMYB1, selvagem com o vetor vazio pRM482: TbWT-pRM482, nocaute: TbMSH2, nocaute com o vetor pRM482-SMYB1: TbMSH2-SMYB1 e nocaute com o vetor pRM482 vazio: TbMSH2-pRM482,

Para confirmar a transfecção dos clones selecionados, foi realizada a extração de DNA utilizando o Kit *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen) conforme instruções do fabricante e realizada PCR conforme descrito no item 3.3.1.1. Após a confirmação, cada

linhagem celular foi congelada em nitrogênio líquido. Para isso, estoques foram preparados a partir de formas sanguíneas na fase logarítmica de crescimento (densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml). Alíquotas de 1 ml de cultura foram preparadas adicionando-se glicerol (concentração final 10%). As células foram congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  por 48 h e transferidas para o tanque de nitrogênio líquido, onde foram estocadas. Quando necessário, as células foram recuperadas por descongelamento rápido a  $37^\circ\text{C}$  e diluídas em 10 ml de meio HMI-9.

### **3.3.1.4 Avaliação da expressão do gene SMYB1 em *T. brucei* através de RT-PCR**

Foi realizada a extração do RNA total das culturas WT, TbWT-SMYB1 e TbMSH2-SMYB1 utilizando o Kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi tratado com DNase utilizando o Kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico. As amostras de RNA foram então quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). De 0,3 a 1,0  $\mu\text{g}$  de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA, que foi realizada utilizando o kit *Precision picoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription* (Primer Design) de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do cDNA codificador da proteína SMYB1 foi realizada utilizando os iniciadores YBfwEcoRV e YbrevMluI. O protocolo para a PCR foi realizado conforme descrito no item 3.3.1.1.

### **3.3.2 Tratamento dos parasitos com diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio**

Para a curva de sobrevivência, as culturas de TbWT, TbWT-SMYB1, TbWT-pRM482, TbMSH2, TbMSH2-SMYB1 TbMSH2-pRM482 com concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL foram expostas a doses de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio (Sigma) por 20 minutos em PBS 1X. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, ressuspensas em meio HMI-9 e distribuídas em alíquotas de 1 ml em placas contendo 24 poços. Controles foram realizados na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após 72 horas a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica de

Neubauer. A média dos valores obtidos foi plotada em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

### 3.3.3 Silenciamento do transcrito de RBP16 em *T. brucei* pelo mecanismo de RNA de interferência

#### 3.3.3.1 Amplificação do gene RBP16 e construção do plasmídeo recombinante pGL2084-RBP16

Para a amplificação do gene RBP16 foi utilizado DNA genômico da forma sanguínea da cepa selvagem 427 (Cross, 1975) de *T. brucei*. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com o manual do fabricante. A PCR seguiu o mesmo protocolo do item 3.3.1.1 com algumas modificações. A temperatura de anelamento utilizada para a amplificação do fragmento de interesse foi de 63 °C. Foram utilizados os iniciadores RN<sub>A</sub>fwRBP16 (5'–GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGATTCGCGCTTCCATAGT–3') e RN<sub>A</sub>revRBP16 (5'–GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCATCGCTGAAGCTCTGGT–3') que apresentam, respectivamente, os sítios de recombinação AttB1 e AttB2 (sublinhados na sequência dos iniciadores).

Após a PCR, o produto da amplificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com *SYBR*<sup>®</sup> *Safe* e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). O fragmento de interesse de 426 pb foi puncionado do gel e purificado utilizando-se o *Kit QIAquick gel extraction* (Qiagen) conforme especificações do fabricante.

O amplicon de RBP16 gerado foi então clonado no vetor pGL2084 (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. O vetor pGL2084 é uma modificação do plasmídeo pRPa do sistema *Gateway* que apresenta sítios de recombinação AttB (AttB1 e AttB2) flanqueando o marcador de seleção (gene *ccdB*) (mapa do vetor no Anexo IV). Este vetor foi desenvolvido para uma rápida geração do *stem-loop* de RNAi para uso em *T. brucei*.

A recombinação foi realizada durante 1 hora a 25 °C. O plasmídeo gerado (pGL2084-RBP16) foi usado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α

quimiocompetentes de eficiência máxima (Invitrogen). A transformação, seleção dos clones positivos e obtenção do DNA plasmidial seguiram o mesmo protocolo descrito no item 3.3.1.1. Para verificar a correta integração do inserto de interesse foram realizados testes com diferentes enzimas de restrição conforme instruções do fabricante.

### **3.3.3.2 Transfecção do parasito *T. brucei* com o vetor para indução do RNAi de RBP16**

Para a transfecção foi utilizada a forma sanguínea da cepa 2T1 do parasito *T. brucei* (Alsford and Horn, 2008). O protocolo de transfecção do parasito seguiu os mesmos parâmetros descritos no item 3.3.1.3. Para a seleção dos parasitos foram utilizados 2,5 µg/mL de Higromicina e 0,5 µg/mL de Fleomicina. Após 7 dias da transfecção, 2 clones foram selecionados e cultivados em meio HMI-9 para verificar a integração do vetor no parasito sob as seguintes condições:

- 1- Presença dos antibióticos higromicina e fleomicina. Neste caso as células deveriam permanecer vivas.
- 2- Presença dos antibióticos higromicina, fleomicina e puromicina. Neste caso, as células deveriam morrer, o que seria um indicativo da correta integração do cassete de RNAi, uma vez que células transfectadas tornam-se sensíveis a puromicina.
- 3- Presença dos antibióticos higromicina, fleomicina e 1 µg/mL de tetraciclina. Para verificar o fenótipo de RNAi, uma vez que o RNAi é induzível pela tetraciclina.

### **3.3.3.3 Curvas de crescimento e de sobrevivência a agentes genotóxicos de parasitos *T. brucei* silenciados para o gene RBP16**

Após a confirmação da integração do vetor, as formas sanguíneas de *T. brucei*, durante a fase logarítmica de crescimento, foram diluídas para a concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL de meio de cultura para a realização de curvas de crescimento e de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos. As curvas de crescimento e de sobrevivência dos parasitos foram realizadas com e sem a presença de tetraciclina.

O crescimento dos clones foi acompanhado durante 6 dias. No terceiro dia, após a contagem, os parasitos foram diluídos para a concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de crescimento

em função do tempo com desvio padrão. Para a curva de sobrevivência, após 24 horas de indução do RNAi pela tetraciclina, as culturas foram distribuídas em alíquotas de 1 ml em placas contendo 24 poços e incubadas a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>.

Para analisar a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, as células foram submetidas às seguintes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100, 200 e 300 µM (VWR BDH Prolabo). Controles foram realizados na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após 72 horas de exposição a esse agente genotóxico a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica de Neubauer. A concentração de células das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das respectivas culturas não tratadas crescidas sob as mesmas condições. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para analisar a sensibilidade à cisplatina, células foram submetidas às seguintes concentrações da droga: 1, 3 e 5 µM. Controles foram realizados na ausência de cisplatina (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias de exposição a esse agente genotóxico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para analisar a sensibilidade ao MMS, células foram submetidas a 50, 100 e 200 µM de MMS em triplicata. Controles foram realizados na ausência de MMS (100% de sobrevivência). As amostras foram incubadas a 37 °C e o número de células viáveis foi determinado após 72 horas de exposição a droga através da contagem de células. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

### **3.3.4 Avaliação da expressão do gene RBP16 em *T. brucei***

#### **3.3.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA**

Foi realizada a extração do RNA total de cada um dos dois clones (com a presença e com a ausência de tetraciclina (1 µg/mL)) em intervalos de 24 horas durante 3 dias utilizando o kit Rneasy mini kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi tratado com DNase utilizando o Kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico. As amostras de RNA foram então

quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). De 0,3 a 1,0 µg de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA, que foi realizada utilizando o kit *Precision picoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription* (Primer Design) de acordo com as instruções do fabricante, além dos iniciadores oligodT.

### 3.3.4.2 PCR quantitativa em tempo real

Para as reações de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foram utilizados os iniciadores rtRBP16Fwd (5'-ACGACGCAGACAAGAAGCAA-3') e rtRBP16Rev (5'-CCCCGTTTCCGTTTGAAGA-3'). Para que as quantidades de RNA entre as diferentes amostras pudessem ser normalizadas foi utilizado como controle endógeno o gene *housekeeping* de *T. brucei* GPI8, o qual foi amplificado com os iniciadores GPI8fwd (5'-TCTGAACCCGCGCACTTC-3') e GPI8rev (5'-CCACTCACGGACTGCGTTT-3'). As reações de qRT-PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1,0 µL de cada primer (10 nM do estoque), 5,5 µL de água ultrapura autoclavada e 5 µL de cDNA sintetizado conforme descrito no item 3.3.4.1 diluído 5 vezes em água ultrapura autoclavada. As reações foram adicionadas em placas 96 *Well Optical Reaction Plates* (Applied Biosystems) para amplificação dos transcritos, que foram realizadas em equipamento *ABI Prism 7500 thermocycler* (Applied Biosystems). As condições para as reações foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após cada reação de amplificação foram realizadas curvas de dissociação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, separação das fitas com aquecimento a 95°C por 15 segundos com uma rampa de aquecimento de 1% e, finalmente, o resfriamento a 60°C por 15 segundos. As curvas de dissociação dos produtos finais foram avaliadas para a confirmação da presença de apenas um amplicon.

Para a quantificação dos transcritos foi utilizado o método da curva padrão relativa. Para a preparação das curvas foi utilizado DNA genômico da cultura selvagem WT em uma concentração de aproximadamente 7,8 ng/µL conforme dosagem em Nanodrop. A amplificação do DNA utilizado na preparação das curvas padrão foi realizada do mesmo modo descrito para a amplificação dos cDNAs.

As reações foram controladas pelo 7500 Software (Applied Biosystems). As leituras foram feitas a cada ciclo e o logaritmo do incremento da fluorescência foi plotado contra o número do ciclo. A correção da fluorescência basal foi realizada

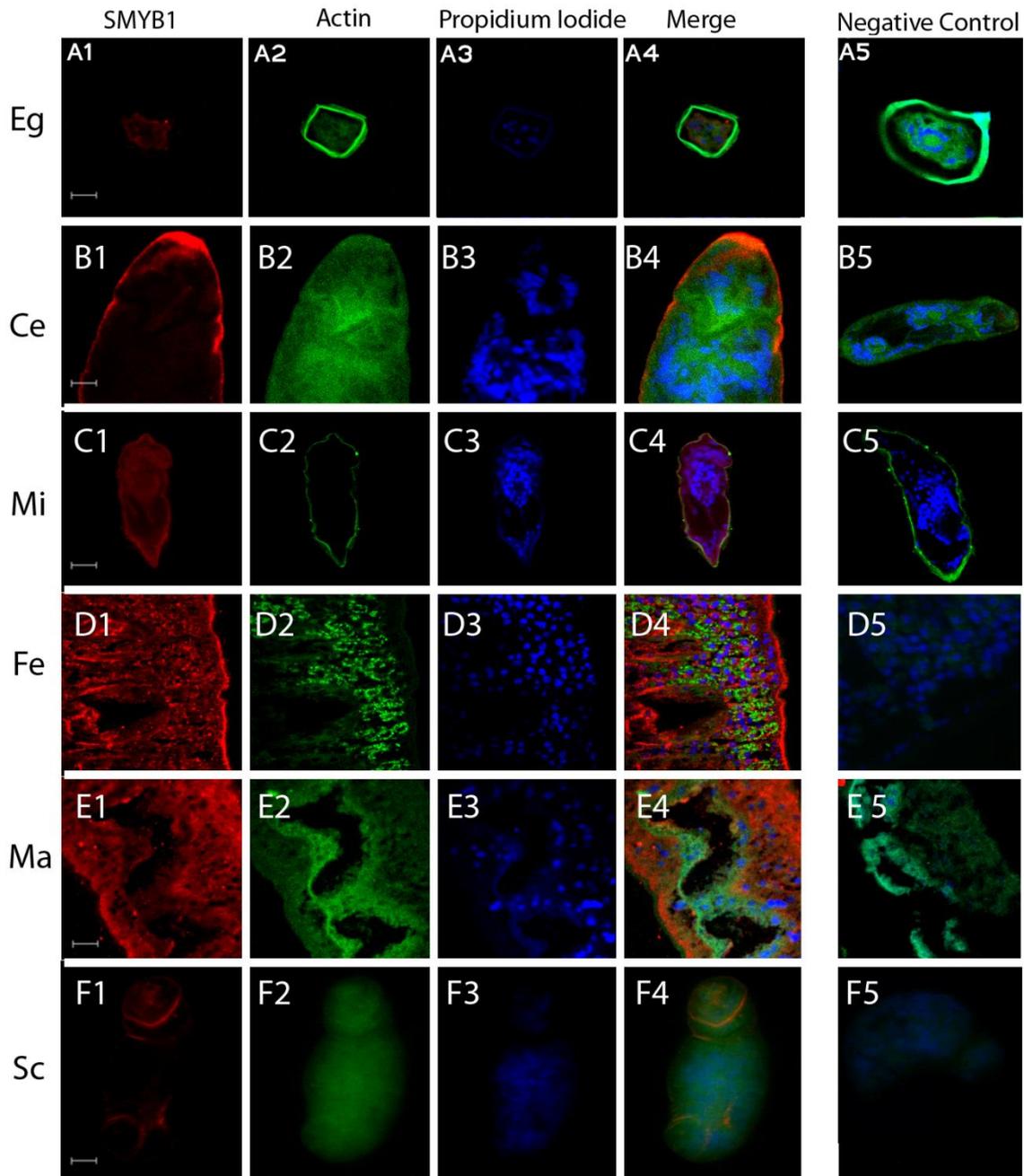
automaticamente pelo programa. O cálculo da quantificação relativa (RQ) para cada uma das condições foi realizado por interpolação na curva padrão relativa utilizando o 7500 software. Análises estatísticas foram realizadas usando o teste t não pareado para comparar os níveis de mRNA das culturas induzidas e não induzidos com tetraciclina, nos diferentes dias de coleta. Para as análises estatísticas foram usados o *software GraphPad Prism*. Foram produzidos controles negativos internos para cada experimento de qRT-PCR com o objetivo de verificar tanto a presença de potenciais contaminações com DNA genômico, quanto a pureza dos reagentes utilizados nas reações de qRT-PCR utilizando apenas os reagentes normalmente acrescentados na reação, sem a adição de cDNA. Para cada par de iniciadores foram realizadas três réplicas técnicas para cada condição analisada bem como para os controles negativos.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 A proteína SMYB1 se localiza no citoplasma celular em diversas fases do ciclo de vida de *S. mansoni***

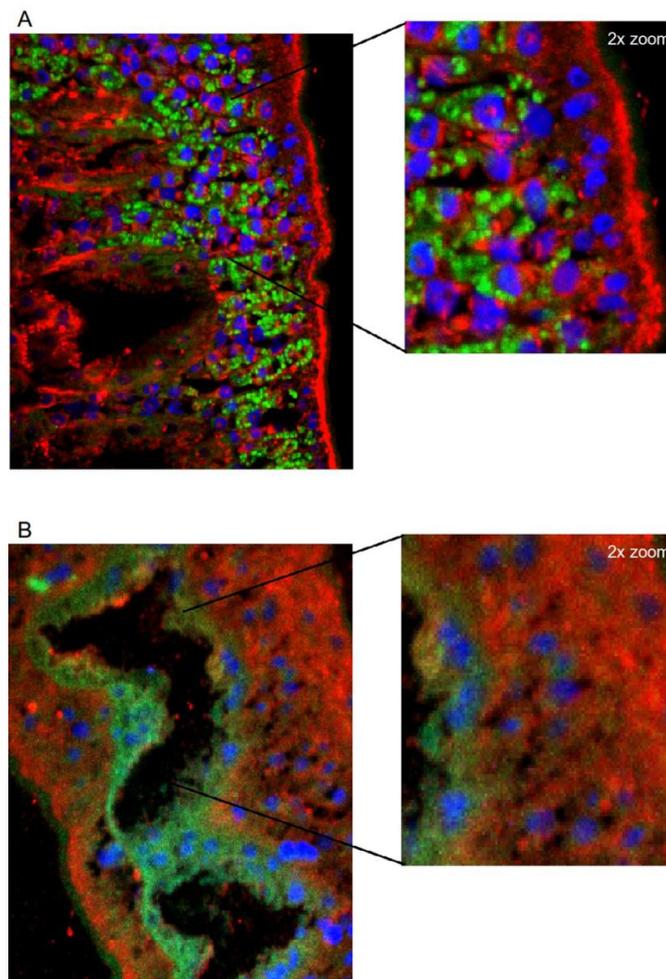
Em sua dissertação de mestrado, Valadão (1998) verificou o reconhecimento, por soro anti-SMYB1, de proteínas com tamanho aproximado à proteína SMYB1 (~24 KDa) em extratos nucleares e citoplasmáticos de vermes adultos de *S. mansoni*. A verificação da localização da proteína SMYB1 é um passo bastante importante na sua caracterização, tendo em vista que a presença no citoplasma de proteínas potencialmente reguladoras da expressão gênica é um indício de que elas sejam capazes de interagir com RNAs. Diante disso, ensaios de imunohistoquímica, com o objetivo de avaliar a presença e localização da proteína SMYB1, foram realizados em amostras de diferentes fases do *S. mansoni* utilizando anticorpos anti-SMYB1.

Através destes experimentos foi possível detectar a presença da proteína em todos os estágios analisados: ovos (Figura 10: A1 – A4), cercárias (Figura 10: B1 – B4), miracídios (Figura 10: C1 – C4), vermes adultos fêmeas (Figura 10: D1 – D4), vermes adultos machos (Figura 10: E1 - E4) e esquistossômulos (Figura 10: F1 – F4). Verificamos que SMYB1 está distribuída de forma homogênea no citoplasma do parasito nos diferentes estágios analisados. Não foi detectada nenhuma marcação nos controles negativos, onde foi utilizado o soro pré-imune (Figura 10: A5, B5, C5, D5, E5 e F5). A presença da proteína no citoplasma reforça os achados anteriores que demonstram a capacidade de SMYB1 de se ligar a RNAs (Valadão, 2002).

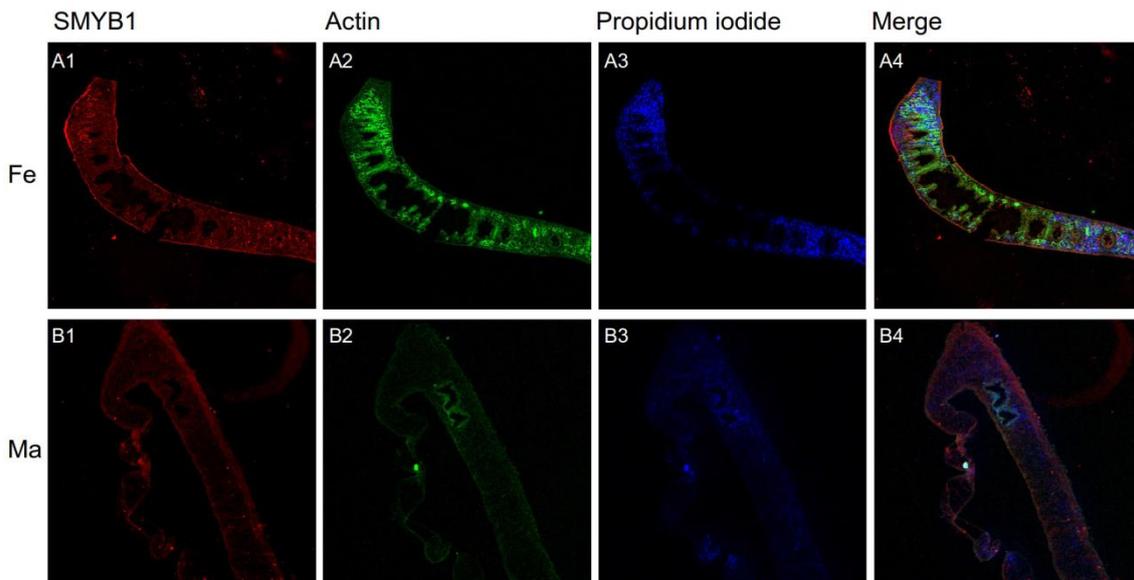


**Figura 10: Localização da proteína SMYB1 nativa nos diversos estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* por experimentos de imunohistoquímica.** Ovos do parasito presentes no fígado de camundongos (A1 – A4), cercárias (B1 – B4), miracídios (C1 – C4), vermes adultos fêmeas (D1 – D4), vermes adultos machos (E1 - E4) ou esquistossômulos (F1 – F4) foram incubados com anticorpo para avaliar a localização e presença da proteína SMYB1. As imagens de fluorescência foram obtidas utilizando microscópio confocal (Carl Zeiss Axioplan - 510 META) e lente de imersão com aumento total de 63x. Em verde estão marcados os filamentos de actina, em azul estão corados os núcleos celulares e em vermelho está marcada a proteína SMYB1. A sobreposição das cores azul e vermelha produz uma coloração rosa. O soro pré-imune foi utilizado como controle e se mostrou negativo em todas as amostras (A5, B5, C5, D5, E5 e F5).

A figura 11 mostra uma imagem ampliada de vermes adultos fêmeas (Figura 11A) e macho (Figura 11B) mostrando que a proteína SMYB1 encontra-se ao redor dos núcleos, evidenciando a sua localização citoplasmática. Além disso, notamos também que SMYB1 está acumulada na região subtegumentar em cercárias, miracídios e vermes adultos. Enquanto em cercária e esquistossômulos o padrão de distribuição de SMYB1 no corpo do animal parece ser anterior (Figura 10: B1-B4 e F1-F4), em vermes adultos (Figura 12), ovos e miracídios (Figura 10: A1-A4 e C1-C4) a proteína está distribuída por todo o corpo dos parasitos.



**Figura 11: A proteína SMYB1 nativa localiza-se no citoplasma de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*.** Esta figura revela a localização citoplasmática da proteína SMYB1 próximo ao tegumento de ambos os parasitos fêmeas (A) e machos (B). As imagens de fluorescência foram obtidas utilizando microscópio confocal (Carl Zeiss Axioplan - 510 META) e lente de imersão com aumento de 63x. Em verde estão marcados os filamentos de actina, em azul estão corados os núcleos celulares e em vermelho está marcada a proteína SMYB1. A região de cada imagem foi aumentada de aproximadamente 2X para maiores detalhes na visualização.



**Figura 12:** A proteína SMYB1 apresenta distribuição uniforme ao longo do corpo de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*. Esta figura mostra a localização citoplasmática de SMYB1 abaixo do tegumento em vermes adultos fêmea (A1-A4) e macho (B1-B4). As imagens de fluorescência foram obtidas utilizando microscópio confocal (Carl Zeiss Axioplan - 510 META) e lente de imersão com aumento total de 10x. Em verde estão marcados os filamentos de actina, em azul estão corados os núcleos celulares e em vermelho está marcada a proteína SMYB1.

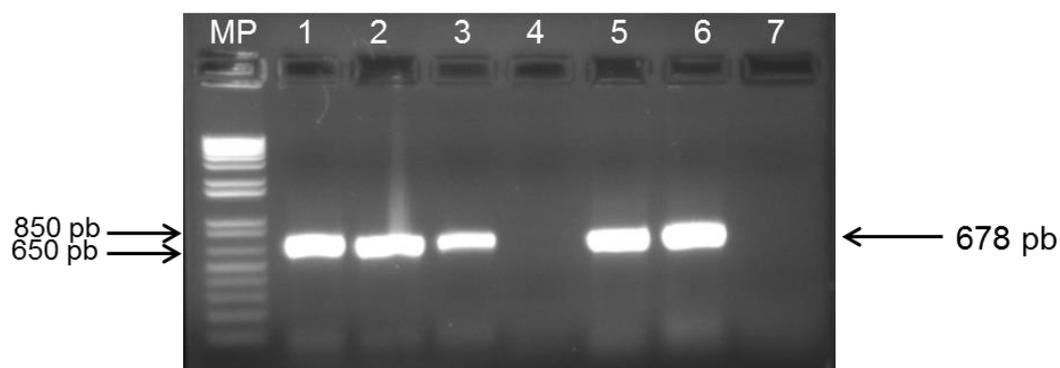
#### 4.2 Linhagem de *T. cruzi* superexpressando SMYB1

Baseando-se no fato de que as proteínas da família Y-box podem apresentar função no reparo de DNA e levando-se em consideração a importância de estudos que visam compreender o reparo por erro de pareamento de bases no DNA, um dos objetivos deste trabalho foi investigar o potencial papel de SMYB1 nesse processo. Para isso nós empregamos o parasito *T. cruzi* como organismo modelo. Uma vez que a proteína MSH2 participa do reparo por erro de pareamento de bases em *T. cruzi* (Campos, 2009), o parasito heminocaute para o gene MSH2, além do parasito selvagem, foram utilizados neste estudo. Assim, foi possível verificar se a superexpressão da proteína SMYB1 é capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade à água oxigenada apresentado por clones de *T. cruzi* heminocautes para o gene *MSH2*.

Com este intuito, o cDNA codificador para SMYB1 foi clonado no vetor pROCKneo (DaRocha et al., 2004), capaz de promover superexpressão em *T. cruzi* sob a regulação de um promotor para transcrição de RNA ribossômico. O vetor confere resistência ao antibiótico neomicina. Assim, primeiramente foi realizada a amplificação do fragmento de cDNA codificador para SMYB1 (678 pb) com os iniciadores

YBfwXbaI e YBrevSalI. Após o fragmento de interesse ter sido purificado, foi realizada uma subclonagem no vetor pGEM-T. As colônias resultantes foram analisadas por meio de PCR de colônias para verificar quais apresentavam o plasmídeo com o fragmento de interesse (pGEM-SMYB1). Foram então selecionados 3 clones positivos, os quais foram sequenciados. Após a confirmação de que o inserto clonado estava de acordo com a sequência do gene SMYB1 depositado no GenBank, foi realizada a digestão do vetor pGEM-SMYB1 dos três diferentes clones utilizando as enzimas *XbaI* e *SalI* para a liberação do inserto de interesse. É importante notar que a sequência do gene SMYB1 apresenta o sítio da enzima *SlaI* e por isso a enzima *SalI*, que gera um sítio compatível para a ligação de fragmentos gerados pela digestão com a enzima *SlaI*, foi utilizada para a liberação do gene SMYB1 do vetor pGEM-T.

Após a digestão dos vetores pGEM-SMYB1, foi realizada a clonagem do gene SMYB1 no vetor pROCK. As colônias resultantes foram analisadas por meio de PCR de colônias (Figura 13), sendo três clones positivos selecionados e sequenciados. Após a confirmação de que o inserto clonado estava de acordo com a sequência do gene SMYB1 depositado no GenBank, um clone foi selecionado e usado para a transfecção do parasito.

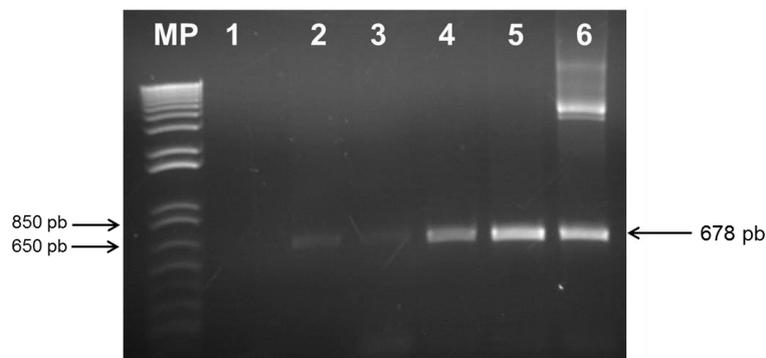


**Figura 13: PCR de colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo pROCK-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. **1,2,3, 5 e 6:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de diferentes clones bacterianos. **4:** Não houve amplificação do inserto. **7:** Controle negativo sem a presença de bactérias.

O vetor de superexpressão pROCKneo contendo o gene SMYB1 (pROCK-SMYB1) e o vetor pROCKneo sem o gene SMYB1 (pROCK), definido aqui como vetor vazio, foram então linearizados e utilizados para transfectar, por eletroporação, as culturas epimatogotas de *T. cruzi* WT e MSH2<sup>+/-</sup>. Como controle, foram também

utilizadas culturas eletroporadas na ausência de plasmídeo (*Mock*). Foram, então, gerados os seguintes parasitos: selvagem (TcWT), selvagem com o vetor pROCK-SMYB1 (TcWT-SMYB1), selvagem com o vetor vazio pROCK (TcWT-pROCK), heminocaute (TcMSH2+/-), heminocaute com o vetor pROCK-SMYB1 (TcMSH2-SMYB1) e heminocaute com o vetor pROCK vazio (TcMSH2-pROCK).

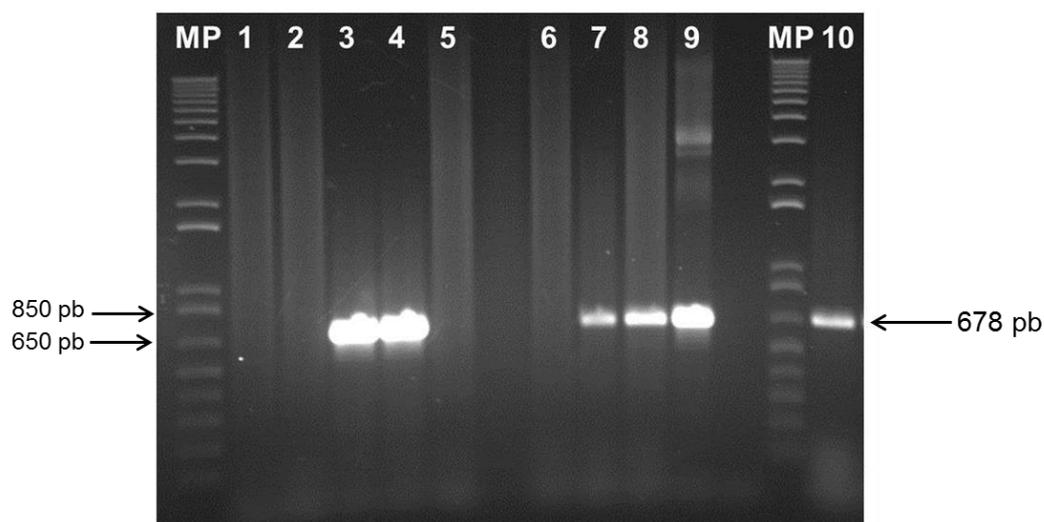
Todas as culturas foram cultivadas em meio LIT em fase exponencial de crescimento. Após a eletroporação, foram mantidas sob seleção em meio LIT contendo o antibiótico apropriado para cada cultura transfectada. Após um mês de seleção, nenhum parasito foi detectado na cultura *Mock*, enquanto os parasitos da cultura transfectada com os plasmídeos mantiveram seu crescimento. Esse resultado indica a provável incorporação do vetor contendo os genes de resistência aos antibióticos utilizados e consequentemente do gene SMYB1 pelos parasitos transfectados. Para verificar a presença do vetor (pROCK-SMYB1) nos parasitos selvagem e heminocaute, foi extraído DNA total desses parasitos e realizada PCR para amplificar o gene de SMYB1. Para todas as amostras analisadas foi observado um fragmento com tamanho esperado de 678 pares de bases (Figura 14).



**Figura 14: PCR de DNA total extraído de cepas selvagens e nocautes de *T. cruzi* transfectadas com pROCK-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. 1: Controle negativo (DNA total da cepa selvagem WT). 2 e 3: Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de parasitos selvagens transfectados com pROCK-SMYB1 (TcWT-SMYB1). 4 e 5: Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de diferentes parasitos heminocautes MSH2 transfectados com pROCK-SMYB1 (TcMSH2-SMYB1). 6: cDNA de *S. mansoni* (controle positivo).

Para verificar a expressão do transcrito da proteína SMYB1 nos parasitos transfectados, foi realizada PCR do cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de culturas TcMSH2-SMYB1 e TcWT-SMYB1. Como controle positivo foram utilizados

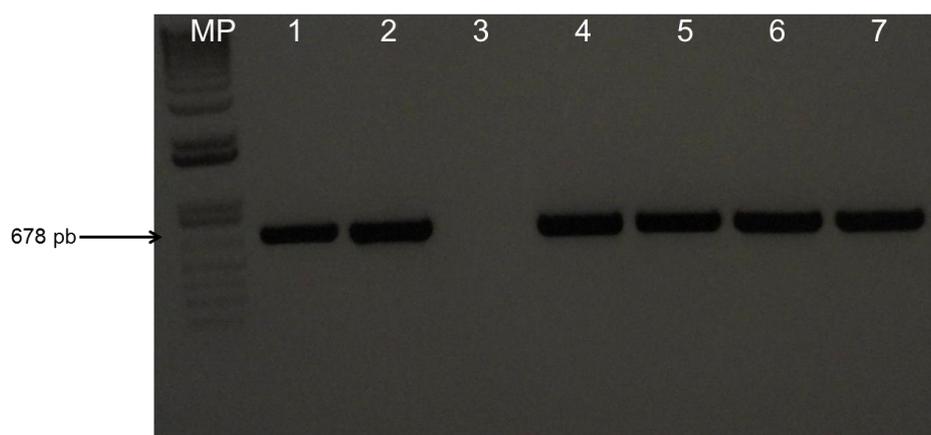
cDNA de *S. mansoni* e DNA total da cultura TcWT-SMYB1. Para o controle negativo foram utilizados cDNA das culturas TcWT e TcMSH2+/. Para as duas culturas analisadas foi observado o fragmento esperado com tamanho de aproximadamente 678 pb (Figura 15).



**Figura 15: PCR de cDNA das cepas selvagens e heminocautes de *T. cruzi* transfetados com pROCK-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. **1 e 2:** amplificação do cDNA da cultura TcMSH2+/- (controle negativo). **3 e 4:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir do cDNA de TcMSH2-SMYB1. **5 e 6:** amplificação do cDNA de TcWT (controle negativo). **7 e 8:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de TcWT-SMYB1. **9:** amplificação do cDNA de *S. mansoni* (controle positivo). **10:** amplificação utilizando DNA total de TcWT-SMYB1 (controle positivo).

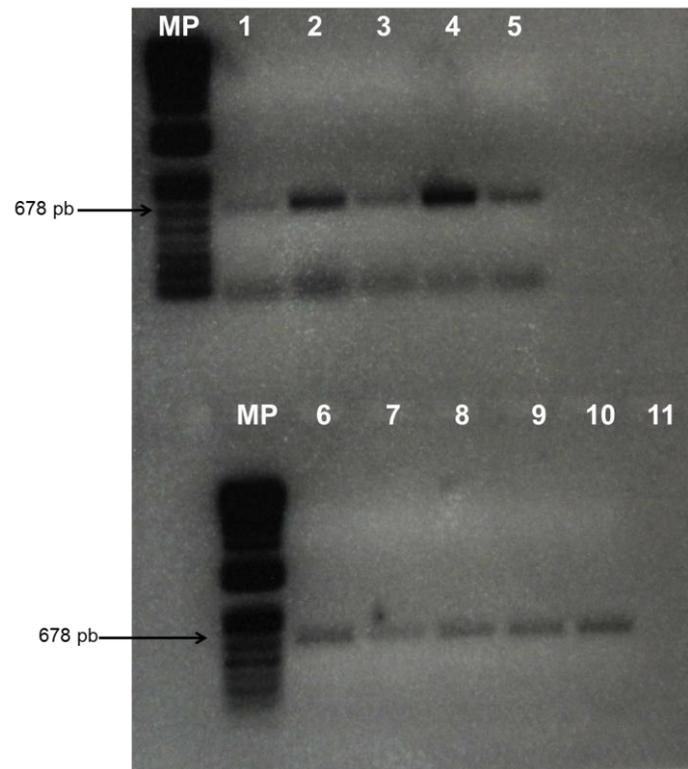
### 4.3 Linhagens de *T. brucei* expressando a proteína SMYB1

Assim como para o parasito *T. cruzi* também foram gerados os plasmídeos necessários para a transfecção do *T. brucei*. Primeiramente, foi gerado o plasmídeo pGEM-T-SMYB1 e após seleção por PCR de colônia e confirmação por sequenciamento, o amplicon foi então digerido e clonado no vetor de expressão pRM482, gerando o plasmídeo pRM482-SMYB1 (Figura 16), necessário para transfectar os parasitos.



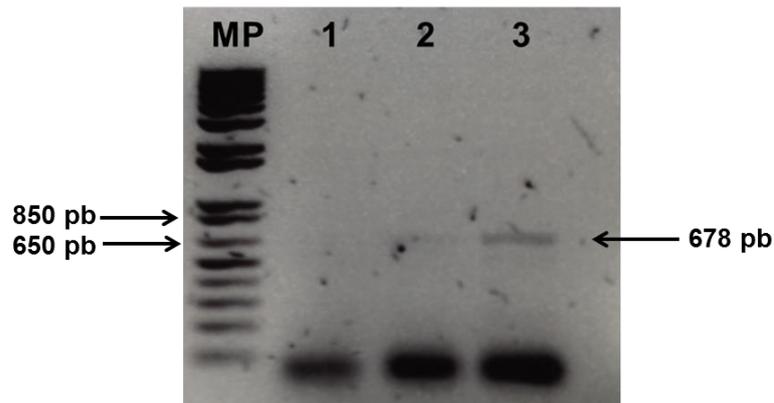
**Figura 16: PCR de colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo pRM482-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com *Syber safe*. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. **1,2, 4, 5, 6 e 7:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de diferentes clones bacterianos. **3:** Controle negativo sem a presença de bactérias.

Formas sanguíneas da cepa 427 (WT) e cepas nocaute para o gene MSH2 (TbMSH2<sup>-/-</sup>) de *T. brucei* na fase logarítmica de crescimento foram transfectadas, por eletroporação, com o vetor linearizado contendo o gene SMYB1 (pRM482-SMYB1) e com o vetor linearizado vazio, sem a presença do gene SMYB1. Os parasitos eletroporados foram cultivados em meio HMI-9 contendo os antibióticos necessários para a seleção dos parasitos TbWT ou TbMSH2<sup>-/-</sup> contendo os vetores apropriados pRM482-SMYB1 ou pRM482. Após 7 dias da transfecção alguns clones foram selecionados e cultivados em meio HMI-9. Para verificar a presença do vetor pRM482-SMYB1 foi realizada PCR a partir de DNA total extraído dos parasitos transfectados. Para todas as amostras analisadas foi observado um fragmento com tamanho esperado de 678 pares de bases (Figura 17).



**Figura 17: PCR de DNA total extraído de cepas selvagens TbWT e nocautes TbMSH2  $-/-$  de *T. brucei* transfectadas com pRM482-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com *Sybr safe*. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. **1, 2, 3, 4 e 5:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de diferentes parasitos MSH2 nocautes transfectados com pRM482-SMYB1. **6, 7, 8, 9 e 10:** Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir de diferentes parasitos selvagens transfectados com pRM482-SMYB1. **11:** Controle negativo sem a presença de DNA.

Para verificar a expressão de SMYB1 nos parasitos transfectados, foi realizada PCR a partir do cDNA das cepas transfectadas. O cDNA foi sintetizado a partir de RNA extraído das culturas TbMSH2-SMYB1 e TbWT-SMYB1. Como controle negativo foi utilizado cDNA sintetizado a partir do RNA extraído da cultura TbWT. Para as duas culturas analisadas foi observado o fragmento esperado com tamanho de aproximadamente 678 pb (Figura 18).

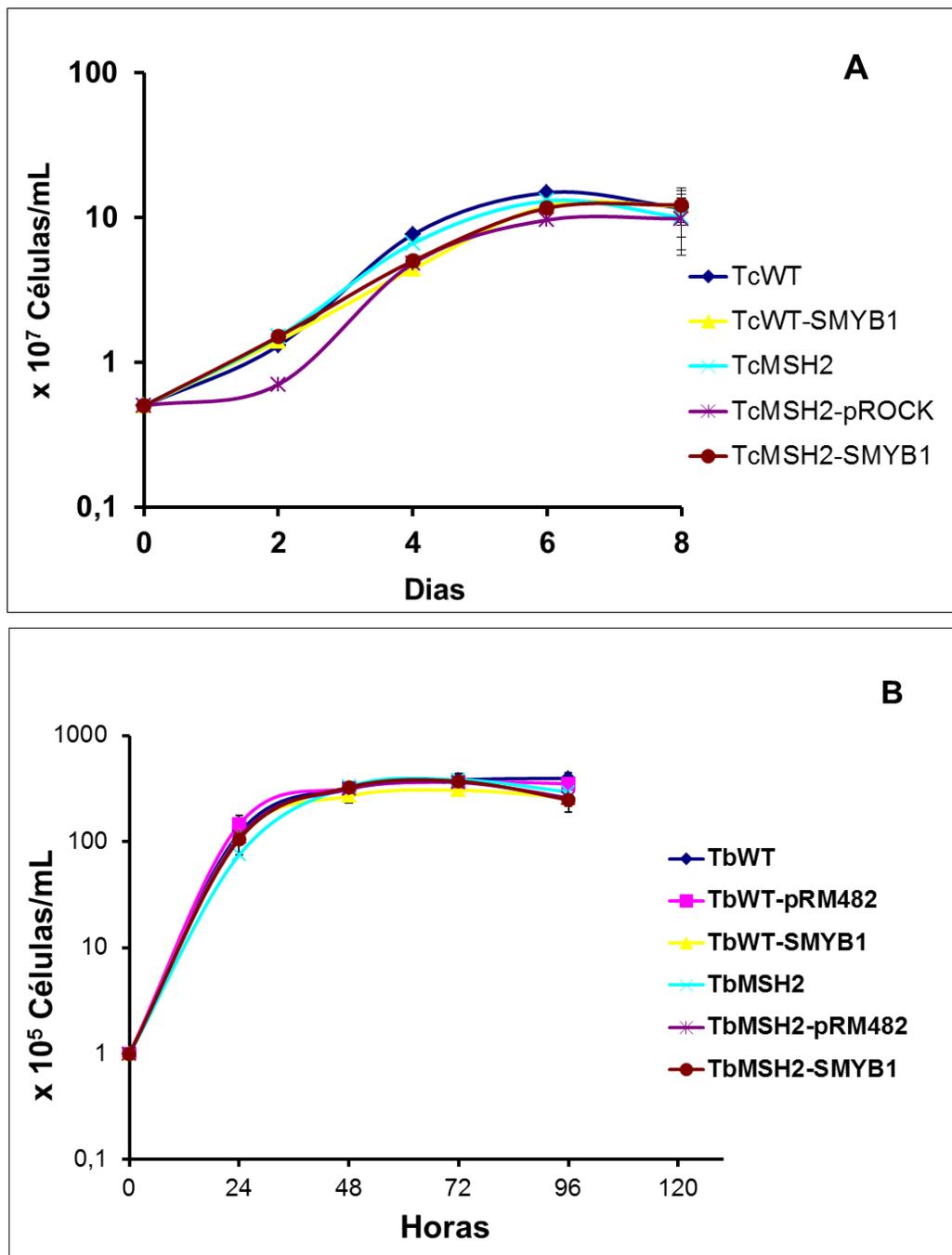


**Figura 18: PCR de cDNA das cepas selvagens e nocautes de *T. brucei* transfectadas com o vetor pRM482-SMYB1.** Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. MP: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. 1: amplificação do cDNA da cultura TbWT (controle negativo). 2: Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir da cultura TbWT-SMYB1. 3: Amplicons de interesse de aproximadamente 678 pb produzidos a partir da cultura TbMSH2-SMYB1.

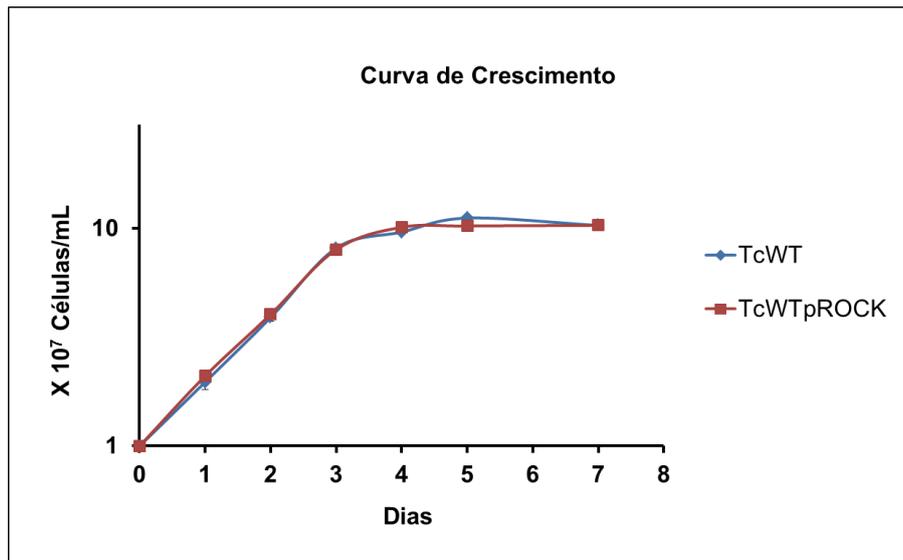
#### 4.4 A proteína SMYB1 não afeta o crescimento das cepas de *T. cruzi* e *T. brucei*

A presença de uma proteína heteróloga em um organismo pode interferir no seu desenvolvimento, podendo ser tóxica e inibir assim o seu crescimento. Dessa maneira, para verificar se a expressão da proteína SMYB1 nas cepas de *T. cruzi* (TcWT-SMYB1 e TcMSH2-SMYB1) e *T. brucei* (TbWT-SMYB1 e TbMSH2-SMYB1) iriam interferir em seu desenvolvimento, o crescimento das células foi acompanhado. No caso do *T. cruzi* o acompanhamento foi realizado durante 8 dias consecutivos com contagens das células após o segundo, quarto, sexto e oitavo dia (Figura 19A). Já para o *T. brucei* o acompanhamento foi realizado por 4 dias consecutivos com contagem após 24 horas (Figura 19B). Os parasitos TcMSH2, TcMSH2-pROCK, TbWT-pRM482, TbMSH2 e TbMSH2-pRM482 foram também acompanhados quanto à sua taxa de crescimento. A cepa TcWT-pROCK não foi incluída na curva de crescimento, uma vez que já foi demonstrado que a presença do vetor pROCK vazio não interfere no crescimento da cepa WT (Figura 20, realizada pela aluna de doutorado Isabela Cecília Mendes - Tese em preparação).

Todas as cepas transfectadas (TcWT-pROCK, TcWT-SMYB1, TcMSH2-pROCK, TcMSH2-SMYB1, TbWT-pRM482, TbWT-SMYB1, TbMSH2-pRM482, TbMSH2-SMYB1) apresentaram curvas de crescimento similares à cepa selvagem correspondente (TcWT ou TbWT), indicando que a expressão da proteína exógena SMYB1 não impediu o crescimento dos parasitos (Figura 19).



**Figura 19: Curva de crescimento para verificar o efeito da expressão de SMYB1 em cepas de *T. cruzi* e *T. brucei*.** **A)** Avaliação do crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (TcWT), heminocaute para MSH2 (TcMSH2), expressando SMYB1 (TcWT-SMYB1 e TcMSH2-SMYB1) e heminocaute com o vetor pROCK vazio (TcMSH2-pROCK). Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $0,5 \times 10^7$  células/mL. **B)** Avaliação do crescimento das cepas de *T. brucei* selvagem (TbWT), nocaute para MSH2 (TbMSH2), expressando SMYB1 (TbWT-SMYB1 e TbMSH2-SMYB1), nocaute com o vetor pRM482 vazio (TbMSH2-pRM482) e selvagem com o vetor vazio (TbWT-pRM482). Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL. Os valores mostrados nos dois gráficos correspondem à média de um experimento em triplicata e seus desvios padrão de cada ponto.



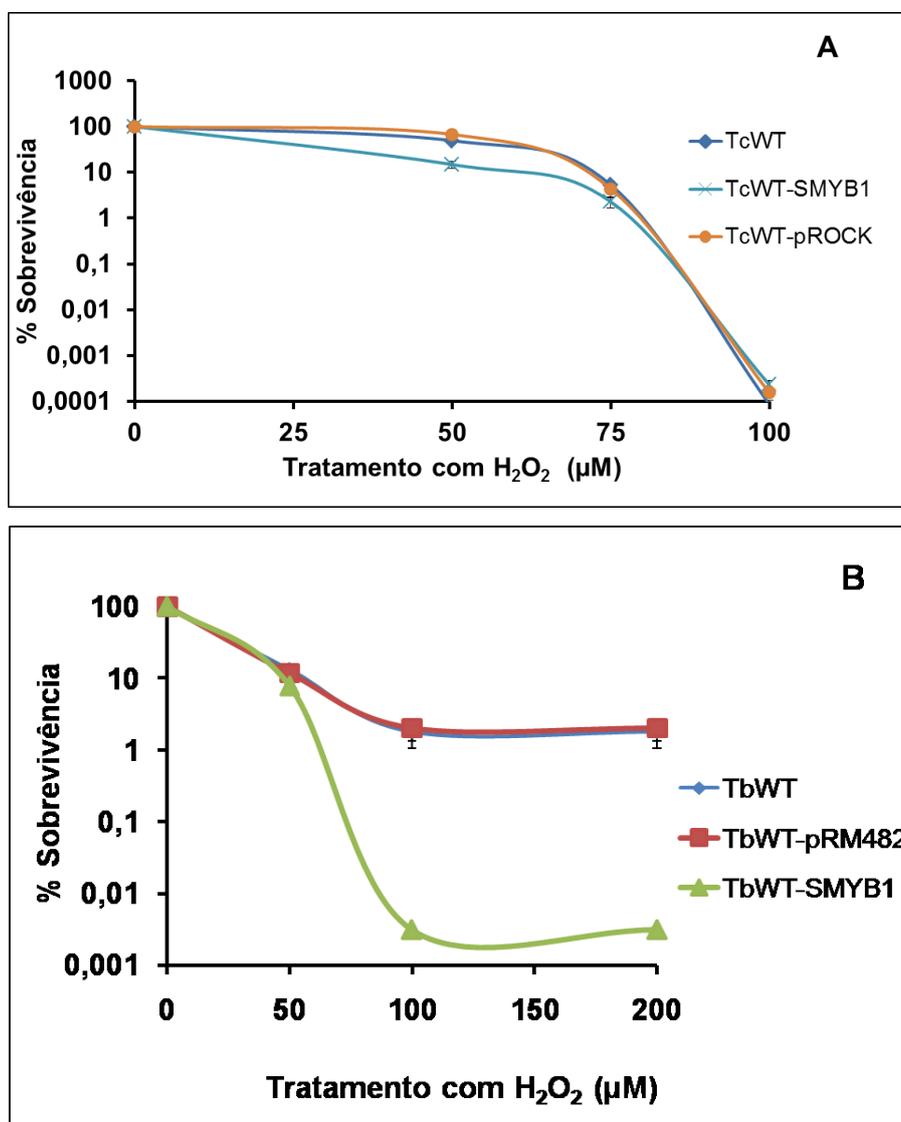
**Figura 20:** Curva de crescimento de cepas de *T. cruzi* selvagem (TcWT) e transfectadas com o vetor vazio pROCKneo (TcWTpROCK). Cepas de *T. cruzi* selvagem (TcWT), transfectadas com o vetor pROCK contendo o gene de seleção para a neomicina (pROCKneo). Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata. Dados fornecidos pela aluna de doutorado Isabela Cecília Mendes (tese em preparação).

#### 4.5 Efeito da proteína SMYB1 na sobrevivência dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* selvagens submetidos a estresse induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Para verificar a atuação de SMYB1 em *T. cruzi* e *T. brucei*, as células que expressam SMYB1 (TcWT-SMYB1 e TbWT-SMYB1) foram tratadas com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações. Como dito anteriormente, o peróxido de hidrogênio é responsável por gerar danos oxidativos no DNA, levando principalmente a lesões na base e no açúcar do DNA e quebras de fita simples (SSBs). Esse agente genotóxico também pode gerar sítios abásicos, *crosslinks* entre proteínas e DNA, e quebras de fita dupla quando duas ou mais modificações se situam próximas e em fitas opostas (Slupphaug et al., 2003, Stohl and Seifert, 2006).

A superexpressão de SMYB1 em cepas selvagens de *T. cruzi* não influencia na sobrevivência do parasito frente ao dano oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 21A). O tratamento com 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a morte tanto das células superexpressando SMYB1 como aquelas utilizadas como controle negativo (TcWT, TcWT-pROCK). Entretanto, ao avaliarmos a expressão de SMYB1 em cepas selvagens de *T. brucei* verificamos que a presença de SMYB1 torna a cepa mais sensível ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 21B) quando comparada as controles sem expressão da proteína (TbWT,

TbWT-pRM482) isso pode ter ocorrido provavelmente devido a produção de um fenótipo de dominância negativa.

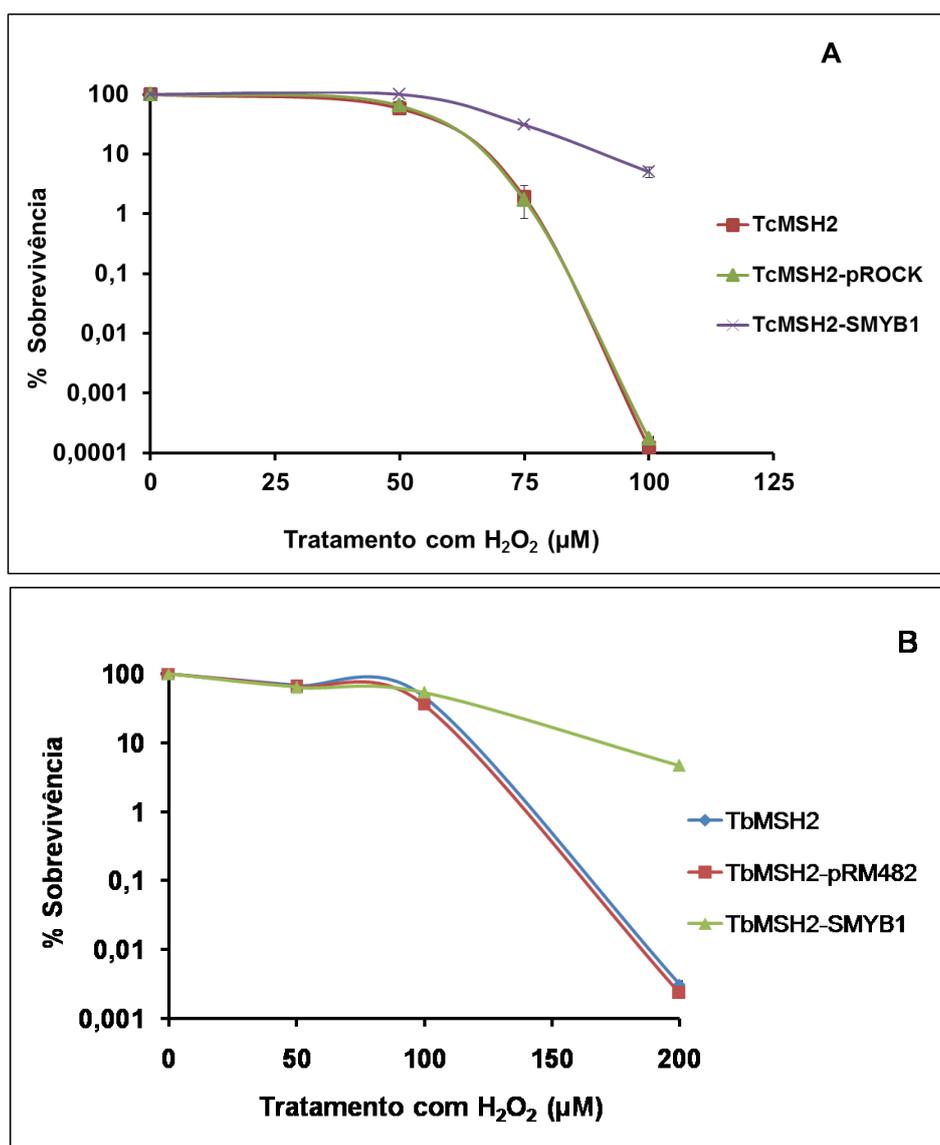


**Figura 21:** Curva de sobrevivência dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* selvagens expressando SMYB1 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio. **A)** Cepas de *T. cruzi* selvagem (TcWT), superexpressando SMYB1 (TcWT-SMYB1) e com o vetor pROCK vazio (TcWT-pROCK) foram submetidas as doses de 0, 50, 75 e 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $1 \times 10^7$  células/mL. **B)** Cepas de *T. brucei* selvagem (TbWT), expressando SMYB1 (TbWT-SMYB1) e com o vetor vazio (TbWT-pRM482) foram submetidas as doses de 0, 50, 100 e 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

#### 4.6 SMYB1 é capaz de complementar a função desempenhada por MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei* frente ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O dano oxidativo, pode surgir do próprio metabolismo oxidativo endógeno, é uma ameaça constante à estabilidade genômica podendo causar graves danos em uma célula. As lesões nas bases que podem surgir a partir do dano oxidativo ao DNA, tais como a 8-oxoG, se não removidas pelo sistema de reparo por excisão de bases (BER), podem ser reconhecidas pelo MMR (Slupphaug et al., 2003). A proteína MSH2 é o principal componente da via MMR em organismos eucariotos e já foi demonstrada a sua participação nessa via em tripanossomatídeos (Augusto-Pinto et al., 2003, Augusto-Pinto et al., 2001). Campos (2009) demonstrou que a deleção de um dos alelos de *MSH2* em *T. cruzi* cepa CL Brener causou sensibilidade das células ao estresse oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Do mesmo modo, Machado-Silva (2008) demonstrou que cepas de *T. brucei* nocaute para o gene *MSH2* também são mais sensíveis ao dano oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que parasitos do tipo selvagem. Diante disso, para verificar se a proteína SMYB1 seria capaz de complementar a função desempenhada pela proteína MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei* cepas heminocautes de *T. cruzi* e nocautes de *T. brucei* para o gene *MSH2* expressando a proteína SMYB1 foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

Nossos resultados demonstraram que os mutantes de *T. cruzi* assim como os mutantes de *T. brucei* expressando a proteína SMYB1 são mais resistentes ao dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio do que as cepas mutantes sem a presença de SMYB1 (Figura 22). Isso evidencia que a proteína SMYB1 foi capaz de complementar a função desempenhada pela proteína MSH2 nesses tripanossomatídeos.



**Figura 22:** Curva de sobrevivência dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* heminocaute e nocaute para MSH2 expressando SMYB1 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio. **A)** Cepas de *T. cruzi* heminocaute (TcMSH2), superexpressando SMYB1 (TcMSH2-SMYB1) e com o vetor pROCK vazio (TcMSH2-pROCK) foram submetidas às doses de 0, 50, 75 e 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de 1 x 10<sup>7</sup> células/mL. **B)** Cepas de *T. brucei* nocautes (TbMSH2), expressando SMYB1 (TbMSH2-SMYB1) e com o vetor vazio (TbMSH2-pRM482) foram submetidas às doses de 0, 50, 100 e 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

A proteína SMYB1 parece desempenhar funções diferentes em tripanossomatídeos quando presente em cepas selvagens e cepas mutantes. Podemos notar esse fato pelos resultados apresentados nas Figuras 21 e 22. SMYB1 complementa

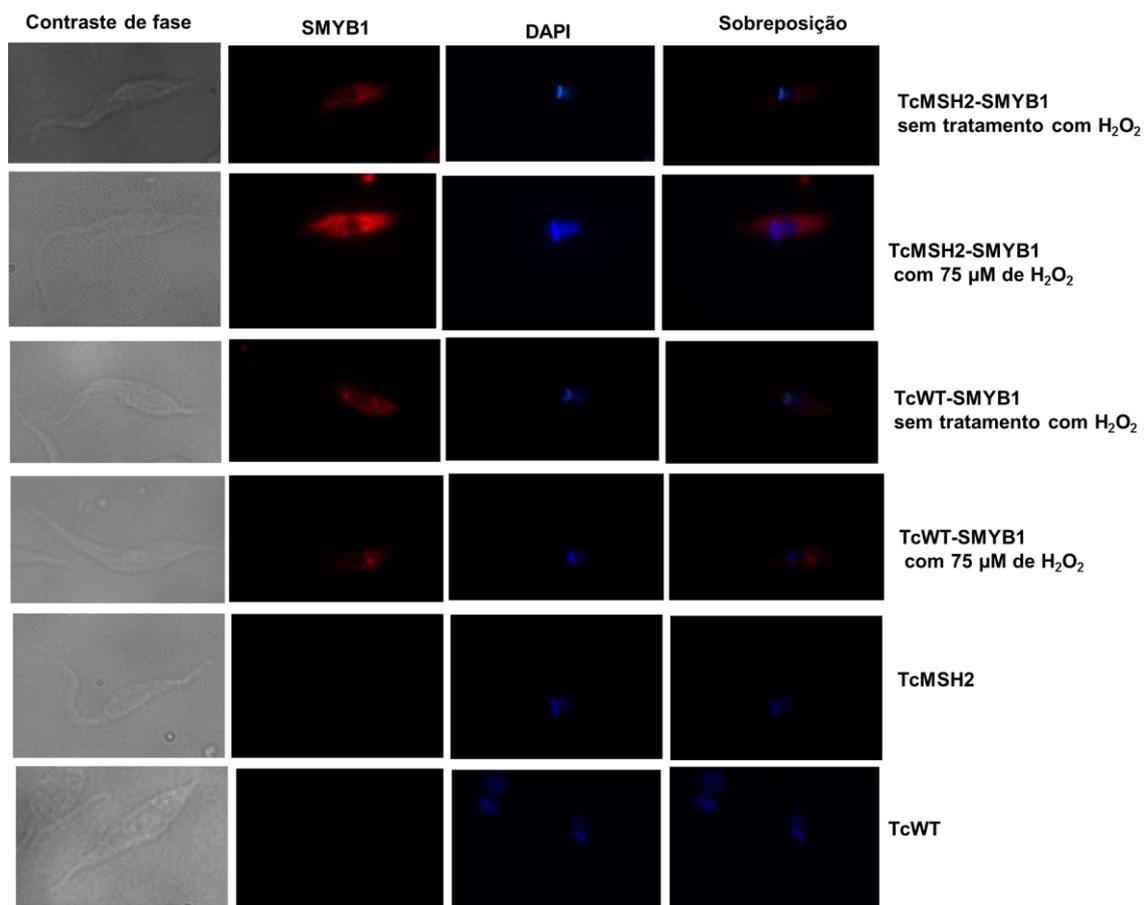
a função de reparo de DNA exercida por MSH2, podendo sugerir que SMYB1 possa participar da via de reparo por erro de pareamento de bases e na resposta ao estresse oxidativo, uma vez que MSH2 é o principal componente dessa via em eucariotos. A expressão de SMYB1 nas cepas selvagens de *T. cruzi* não apresenta nenhum efeito nesse organismo, uma vez que não houve diferença entre TcWT, TcWT-SMYB1 e TcWT-pROCK quando submetidos as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Entretanto, a presença de SMYB1 em cepas selvagens de *T. brucei*, parece produzir um fenótipo de dominância negativa, o que torna a cepa mais sensível ao tratamento com peróxido de hidrogênio, como já salientado anteriormente.

### **4.7 Localização subcelular da proteína SMYB1 em cepas selvagens e heminocautes de *T. cruzi***

O estudo da função de um gene pode ser investigado através de diversas formas. No presente estudo, procuramos inferir a função do gene SMYB1 no MMR e na resposta ao estresse oxidativo utilizando o *T. cruzi* e o *T. brucei* como organismos modelo. Para isso, analisamos os parasitos expressando SMYB1 por meio de ensaios fenotípicos em parasitos selvagens e heminocautes para o gene MSH2 bem como analisamos sua localização subcelular no parasito. Os resultados obtidos através das curvas de sobrevivência sugerem que SMYB1 complementa a função desempenhada pela proteína MSH2 em *T. cruzi*. Campos (2009) em sua tese, utilizando anticorpo anti-MSH2 de *T. cruzi*, demonstrou que a proteína MSH2 de *T. cruzi* (TcMSH2) está localizada de forma homogênea no citoplasma do parasito. Além disso, como mostrado na Figura 10, a proteína SMYB1 foi também localizada no citoplasma de células de *S. mansoni*. Ensaios de imunolocalização com o objetivo de avaliar a presença e localização da proteína SMYB1 foram realizados em células TcWT-SMYB1 e TcMSH2-SMYB1 tratadas e não tratadas com peróxido de hidrogênio, utilizando anticorpos anti-SMYB1. Como controle negativo foram utilizadas células TcWT e TcMSH2.

Através destes experimentos foi possível detectar a presença da proteína nas cepas TcWT-SMYB1 e TcMSH2-SMYB1 tratadas e não tratadas com peróxido de hidrogênio. Verificamos que a proteína SMYB1 está distribuída de forma homogênea no citoplasma do parasito (Figura 23). Não foi detectada nenhuma marcação nos

controles negativos (TcWT e TcMSH2). A presença da proteína no citoplasma reforça os resultados já mostrados de que SMYB1 estaria complementando a função de MSH2. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que SMYB1 esteja localizada na mitocôndria, tendo em vista que não usamos um marcador mitocondrial nesse experimento. E além disso, apesar de não ser uma análise quantitativa, podemos notar uma marcação mais forte nas cepas heminocutes após tratamento com peróxido de hidrogênio em relação as cepas não tratadas e as cepas selvagens expressando SMYB1.



**Figura 23: Localização subcelular da proteína SMYB1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunofluorescência.** Na figura, estão indicadas as imagens obtidas por contraste de fase, por coloração com DAPI e por incubação com anticorpo policlonal anti-SMYB1. A marcação foi realizada utilizando anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Cy-5. O núcleo e o cinetoplasto foram contra-corados com DAPI.

#### 4.8 Silenciamento do transcrito de RBP16 em *T. brucei* pelo mecanismo de RNA de interferência

Como mencionado anteriormente, outra proteína da família Y-box utilizada neste estudo foi a proteína de ligação ao RNA mitocondrial presente em *Trypanosoma*

*brucei* denominada RBP16, capaz de regular a edição e a estabilidade do RNA na mitocôndria (Hayman and Read, 1999). Como já foi demonstrado que proteínas da família Y-box são capazes de atuar no reparo de DNA e sabendo-se que SMYB1 foi capaz de suprir a ausência de MSH2, desempenhando um papel importante na sobrevivência dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio, nós então resolvemos verificar qual seria o efeito do silenciamento de RBP16 em formas sanguíneas do parasito *T. brucei* e ainda, qual seria o efeito de agentes genotóxicos nesse tripanossomatídeo silenciado para RBP16. Para isso, foi amplificado o gene RBP16 a partir de um DNA genômico do parasito usando iniciadores com sítios de recombinação AttB1 e AttB2 para ligação e clonagem no vetor pGL2084, desenvolvido para uma rápida geração do *stem-loop* de RNAi para uso em *T. brucei*. A correta clonagem do inserto de RBP16 no plasmídeo foi verificada através dos testes realizados com diferentes enzimas de restrição.

#### **4.9 Linhagens de *T. brucei* contendo o vetor de indução do silenciamento de RBP16**

Para realizar esse estudo, formas sanguíneas da cepa 2T1 de *T. brucei* foram transfectadas, por eletroporação, com o vetor contendo o gene RBP16 (pGL2084-RBP16). Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 contendo 2,5 µg/mL de higromicina e 0,5 µg/mL de fleomicina para a seleção dos parasitos com o vetor integrado em seu genoma. Após 7 dias da transfecção, apenas 2 clones foram selecionados e cultivados em meio HMI-9. Para verificar a integração do vetor no parasito, os clones selecionados que foram submetidos a tratamentos com o antibiótico puromicina morreram, o que indica a correta integração do cassete de RNAi, uma vez que células transfectadas tornam-se sensíveis a esse antibiótico. Após essa confirmação visual, partimos para o próximo passo que foi a indução do RNAi. Com esse intuito, tratamos as células com um 1 µg/mL de tetraciclina, além dos antibióticos de seleção higromicina e fleomicina, acompanhamos o crescimento das cepas e coletamos células para avaliar a expressão gênica de RBP16 por PCR quantitativa em tempo real.

#### **4.10 Nível de expressão gênica de RBP16 e o efeito do seu silenciamento no crescimento *T. brucei***

As formas sanguíneas de *T. brucei* com concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL foram utilizadas para a realização da PCR quantitativa em tempo real e da curva de

crescimento. A curva de crescimento foi produzida com e sem a presença do indutor de RNAi, a tetraciclina. Após a diluição no terceiro dia de contagem apenas as culturas com a presença de tetraciclina cresceram, enquanto as culturas sem tetraciclina se mantiveram estáveis. Para os ensaios de PCR quantitativa em tempo real foram coletadas células nos três primeiros dias de crescimento e para cada dia de coleta foram extraídos RNA total dos dois clones selecionados. A análise dos perfis de amplificação do transcrito codificador para RBP16 nas amostras utilizadas revelou que RBP16 é silenciada após 24 horas de indução com a tetraciclina e que o clone 1 apresentou maior eficiência no silenciamento de RBP16 que o clone 2 (Figura 24). Para a normalização da quantidade de transcritos de RBP16, o gene *housekeeping* GP18 foi usado como normalizador. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata.

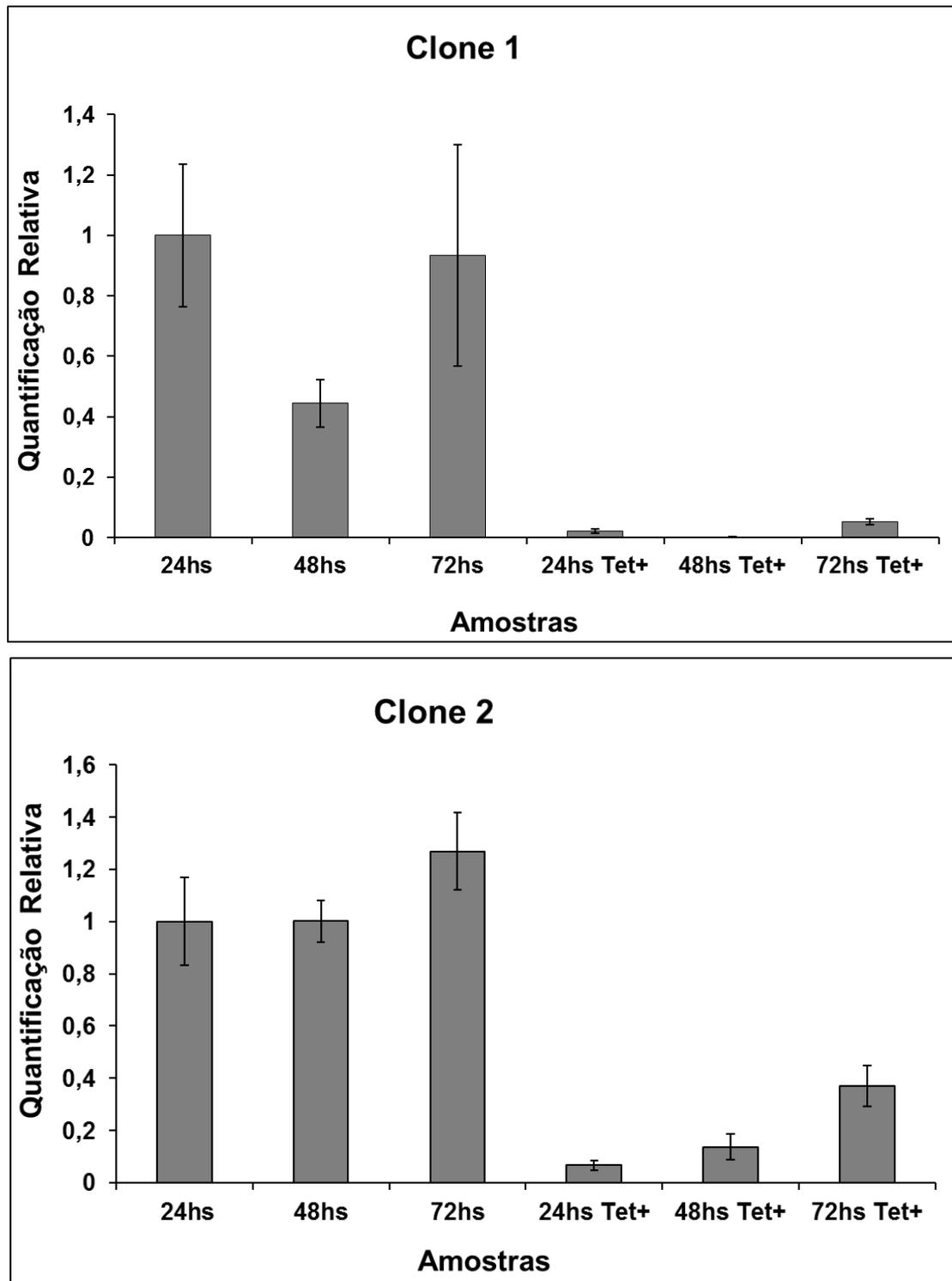
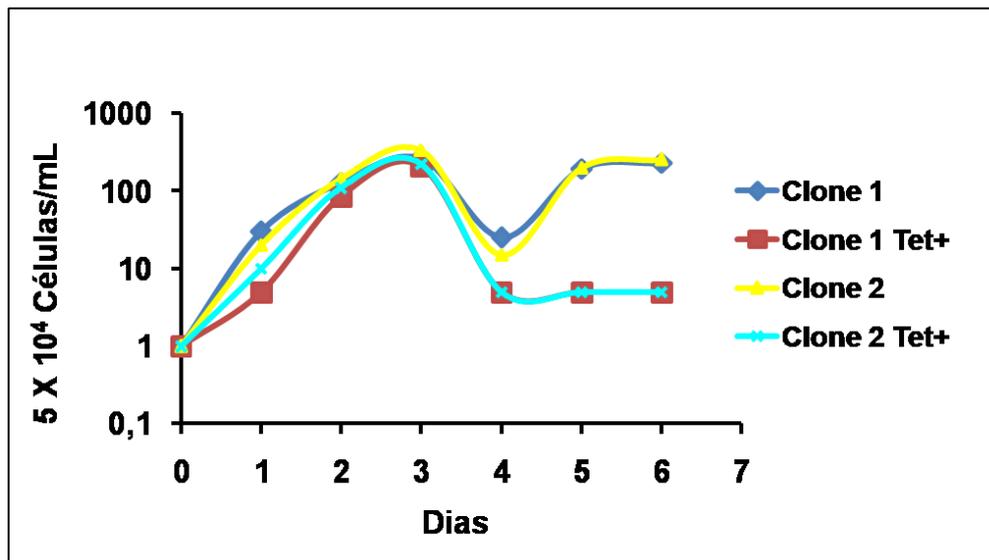


Figura 24: . PCR em tempo real para verificar o nível de silenciamento do transcrito de RBP16 no parasito *T. brucei*. Gráfico mostrando a quantificação relativa de transcritos de RBP16 em parasitos silenciados com relação aos parasitos não induzidos por Tetraciclina (Tet). Para normalização, o gene *housekeeping* GPI8 foi utilizado.

Ao analisarmos a curva de crescimento, verificamos que RBP16 parece ser essencial para o crescimento e sobrevivência do parasito (Figura 25), pois, após a diluição no terceiro dia, as células não retomavam o crescimento que é observado nas células normais não silenciadas para RBP16. É sabido que a proteína RBP16 é essencial para o crescimento da forma procíclica de *T. brucei* (Fisk et al., 2009), o que de certa forma é um indício de que, para a forma sanguínea, esta proteína também possa ser essencial.



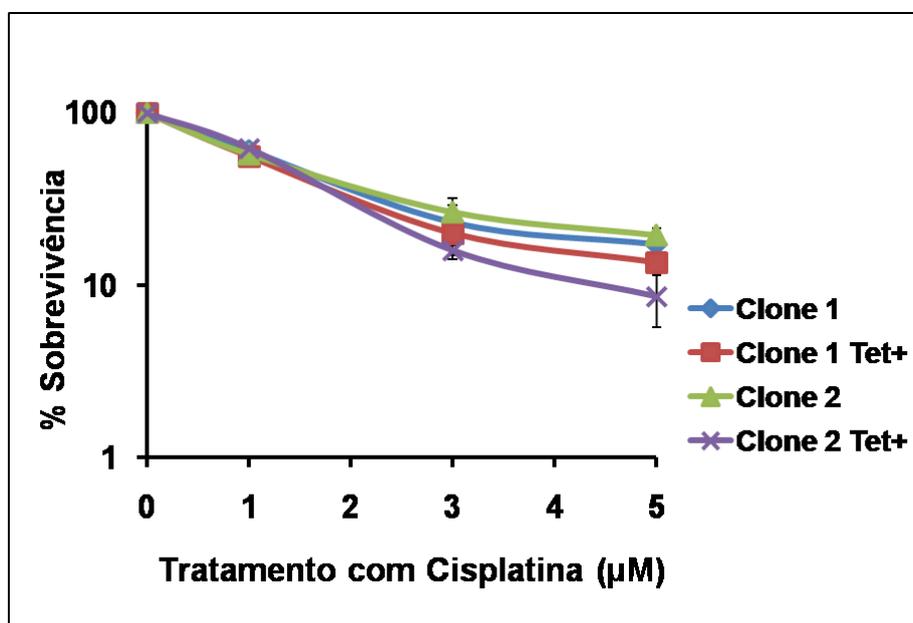
**Figura 25:** Curva de crescimento para verificar o efeito do silenciamento de RBP16 em cepas *T. brucei*. As cepas de *T. brucei* não silenciadas correspondem aos clones 1 e clone 2 e as cepas silenciadas induzidas com tetraciclina correspondem aos clone 1 Tet+ e clone 2 Tet+. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL. No terceiro dia após a contagem, as culturas foram diluídas para a concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL. Os valores mostrados no gráfico correspondem a média de um experimento realizado em triplicata.

#### 4.11 Efeito de RBP16 na sobrevivência do parasito *T. brucei* frente ao tratamento com agentes genotóxicos

A maioria dos estudos com a proteína RBP16 de *T. brucei* estão relacionados a sua ação na edição e estabilidade do RNA mitocondrial. Em alguns estudos foi demonstrado que essa proteína é capaz de interagir não só com RNA, mas também com DNA e com proteínas (Krainer et al., 1991, Hayman et al., 2001). Entretanto, em nosso estudo quisemos verificar se RBP16 desempenha alguma função nas vias de reparo de DNA, tendo em vista que proteínas da família Y-box, como anteriormente mencionado,

possuem função nesse mecanismo. Para isso, culturas selvagens e silenciadas para RBP16 foram submetidas a tratamentos com diferentes agentes genotóxicos.

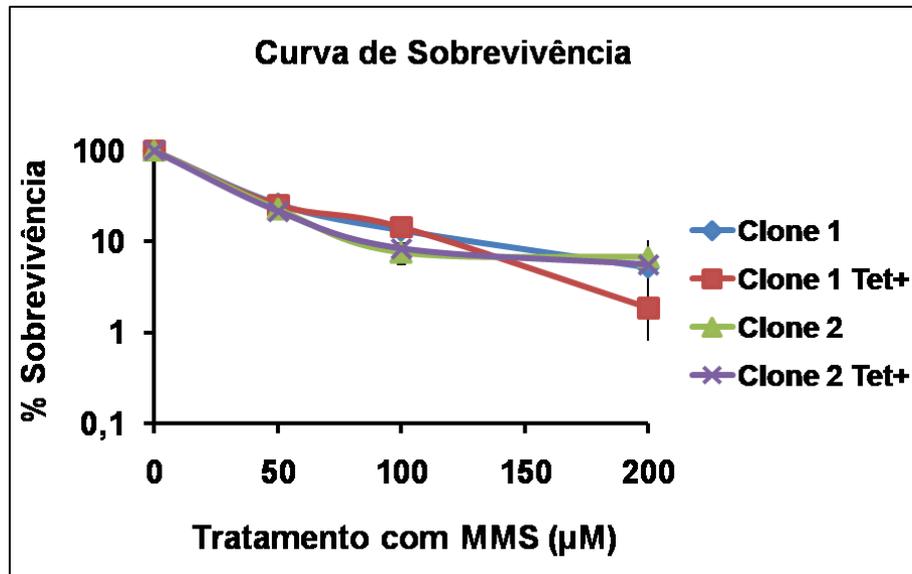
A cisplatina é uma droga amplamente utilizada no tratamento do câncer. Ela forma ligações cruzadas intra e entre fitas do DNA, que leva à morte celular se os danos não foram adequadamente reparados. As culturas selvagens e com RBP16 silenciadas foram submetidas a diferentes concentrações dessa droga, entretanto, não foram observadas diferenças na sobrevivência entre as culturas do tipo selvagem e silenciadas para RBP16 (Figura 26), indicando que esta proteína não desempenha um papel chave no reparo de lesões causadas por esse agente genotóxico no parasito *T. brucei*.



**Figura 26: Efeito do tratamento com cisplatina na sobrevivência do parasito *T. brucei* silenciado para RBP16.** Formas sanguíneas não silenciadas (clone 1 e clone 2) e silenciadas (clone 1 Tet+ e clone 2 Tet+) para RBP16, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas com 0, 1, 3 e 5 µM de cisplatina. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

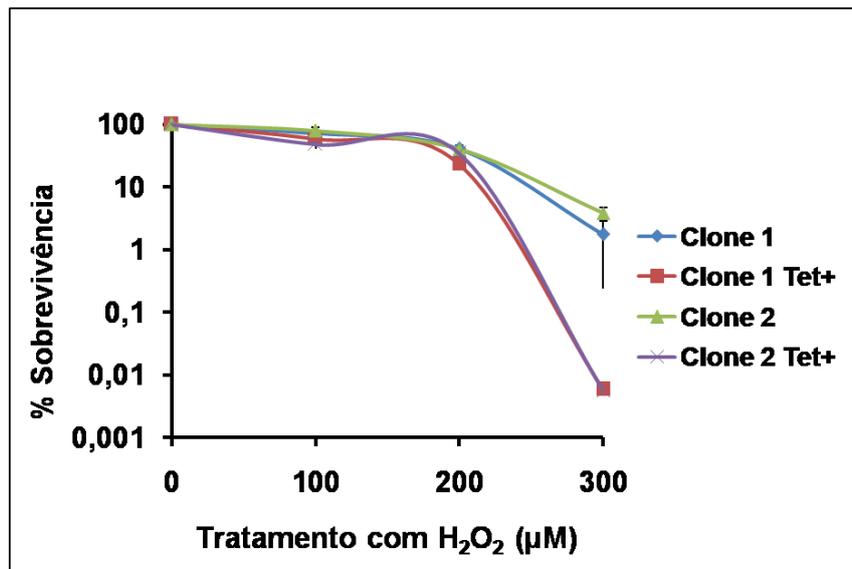
Outro agente genotóxico utilizado nesse estudo foi o MMS. Como mencionado anteriormente, o MMS é um agente alquilante que pode modificar guaninas (para 7-metilguanina) e adeninas (para 3-metiladenina) (Beranek, 1990, Lundin et al., 2005). Além desses danos, o MMS gera quebras de fita simples e quebras de fita dupla, mas não se sabe ao certo se ele causa diretamente essas quebras de fitas de DNA, ou se é resultado de eventos de reparo de DNA como, por exemplo, o reparo por excisão de

base ou pelo colapso da forquilha de replicação (Wyatt and Pittman, 2006). As culturas de *T. brucei* do tipo selvagem e com RBP16 silenciada foram submetidas à diferentes concentrações de MMS e, assim como para a cisplatina, não foi observada diferença na sobrevivência entre as culturas analisadas (Figura 27).



**Figura 27:** Efeito do tratamento com MMS na sobrevivência do parasito *T. brucei* silenciado para RBP16. Formas sanguíneas não silenciadas (clone 1 e clone 2) e silenciadas (clone 1 Tet+ e clone 2 Tet+) para RBP16 foram tratadas com 0, 50, 100 e 200 µM de MMS. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas experimentais das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

A contribuição de RBP16 para o reparo de lesões oxidativas no DNA desses parasitos também foi avaliada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. O silenciamento de RBP16 causou um aumento na sensibilidade ao peróxido de hidrogênio das células silenciadas em comparação às células não silenciadas (Figura 28). Esses dados indicam que RBP16 possui um papel na sobrevivência dos parasitos ao tratamento com peróxido de hidrogênio.



**Figura 28: Efeito do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na sobrevivência do parasito *T. brucei* silenciado para RBP16.** Formas sanguíneas não silenciadas (clone 1 e clone 2) e silenciadas (clone 1 Tet+ e clone 2 Tet+) para RBP16 foram tratadas com 0, 100, 200 e 300 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parasitos foram cultivados em meio HMI-9. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas experimentais das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

# **5. DISCUSSÃO**

Para assegurar a precisa utilização da informação genética, a expressão gênica é regulada em nível transcricional, bem como em nível pós-transcricional, incluindo os processos de *splicing*, transporte, localização, estabilidade e tradução do mRNA (Hallikas et al., 2006, Mata et al., 2005, Keene, 2007). Durante a evolução, a maquinaria celular desenvolveu caminhos precisos para discriminar um mRNA de outro, permitindo que cada transcrito possa ser estocado, modificado, traduzido ou degradado, dependendo da necessidade da célula pelo mRNA, ou pela proteína por ele codificada (Vlasova and Bohjanen, 2008). O estudo de proteínas relacionadas à regulação da expressão gênica é extremamente importante, uma vez que as características adaptativas do organismo resultam de uma ação recíproca entre DNA, ou RNA e os aparatos regulatórios que contém proteínas capazes de se ligar a essas moléculas (Mata et al., 2005). O conhecimento da forma de atuação de tais proteínas nos permite entender como o organismo mantém seu balanço metabólico e sua homeostase.

As proteínas da família Y-box, por serem reguladores multifuncionais da expressão gênica, tornaram-se alvo de muitos estudos, pois participam da regulação em nível transcricional e traducional (Kohno et al., 2003, Eliseeva et al., 2011). É bem conhecido que proteínas desta família participam de quase todos os eventos de regulação da expressão gênica (Lyabin et al., 2011) como a transcrição do mRNA (Skabkina et al., 2005), *splicing* (Raffetseder et al., 2003) e o controle da meia vida dos transcritos (Evdokimova et al., 2001), assim como tem atuação também no reparo de DNA, replicação e recombinação (de Souza-Pinto et al., 2009, Kuwano et al., 2004).

SMYB1, objeto de estudo desse trabalho, apresenta em sua estrutura os domínios CSD e cauda que permitem a interação desta proteína com DNA e RNA, o que a torna um candidato importante de atuação na regulação da expressão gênica em *S. mansoni*. Nosso grupo, em estudos anteriores, demonstrou que SMYB1 é capaz de interagir com DNA fita simples e fita dupla, com RNAs (Valadao et al., 2002) e com as proteínas SmPur- $\alpha$  e SmRNP de *S. mansoni*, esta última uma proteína importante na montagem de complexos ribonucleoprotéicos nucleares pequenos (Valadão 2002 e manuscrito apresentado como anexo a este trabalho de Tese). Esses achados sugerem que SMYB1 possa estar envolvida na regulação de eventos pós-transcricionais.

O parasito *S. mansoni* possui um ciclo de vida bastante complexo, com alternância de fases entre formas livres, que vivem na água e formas que vivem no interior de dois hospedeiros, vertebrado ou invertebrado. Cada estágio do seu ciclo de

vida envolve diversas transformações, tanto morfológicas quanto fisiológicas, necessárias para a apropriada adaptação do parasito a estes diferentes ambientes (Neves, 2005). Assim, a avaliação da presença de uma proteína nas diversas fases do ciclo de vida pode nos ajudar a entender melhor a sua função biológica no parasito. Como uma importante etapa na caracterização de SMYB1, fizemos experimentos de imunolocalização usando anticorpo anti-SMYB1, produzido por Valadão (1998), nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. Mostramos que SMYB1 está localizada no citoplasma de células do parasito nos estágios de vermes adultos machos, vermes adultos fêmeas, ovos, miracídios, cercárias e esquistossômulos. A presença de SMYB1 em todas as fases estudadas do ciclo de vida corrobora achados anteriores em que foi demonstrado que o cDNA de SMYB1 estava presente em todas os estágios de vida do *S. mansoni* (Franco et al., 1997b). Na literatura existem vários exemplos de genes regulatórios expressos em todas as fases do ciclo de vida do parasito e podemos citar aqui alguns destes: o gene codificador da proteína citoplasmática SmPKC1 (um membro da família das proteínas quinases C) que, por análise de PCR quantitativa em tempo real, foi verificado a sua expressão em todas as fases do parasito (Bahia et al., 2006); e os genes codificadores das proteínas nucleares SmSMT3C e SmSMT3B (envolvidas em modificações pós-traducionais) que foram também encontrados se expressando nas fases de ovo, vermes adultos, esquistossômulo e cercária (Cabral et al., 2008).

Vários estudos com proteínas Y-box citoplasmáticas demonstraram sua habilidade de interagir com moléculas de mRNA e regular sua tradução. Dong e colaboradores (2009) mostraram que a proteína humana YB-1, presente no citoplasma de células MCF7 derivadas de câncer de mama, liga-se preferencialmente a mRNA com alto conteúdo de GC. Em outro estudo, foi demonstrado que a proteína YB-1 é mais abundante no citoplasma do que outras proteínas de ligação a RNA e assim ela teria a capacidade de estabilizar as moléculas de mRNA, agindo no processo da tradução juntamente com PABP (proteína de ligação a cauda poli-A) e estimulando a ligação de eIF4F (Fator 4F inicial da tradução em eucariotos) ao mRNA (Svitkin et al., 2009). Curiosamente, em outro trabalho foi demonstrado que YB-1 é capaz de se ligar ao seu próprio RNA e regular a tradução dela mesma (Skabkina et al., 2005). Outra proteína da família das Y-box, a MSY2, predominantemente localizada no citoplasma de células germinativas de camundongos, age como um co-ativador da transcrição em células germinativas de machos e possui uma função importante na repressão da tradução e

armazenamento de mRNAs nas espermátides e oócitos de machos e fêmeas, respectivamente (Yang et al., 2006).

A localização citoplasmática de SMYB1, juntamente com a sua habilidade de se ligar a RNA (Valadao et al., 2002) e também de interagir com proteína SmRNP sugere uma função de SMYB1 no metabolismo de RNA. Como sabemos, a regulação da expressão gênica depende de uma multiplicidade de interações entre proteína-DNA, proteína-proteína e proteína-RNA (de Oliveira et al., 2004). Já foi demonstrado também que a localização de mRNA nas células é importante para a regulação espacial da expressão de genes (Matsumoto et al., 2012). O processo de localização é determinado por elementos nos mRNAs e por proteínas que se ligam a eles e as proteínas YB-1 podem exercer um papel importante neste processo (Matsumoto et al., 2012). A localização de SMYB1 em células e nos tecidos de *S. mansoni* pode dar uma indicação sobre o seu papel funcional no parasito.

Atualmente, o estudo do transcriptoma do parasito em profundidade vem permitindo uma análise temporal e quantitativa da expressão gênica que são cruciais para explorar diferentes conjuntos de dados e avaliar a biologia do organismo em nível molecular (Nahum et al., 2012). A análise do transcriptoma do parasito é importante também para estudar mecanismos regulatórios pós-transcricionais como o *splicing* alternativo e o *trans-splicing* (Cheng et al., 2006, Verjovski-Almeida and DeMarco, 2011, DeMarco et al., 2006, Hastings, 2005). É sabido que os esquistossomos usam esses mecanismos para manter seu complexo ciclo de vida. O processamento pós-transcricional tem sido proposto como um mecanismo de geração de variantes de proteínas que pode permitir adaptação do parasito às respostas imunes dos diferentes hospedeiros (Nahum et al., 2012). Assim, um compreensivo entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na esquistossomose pode contribuir para a intervenção efetiva da doença.

Diante disso, notamos a importância de se estudar proteínas que interagem com ácidos nucleicos. Verjovski-Almeida e colaboradores (2003), ao analisarem o transcriptoma de *S. mansoni* de acordo com as categorias de ontologias gênicas relacionadas a processos biológicos, observaram que a categoria de metabolismo de ácidos nucleicos foi a segunda mais representativa, perfazendo um total de 12% das ESTs analisadas. Esses autores verificaram que, dos 15 domínios protéicos mais frequentes, a maioria exercia o papel na comunicação intercelular, ou na regulação transcricional. Foi verificado através da metodologia de SAGE que 9,7 % dos genes

mais abundantemente expressos (genes que apresentavam mais de 500 *tags*) em vermes adultos pertenciam à categoria de ligantes de ácidos nucleicos (como função molecular de ontologias gênicas) (Ojopi et al., 2007). E, além disso, já foi sugerido que proteínas envolvidas nos sistemas de replicação, transcrição e reparo do DNA deveriam ser estudadas como alvos potenciais de drogas contra o *S. mansoni* (Han et al., 2009).

O reparo do DNA envolve a participação de inúmeras proteínas que auxiliam na remoção de lesões e na manutenção da integridade do genoma (Kunkel and Erie, 2005). A proteína MSH2, o componente central da via de MMR, foi caracterizada em *T. cruzi* (Augusto-Pinto et al., 2001, Augusto-Pinto et al., 2003) e em *T. brucei* (Bell et al., 2004) indicando a presença de MMR funcional nesses tripanossomatídeos. Em linhagens heminocautes para o gene MSH2 em *T. cruzi* foi verificado que essas cepas são mais susceptíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio em relação a cepas selvagens, porém, não foram observadas diferenças significativas frente ao tratamento com cisplatina (Campos et al., 2010). Em *T. brucei*, linhagens nocautes para o gene MSH2, também se mostraram mais sensíveis aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio do que células selvagens e, além disso, apresentaram aumento da instabilidade de microsátélites (fenótipo característico de células nocautes para MSH2 causado pela deficiência na via MMR) e resistência a MNNG. Entretanto, células deficientes em MLH1 não apresentam sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, o que sugere que esse fenótipo está relacionado a uma atividade de MSH2 independente de outras proteínas do MMR (Machado-Silva et al., 2008). Machado-Silva e colaboradores (2008) verificaram que a complementação dos nocautes para MSH2 em *T. brucei* com o MSH2 de *T. cruzi* é capaz de restaurar o fenótipo de resistência ao peróxido de hidrogênio, mas não a completa funcionalidade da via de MMR, o que sugere que a resposta aos danos oxidativos gerados no DNA ocorre por uma via independente do MMR nos dois parasitos.

O desenvolvimento de protocolos de transfecção foi fundamental para que a função de genes pudesse ser estudada em tripanosomatídeos a partir de estratégias de manipulação gênica como a complementação funcional heteróloga e o silenciamento de genes, que permite investigar vias metabólicas, como o reparo de DNA, que são essenciais para o entendimento da biologia do parasito. Baseando-se nessas estratégias e sabendo-se que o reparo de DNA é uma das várias características desempenhada por proteínas da família Y-box, decidimos investigar a atividade de SMYB1 e de RBP16 em tripanossomatídeos. A atividade de SMYB1 foi analisada em organismos selvagens,

heminocautes e nocautes para o gene MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente, avaliando o envolvimento desses parasitos na resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio.

Esse trabalho demonstrou que a presença do gene SMYB1 não impediu o crescimento normal de *T. cruzi* e *T. brucei*. SMYB1 por ser um gene exógeno aos tripanossomatídeos poderia impedir o seu crescimento e o desenvolvimento normal, o que é bastante comum em experimentos *in vivo* que envolvem ensaios de complementação funcional heteróloga. Furtado e colaboradores (2012) ao tentar expressar o gene *TcOGG1* (gene da 8-oxoguanina DNA glicosilase de *T. cruzi*) em *E. coli* não obtiveram êxito em seu experimento, uma vez que esse gene foi tóxico para o desenvolvimento bacteriano causando a sua morte.

Em nossos estudos verificamos que SMYB1 foi capaz de complementar a função desempenhada por MSH2 em cepas heminocautes e nocautes de *T. cruzi* e *T. brucei*, quando submetidos ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Dessa forma, os resultados sugerem que a proteína SMYB1 possa reconhecer lesões oxidativas no DNA, incluindo a 8-oxoG que tem sua produção aumentada na presença de peróxido de hidrogênio, e na resposta ao estresse oxidativo, desempenhando a mesma função de reparo realizada pela proteína MSH2.

Pestryakov e colaboradores (2012), ao analisarem a interação de YB-1 com sítios AP em DNAs fita dupla e fita simples, verificaram que YB-1 tem maior afinidade pelos sítios AP do DNA fita simples, suprimindo a atividade da enzima NEIL1. Na presença de radiação UV, ou em tratamentos com cisplatina YB-1 liga-se ao elemento Y-box presente nos promotores de genes MDR (*Multi Drug Resistance*) aumentando sua expressão (Ohga et al., 1998), além disso, é capaz de interagir com PCNA (Ise et al., 1999), um componente dos vários sistemas de reparo do DNA (Jonsson and Hubscher, 1997). Em outro estudo foi demonstrado que YB-1 promove a separação da fita dupla de DNA contendo erro de pareamento de base e modificações causadas por cisplatina, independente da sequência de nucleotídeos deste DNA. Eliseeva e colaboradores (2011), em seu trabalho de revisão, citaram várias proteínas do sistema de reparo que interagem com proteínas YB-1 na via BER (PCNA, p53, hNth1, NEIL2, DNA ligase III $\alpha$ , DNA polymerase  $\beta$ , DNA polymerase  $\delta$ , WRN, Ku80, MSH2, e APE-1); NER (PCNA, p53, DNA ligase III $\alpha$ , DNA polymerase  $\delta$ ), reparo por quebra simples (DNA ligase III $\alpha$  e APE-1), reparo por quebra dupla (WRN e Ku80), MMR (PCNA e MSH2) e reparo por recombinação (WRN e MSH2), evidenciando que essas proteínas possam

participar de todas as vias de reparo, sendo que elas se ligam com inúmeras proteínas da via BER e são capazes de interagir também com a proteína MSH2. Entretanto, ainda são necessárias muitas análises *in vitro* e *in vivo* para confirmar a interação funcional entre proteínas da família Y-box e proteínas de reparo do DNA.

A superexpressão de SMYB1 em cepas selvagens de *T. cruzi* não influencia na sobrevivência ao dano oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, ao avaliarmos a expressão de SMYB1 em cepas selvagens de *T. brucei* verificamos que a presença de SMYB1 torna a cepa mais sensível ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente levando à produção de um fenótipo de dominância negativa. Como sabemos, a atividade de MMR depende da capacidade ATPásica dos heterocomplexos eucarióticos formados pelas proteínas MSH2 e MSH6 e pelas proteínas MSH2 e MSH3 (Campos, 2009), assim a expressão exógena de SMYB1 pode estar interferindo na formação desses heterocomplexos e dificultando a atividade de reparo de DNA causado pelo peróxido de hidrogênio e, assim, sensibilizando as células WT de *T. brucei*. É possível também que em células WT, a expressão de SMYB1 promova uma competição com MSH2 pelas suas proteínas parceiras, sequestrando-as e interferindo com o reparo das lesões de DNA pelo processo de MMR. É importante ressaltar que variações na eficiência de outros componentes da via de MMR, bem como de componentes de outras vias de reparo de DNA, podem também estar envolvidos na modulação da eficiência do MMR em tripanossomatídeos.

Em resposta à exposição das células aos agentes que causam danos ao DNA, como a luz UV e agentes oxidantes, YB-1 desloca do citoplasma para o núcleo (Cohen et al., 2010, Koike et al., 1997, Das et al., 2007). Ao translocar do citoplasma para o núcleo da célula, a YB-1 ativa a transcrição gênica de várias proteínas protetoras, incluindo proteínas que conferem resistência a múltiplas drogas. Quando envolvidas no reparo de DNA no núcleo, YB-1 aumenta a resistência das células aos agentes xenobióticos e a radiação ionizante (Eliseeva et al., 2011). O nível de expressão de YB-1 no núcleo tem sido utilizado como um indicador de resistência a drogas em pacientes com câncer de mama, ovário e sarcoma sinovial (Bargou et al., 1997, Janz et al., 2002, Rubinstein et al., 2002, Yahata et al., 2002, Oda et al., 2003).

Em nosso trabalho SMYB1 apresentou localização citoplasmática, antes e após tratamento com peróxido de hidrogênio em *T. cruzi*. Tendo em vista que SMYB1 apresentou localização citoplasmática nas diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, que a maioria das proteínas Y-box apresenta localização citoplasmática e,

além disso, que a proteína MSH2 em *T. cruzi* também apresenta localização citoplasmática (Campos, 2009) nossos resultados estão de acordo com o encontrado na literatura. No entanto, esperávamos uma localização nuclear ou mitocondrial de SMYB1 nos parasitos expostos ao peróxido de hidrogênio, tendo em vista que SMYB1 complementou a função desempenhada por MSH2, mostrando uma atividade de reparo no DNA. Entretanto, nenhum experimento de localização de MSH2 foi realizado após tratamento com agentes genotóxicos (Campos, 2009).

Gaudreault e colaboradores (2004) mostraram que YB-1 transloca do citoplasma para o núcleo duas horas após o tratamento com cisplatina. Assim, a localização citoplasmática de SMYB1 em *T. cruzi* não exclui a possibilidade dela ser recrutada para o núcleo precocemente e retornar posteriormente ao citoplasma, tendo em vista que a localização protéica foi realizada 24 horas após o tratamento com peróxido de hidrogênio. Dessa forma, serão necessários experimentos com um tempo menor de exposição do parasito à droga. Já para MSH2, alguns trabalhos sugerem que a sua translocação para o núcleo é dependente da pré-formação do heterodímero MSH2-MSH6 no citoplasma (Hayes et al., 2009) e SMYB1, apesar de ter desempenhado a função de MSH2, poderia atuar de outra forma no reparo e não necessariamente por interação com MSH6.

Atualmente foi proposta a existência de uma nova via de MMR na mitocôndria humana, que incluiu a YB-1 humana como um dos participantes. Extratos mitocondriais com diminuição da expressão de YB-1 mostraram significativa redução da atividade de reconhecimento de erros de pareamento no DNA e na atividade de MMR. A diminuição da expressão de YB-1 também resultou em uma baixa taxa da respiração celular, sugerindo uma disfunção mitocondrial. Outro fato interessante em relação à diminuição da expressão de YB-1 é que houve um aumento na taxa de mutagênese do mtDNA, o que implica que YB-1 pode evitar mutações (de Souza-Pinto et al., 2009). Baseado nisso e nos dados encontrados com SMYB1 em *T. cruzi* e *T. brucei* resolvemos investigar o papel da proteína RBP16 no reparo de DNA. Assim, foram gerados parasitos silenciados para o gene RBP16. Apesar do *T. cruzi* também apresentar um ortólogo de RBP16, esse experimento foi realizado apenas em *T. brucei*, pois utilizamos o silenciamento por interferência de RNA (RNAi). Essa técnica não pode ser utilizada para a diminuição da expressão gênica em *T. cruzi*, uma vez que esse parasito assim como *L. major* não possuem os componentes da maquinaria de RNAi, o que foi evidenciado a partir da publicação da sequência do genoma desses parasitos. Apenas *T.*

---

*brucei* apresenta o gene de Ago1, bem como o ortólogo da Dicer (Shi et al., 2006a, Shi et al., 2006b).

O nosso trabalho mostrou que o ortólogo de SMYB1 em *T. brucei*, a proteína RBP16, participa de processos essenciais no parasito, pois a redução de seus níveis leva a uma diminuição do crescimento das células da forma sanguínea. Pelletier and Read (2003) ao estudar o silenciamento de RBP16 em *T. brucei* demonstraram que RBP16 é essencial para o crescimento de formas procíclicas do parasito e, além disso, verificaram fortes evidências que RBP16 apresenta uma função na edição do RNA mitocondrial *in vivo*. A diminuição da expressão de RBP16 em formas procíclicas de *T. brucei* resultou na redução da edição nos níveis de mRNA de apocitocromo b (CYb), o que sugere que RBP16 possui uma função essencial na edição do mRNA de CYb (Miller et al., 2006). Foi observado também que o silenciamento de RBP16 mediado por RNAi resultou na diminuição dos níveis do mRNA da subunidade 4 da desidrogenase do NADH (ND4) e do mRNA da subunidade 1 da citocromo oxidase (COI), indicando a importância de RBP16 na estabilização dessas duas moléculas de RNAs (Pelletier and Read, 2003). Como podemos notar, de acordo com sua natureza multifuncional, RBP16 é extremamente importante para ligação a RNAs e, além disso, já foi mostrado *in vivo* e *in vitro* a associação de RBP16 a ambos mRNA e gRNA, enfatizando sua importância na regulação gênica em *T. brucei* (Goulah and Read, 2007, Hayman and Read, 1999, Miller and Read, 2003, Pelletier et al., 2000). RBP16 exibiu atividade no anelamento de gRNA com o pré-mRNA e atividade de separação dos RNAs, sendo assim, RBP16 atuaria na edição e estabilidade de mRNAs mitocondriais específicos, provavelmente através da sua capacidade de se ligar a RNA e de modular as interações RNA-RNA (Ammerman et al., 2008). Fisk e colaboradores (2009) avaliaram o crescimento das formas procíclicas e sanguíneas de *T. brucei* após o silenciamento do gene de RBP16 e dos genes das proteínas MRP1 e MRP2, de forma simultânea e/ou separados. MRP1 e MRP2 são proteínas de ligação ao RNA mitocondrial que formam um complexo heteromérico que atua na edição do RNA do cinetoplasto (Schumacher et al., 2006). Esses autores verificaram que a diminuição da expressão de RBP16 e de MRP1/2 de forma simultânea ou separada prejudica o crescimento das formas procíclicas do parasito. Já ao analisarem a forma sanguínea não verificaram diferença no crescimento das cepas analisadas, o que contrasta com nossos resultados. Em nosso trabalho, começamos a curva de crescimento com uma concentração de células de  $5 \times 10^4$  células/mL e após 4 dias, quando as células atingiram a fase estacionária de crescimento,

todas essas, silenciadas ou não para RBP16 morreram, uma vez que formas sanguíneas de *T. brucei* quando atingem a fase logarítmica de crescimento tendem a morrer. Por isso, três dias após o início da curva de crescimento fizemos uma diluição para o retorno à concentração inicial ( $5 \times 10^4$  células/mL), o que é o comum para esse tipo de experimento. Só após essa diluição verificamos que as células silenciadas não retomavam o crescimento normal, quando comparadas às células não silenciadas para RBP16.

Demonstramos que a proteína RBP16 atua na resposta a lesões oxidativas no DNA causado por peróxido de hidrogênio, mas não atua no reparo de adutos de DNA causado pela cisplatina, ou alquilação no DNA promovida pelo MMS, uma vez que as formas sanguíneas do parasito com RBP16 silenciada responderam diferentemente ao tratamento com agentes genotóxicos, cisplatina, MMS e  $H_2O_2$ . A inclusão de RBP16 na família de proteínas Y-box com atividade multifuncional e as diversas propriedades de ligação ao RNA sugere múltiplas funções de RBP16 na regulação da expressão gênica mitocondrial de *T. brucei* e, além disso, também podemos associá-la ao reparo de DNA. A identificação de RBP16 associada ao reparo de DNA ainda não havia sido estudada, sendo que esses achados são importantes para direcionar futuros estudos de RBP16 relacionados à biologia do parasito. Entretanto, são necessários estudos para verificar se o reparo ocorre no núcleo ou na mitocôndria, ou se em ambos locais. A mitocôndria de *T. brucei* é extremamente diferenciada e envolve a expressão gênica através da coordenação de múltiplos processos incluindo processamento ribonucleolítico de transcritos primários, poliadenilação, estabilidade e edição do RNA (Bhat et al., 1992, Militello and Read, 1999, Stuart and Panigrahi, 2002, Lukes et al., 2005) e os mecanismos de reparo de DNA estão extremamente interligados com a regulação do ciclo celular, transcrição e replicação, os quais usam fatores comuns (Berra et al., 2006), evidenciando assim a importância de se estudar o reparo de DNA nesse parasito.

Os tripanossomatídeos têm que lidar constantemente com espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) produzidas pelo hospedeiro e por seu próprio metabolismo. A produção de ROS faz parte da estratégia microbicida de macrófagos ao serem invadidos por microorganismos. Além disso, durante o processo de respiração mitocondrial do próprio tripanossomatídeo ânios superóxido, produzidos como produtos intermediários, são convertidos a peróxido de hidrogênio espontaneamente ou através da ação da enzima superóxido dismutase. Um alto nível de ROS nas células gera danos a proteínas, lipídios e ao DNA, eventualmente levando a morte celular (Alzate et al.,

2007). Como mencionado anteriormente, os tripanossomatídeos possuem uma mitocôndria única e por isso deve ser protegida de lesões e mutações no DNA genômico. Assim a resistência ao estresse oxidativo é essencial nesses organismos e está diretamente relacionada com seu sucesso na infecção e proliferação no hospedeiro. Os tripanossomatídeos não possuem as proteínas homólogas as catalases e glutathione peroxidase de eucariotos superiores, que convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Alzate et al., 2007), entretanto esses organismos possuem outras classes de peroxidases e oxidases alternativas que evitam a produção de ROS. A principal via responsável pela remoção de bases oxidadas no DNA é a via do BER, entretanto o MMR está envolvido na resposta a dano oxidativo em vários organismos, desde bactérias a humanos (Slupphaug et al., 2003, Kovtun and McMurray, 2007). Nosso trabalho evidenciou que as proteínas da família Y-box, SMYB1 e RBP16, atuam no reparo causado por estresse oxidativo, tendo em vista que a expressão de SMYB1 tornou as células mais resistentes e que a diminuição da expressão de RBP16 tornou as células mais sensíveis na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É sabido que em outros organismos, o papel principal do MMR na resposta a dano oxidativo parece ser o reconhecimento e reparo por MMR envolvendo a 8-oxoG, uma das lesões mais citotóxicas e estáveis produzidas no DNA por espécies reativas de oxigênio ou após exposição a radiação (Earley and Crouse, 1998, Ni et al., 1999, Minowa et al., 2000). Dessa forma, seria interessante medir o nível de 8-oxoG produzida em células RBP16 silenciadas para verificar a intensidade do reparo que acontece nessas células frente o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ao contrário do que foi descrito para a YB-1 (Hasegawa et al., 1991, Izumi et al., 2001, Ohga et al., 1996, Ise et al., 1999), a RBP16 não atua no reparo de DNA causado por agentes genotóxicos como a cisplatina e o MMS, o que reforça que RBP16 possa estar envolvida na via de resposta ao estresse oxidativo e no MMR, assim como MSH2. Como mencionado anteriormente, a cisplatina age principalmente através da formação de adutos no DNA, especialmente em guaninas adjacentes (Jamieson and Lippard, 1999, Ramachandran et al., 2009). Os adutos causam paradas na replicação, ativação de *checkpoints* de ciclo celular com parada prolongada em G2 e, em casos de danos severos, morte celular (Ramachandran et al., 2009, O'Brien and Brown, 2006) e o agente alquilante MMS reage com o DNA provocando metilação em guaninas (para 7-metilguanina) e adeninas (para 3-metiladenina) (Beranek, 1990, Lundin et al., 2005), o que pode levar ao bloqueio da replicação, resultando em parada de ciclo celular na fase S, aberrações cromossômicas, apoptose, entre outros (Engelward et al., 1998). Além de

investigar a atividade de RBP16, uma variedade de outras proteínas envolvidas no reparo de DNA e outros aspectos não relacionados com estrutura e função dessas proteínas poderão ser considerados no futuro. Para verificarmos se a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cepas com RBP16 silenciada é devida ao MMR, poderíamos analisar a sensibilidade dos clones expostos à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de um inibidor específico dessa via de reparo, o cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>). O cádmio, um conhecido carcinógeno humano, quando presente em baixas concentrações (na ordem de micromolares), é um inibidor específico da via de reparo de erros de pareamento em leveduras e em extratos de células humanas (Jin et al., 2003) e esse efeito também foi visto em linhagens celulares derivadas de fibrosarcoma humano (Slebos et al., 2006). Em altas concentrações, é também inibidor de outras vias de reparo, como BER e NER, possivelmente por deslocamento de íons zinco nos motivos “dedos de zinco” de proteínas como *fpg*, OGG1, XPA e PARP (Hartwig and Schwerdtle, 2002, Beyersmann and Hartwig, 2008). É importante ressaltar que as vias de reparo não ocorrem separadamente, cada vez mais estudos indicam haver sobreposição entre elas, com algumas proteínas chave fazendo a conexão.

Os tripanossomatídeos durante o seu ciclo de vida deparam com eventos que podem levar ao aparecimento de lesões no DNA (Bogdan and Rollinghoff, 1999). Assim, verificamos que os processos de reparo de DNA são cruciais para o crescimento do *T. cruzi* e do *T. brucei*. Dessa forma, o maior entendimento das vias de reparo de danos no DNA pode levar a uma melhor compreensão da biologia dos tripanossomatídeos, bem como à elaboração de novas estratégias para o tratamento das doenças causadas por esses parasitos.

# **6. CONCLUSÕES**

- A localização citoplasmática de SMYB1 nos diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* corrobora achados anteriores de que esta proteína estaria envolvida no metabolismo de RNA e no controle pós-transcricional da expressão gênica, sendo uma proteína importante na biologia do parasito.
- A complementação funcional da deficiência de MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei* (forma sanguínea) por SMYB1 sugere que esta proteína possa atuar no mecanismo de reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo. No entanto, a expressão de SMYB1 em células selvagens de *T. brucei* da forma sanguínea promove um fenótipo de dominância negativa, com interferência no crescimento das células deste parasito, já em *T. cruzi*, a superexpressão de SMYB1 não levou a qualquer efeito danoso no crescimento deste.
- A proteína RBP16 atua na resposta a lesões oxidativas no DNA causado por peróxido de hidrogênio, mas não atua no reparo de adutos de DNA causado pela cisplatina, ou alquilação no DNA promovida pelo MMS.

# **7. PERSPECTIVAS**

- Verificar a localização da proteína SMYB1 nos parasitos *T. brucei* WT-SMYB1 e MSH2-SMYB1 submetidos e não submetidos ao tratamento com peróxido de hidrogênio.
- Avaliar a interação de SMYB1 com parceiros de MSH2 e com RBP16 pelo sistema de duplo híbrido e *pull down*, ou por co-imunoprecipitação.
- Verificar o número de lesões no DNA mitocondrial provocados por peróxido de hidrogênio em células normais e silenciadas para RBP16.
- Verificar a complementação funcional do nocaute de RBP16 por SMYB1 em *T. brucei*.
- Medir o nível de 8-oxoG produzida em células RBP16 silenciadas para verificar a intensidade do reparo que acontece nessas células frente o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Analisar o crescimento dos parasitos silenciados para RBP16 após exposição à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao CdCl<sub>2</sub>, de forma a comprovar o envolvimento desta proteína na via do MMR.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fleischmann, R. D., Fuldner, R. A., Bult, C. J., Lee, N. H., *et al.* 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, **377**, 3-174.
- Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J. J. & Lahue, R. S. 1997. Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. *Mol Cell Biol*, **17**, 2436-47.
- Alsford, S. & Horn, D. 2008. Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **161**, 76-9.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-10.
- Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno-Mateos, D., Alvarez-Barrientos, A. & Jimenez-Ruiz, A. 2007. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 192-202.
- Amaral, R. S., Tauil, P. L., Lima, D. D. & Engels, D. 2006. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **101 Suppl 1**, 79-85.
- Ammerman, M. L., Fisk, J. C. & Read, L. K. 2008. gRNA/pre-mRNA annealing and RNA chaperone activities of RBP16. *RNA*, **14**, 1069-80.
- Augusto-Pinto, L., Bartholomeu, D. C., Teixeira, S. M., Pena, S. D. & Machado, C. R. 2001. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, **272**, 323-33.
- Augusto-Pinto, L., Teixeira, S. M., Pena, S. D. & Machado, C. R. 2003. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, **164**, 117-26.
- Aust, A. E. & Eveleigh, J. F. 1999. Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**, 246-52.
- Avila, A. R. & Goldenberg, S. 2010. Functional Genomics and Insights into *Trypanosoma cruzi* Gene Expression Regulation. *The Open Parasitology Journal*, **4**, 148-155.
- Bader, A. G., Felts, K. A., Jiang, N., Chang, H. W. & Vogt, P. K. 2003. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12384-9.
- Bahia, D., Avelar, L., Mortara, R. A., Khayath, N., Yan, Y., Noel, C., *et al.* 2006. SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 1138-48.
- Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., *et al.* 1997. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med*, **3**, 447-50.
- Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R. & Tidwell, R. R. 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol*, **152**, 1155-71.
- Barry, J. D., Marcello, L., Morrison, L. J., Read, A. F., Lythgoe, K., Jones, N., *et al.* 2005. What the genome sequence is revealing about trypanosome antigenic variation. *Biochem Soc Trans*, **33**, 986-9.

- Barry, J. D. & McCulloch, R. 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Adv Parasitol*, **49**, 1-70.
- Beardsley, D. I., Kim, W. J. & Brown, K. D. 2005. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine activates cell-cycle arrest through distinct mechanisms activated in a dose-dependent manner. *Mol Pharmacol*, **68**, 1049-60.
- Bell, J. S., Harvey, T. I., Sims, A. M. & McCulloch, R. 2004. Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **51**, 159-73.
- Bell, J. S. & McCulloch, R. 2003. Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **278**, 45182-8.
- Benoist, C. & Mathis, D. 1990. Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol*, **8**, 681-715.
- Beranek, D. T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*, **231**, 11-30.
- Berra, M. C., Menck, C. F. M. & Di Mascio, P. 2006. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, **29**.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renaud, H., Bartholomeu, D. C., et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **309**, 416-22.
- Berriman, M., Haas, B. J., LoVerde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., et al. 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, **460**, 352-8.
- Bethony, J. M. & Loukas, A. 2008. The schistosomiasis research agenda-what now? *PLoS Negl Trop Dis*, **2**, e207.
- Beyersmann, D. & Hartwig, A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*, **82**, 493-512.
- Bhat, G. J., Souza, A. E., Feagin, J. E. & Stuart, K. 1992. Transcript-specific developmental regulation of polyadenylation in *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol Biochem Parasitol*, **52**, 231-40.
- Blum, B., Bakalara, N. & Simpson, L. 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell*, **60**, 189-98.
- Bogdan, C. & Rollinghoff, M. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today*, **15**, 22-8.
- Brasil 2010. Doença de Chagas. Situação epidemiológica - Aspectos Epidemiológicos. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde*.
- Brasil 2011. Situação epidemiológica da esquistossomose mansônica no Brasil. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde*.
- Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*, **27**, 347-82.
- Brennan, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L. & Michels, P. A. 2011. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol*, **177**, 83-99.
- Brierley, D. J. & Martin, S. A. 2013. Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxid Redox Signal*, **18**, 2420-8.
- Bringaud, F., Biteau, N., Melville, S. E., Hez, S., El-Sayed, N. M., Leech, V., et al. 2002. A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, **1**, 137-51.

- Brisse, S., Barnabe, C. & Tibayrenc, M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, **30**, 35-44.
- Buermeyer, A. B., Deschenes, S. M., Baker, S. M. & Liskay, R. M. 1999. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet*, **33**, 533-64.
- Burd, C. G. & Dreyfuss, G. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-21.
- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P. B., Choi, E. Y., Finberg, K., Roeder, G. S., *et al.* 1994. Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **8**, 1087-105.
- Buscaglia, C. A. & Di Noia, J. M. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*, **5**, 419-27.
- Cabral, F. J., Pereira, O. S., Jr., Silva, C. S., Guerra-Sa, R. & Rodrigues, V. 2008. *Schistosoma mansoni* encodes SMT3B and SMT3C molecules responsible for post-translational modification of cellular proteins. *Parasitol Int*, **57**, 172-8.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. & Ravanat, J. L. 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **131**, 1-87.
- Campos, P. C. 2009. Diferenças intra-específicas no sistema de reparo de erros de pareamento e na resposta ao estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*: o papel da proteína TcMSH2.) *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Campos, P. C., Silva, V. G., Furtado, C., Machado-Silva, A., Darocha, W. D., Peloso, E. F., *et al.* 2010. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol*, **176**, 8-16.
- Cancado, J. R. 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **94 Suppl 1**, 331-5.
- Carvalho, R. B., Sobral, H. A. C., Lopes, J. M., Todinov, L. R. & Formiga, G. J. S. 2008. Granuloma Esquistossomótico Gigante do Cólon com Intussuscepção: Relato de Caso. *Rev Bras Coloproctol*, **28**, 347-349.
- Cejka, P. & Jiricny, J. 2008. Interplay of DNA repair pathways controls methylation damage toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **179**, 1835-44.
- Chalmers, I. W., McArdle, A. J., Coulson, R. M., Wagner, M. A., Schmid, R., Hirai, H., *et al.* 2008. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics*, **9**, 89.
- Chatterjee, M., Rancso, C., Stuhmer, T., Eckstein, N., Andrulis, M., Gerecke, C., *et al.* 2008. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood*, **111**, 3714-22.
- Cheng, G., Cohen, L., Ndegwa, D. & Davis, R. E. 2006. The flatworm spliced leader 3'-terminal AUG as a translation initiator methionine. *J Biol Chem*, **281**, 733-43.
- Cohen, S. B., Ma, W., Valova, V. A., Algie, M., Harfoot, R., Woolley, A. G., *et al.* 2010. Genotoxic stress-induced nuclear localization of oncoprotein YB-1 in the absence of proteolytic processing. *Oncogene*, **29**, 403-10.
- Coles, L. S., Diamond, P., Lambrusco, L., Hunter, J., Burrows, J., Vadas, M. A., *et al.* 2002. A novel mechanism of repression of the vascular endothelial growth factor promoter, by single strand DNA binding cold shock domain (Y-box) proteins in normoxic fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4845-54.

- Coles, L. S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A. G., *et al.* 2005. Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett*, **579**, 5372-8.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, **16**, 10881-90.
- Cross, G. A. 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, **71**, 393-417.
- DaRocha, W. D., Silva, R. A., Bartholomeu, D. C., Pires, S. F., Freitas, J. M., Macedo, A. M., *et al.* 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*, **92**, 113-20.
- Das, S., Chattopadhyay, R., Bhakat, K. K., Boldogh, I., Kohno, K., Prasad, R., *et al.* 2007. Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J Biol Chem*, **282**, 28474-84.
- Davydova, E. K., Evdokimova, V. M., Ovchinnikov, L. P. & Hershey, J. W. 1997. Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2911-6.
- Day, D. A. & Tuite, M. F. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*, **157**, 361-71.
- de Boer, J. G. 2002. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res*, **509**, 201-10.
- de Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V. F., Teixeira, S. M., *et al.* 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, **2**, e24.
- de Oliveira, F. M., da Silva, I. C., Rumjanek, F. D., Valadao, A. F., Franco, G. R., Mesquita, R. D., *et al.* 2004. Functional properties of *Schistosoma mansoni* single-stranded DNA-binding protein SmPUR-alpha. Description of the interaction between SmPUR-alpha and SMYB1. *Mol Biochem Parasitol*, **135**, 21-30.
- de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., *et al.* 2009. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 704-19.
- DeFedericis, H. C., Patrzyc, H. B., Rajecki, M. J., Budzinski, E. E., Iijima, H., Dawidzik, J. B., *et al.* 2006. Singlet oxygen-induced DNA damage. *Radiat Res*, **165**, 445-51.
- DeMarco, R., Mathieson, W., Manuel, S. J., Dillon, G. P., Curwen, R. S., Ashton, P. D., *et al.* 2010. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome Res*, **20**, 1112-21.
- DeMarco, R., Oliveira, K. C., Venancio, T. M. & Verjovski-Almeida, S. 2006. Gender biased differential alternative splicing patterns of the transcriptional cofactor CA150 gene in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, **150**, 123-31.
- Dianov, G. L. & Allinson, S. L. 2007. DNA base damage recognition and processing. *Genome Dyn Stab.* , **1**, 287-314.
- Didier, D. K., Schiftenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M. & Schwartz, B. D. 1988. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7322-6.

- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. & Moreno, S. N. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 251-61.
- Dong, J., Akcakanat, A., Stivers, D. N., Zhang, J., Kim, D. & Meric-Bernstam, F. 2009. RNA-binding specificity of Y-box protein 1. *RNA Biol*, **6**, 59-64.
- Dorn, A., Durand, B., Marfing, C., Le Meur, M., Benoist, C. & Mathis, D. 1987. Conserved major histocompatibility complex class II boxes--X and Y--are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6249-53.
- Drummond, M. G., Calzavara-Silva, C. E., D'Astolfo, D. S., Cardoso, F. C., Rajao, M. A., Mourao, M. M., *et al.* 2009. Molecular characterization of the *Schistosoma mansoni* zinc finger protein SmZF1 as a transcription factor. *PLoS Negl Trop Dis*, **3**, e547.
- Dyxhoorn, D. M. 2005. P-bodies and RNAi: The missing link? *J RNAi Gene Silencing*, **2**, 105-6.
- Earley, M. C. & Crouse, G. F. 1998. The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15487-91.
- El-Ansary, A. & Al-Daihan, S. 2005. Stage-specifically expressed schistosome proteins as potential chemotherapeutic targets. *Med Sci Monit*, **11**, RA94-103.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., *et al.* 2005b. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, **309**, 409-15.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., *et al.* 2005a. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, **309**, 404-9.
- Elena, S. F. & Lenski, R. E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet*, **4**, 457-69.
- Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P. & Lyabin, D. N. 2011. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 1402-33.
- Engelward, B. P., Allan, J. M., Dreslin, A. J., Kelly, J. D., Wu, M. M., Gold, B., *et al.* 1998. A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem*, **273**, 5412-8.
- Ersfeld, K. 2011. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*. *Res Microbiol*, **162**, 626-36.
- Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P. & Sorensen, P. H. 2006. Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle*, **5**, 1143-7.
- Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P., *et al.* 2001. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *Embo J*, **20**, 5491-502.
- Evdokimova, V. M., Kovrigina, E. A., Nashchekin, D. V., Davydova, E. K., Hershey, J. W. & Ovchinnikov, L. P. 1998. The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *J Biol Chem*, **273**, 3574-81.
- Evdokimova, V. M., Wei, C. L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., *et al.* 1995. The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J Biol Chem*, **270**, 3186-92.

- Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, **8**, 186-94.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, **8**, 175-85.
- Fantappie, M. R., de Oliveira, F. M., de Moraes Maciel dos Santos, R., Mansure, J. J., Furtado, D. R., de Abreu da Silva, I. C., *et al.* 2008. Control of transcription in *Schistosoma mansoni*: chromatin remodeling and other regulatory elements. *Acta Trop*, **108**, 186-93.
- Fenwick, A. 2006. Waterborne infectious diseases--could they be consigned to history? *Science*, **313**, 1077-81.
- Fenwick, A., Webster, J. P., Bosque-Oliva, E., Blair, L., Fleming, F. M., Zhang, Y., *et al.* 2009. The Schistosomiasis Control Initiative (SCI): rationale, development and implementation from 2002-2008. *Parasitology*, **136**, 1719-30.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-47.
- Fishel, R. & Wilson, T. 1997. MutS homologs in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 105-13.
- Fisk, J. C., Presnyak, V., Ammerman, M. L. & Read, L. K. 2009. Distinct and overlapping functions of MRP1/2 and RBP16 in mitochondrial RNA metabolism. *Mol Cell Biol*, **29**, 5214-25.
- Franco, G. R., Garratt, R. C., Tanaka, M., Simpson, A. J. & Pena, S. D. 1997b. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein. *Gene*, **198**, 5-16.
- Franco, G. R., Rabelo, E. M., Azevedo, V., Pena, H. B., Ortega, J. M., Santos, T. M., *et al.* 1997a. Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of *Schistosoma mansoni* for production of expressed sequence tags (ESTs). *DNA Res*, **4**, 231-40.
- Furtado, C. 2009. Reparo de DNA em dois patógenos humanos: caracterização do gene Imp4 de *Schistosoma mansoni* e estudos acerca do MMR, sistema GO e taxa de mutação em *Trypanosoma cruzi*. *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Furtado, C., Kunrath-Lima, M., Rajao, M. A., Mendes, I. C., de Moura, M. B., Campos, P. C., *et al.* 2012. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, **7**, e42484.
- Gaudreault, I., Guay, D. & Lebel, M. 2004. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res*, **32**, 316-27.
- Geiger, A., Simo, G., Grebaut, P., Peltier, J. B., Cuny, G. & Holzmuller, P. 2011. Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives. *J Proteomics*, **74**, 1625-43.
- Gill, E. E. & Fast, N. M. 2007. Stripped-down DNA repair in a highly reduced parasite. *BMC Mol Biol*, **8**, 24.
- Goldstein, J., Pollitt, N. S. & Inouye, M. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 283-7.
- Golyasnaya, N. V. & Tsvetkova, N. A. 2006. Mismatch repair. *Molecular Biology*, **40**, 211-223.
- Gomes, M. S., Cabral, F. J., Jannotti-Passos, L. K., Carvalho, O., Rodrigues, V., Baba, E. H., *et al.* 2009. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int*, **58**, 61-8.

- Goulah, C. C. & Read, L. K. 2007. Differential effects of arginine methylation on RBP16 mRNA binding, guide RNA (gRNA) binding, and gRNA-containing ribonucleoprotein complex (gRNP) formation. *J Biol Chem*, **282**, 7181-90.
- Grant, C. E. & Deeley, R. G. 1993. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol*, **13**, 4186-96.
- Hajduk, S. L., Hager, K. & Esko, J. D. 1992. High-density lipoprotein-mediated lysis of trypanosomes. *Parasitol Today*, **8**, 95-8.
- Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E., *et al.* 2006. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell*, **124**, 47-59.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, **344**, 721-4.
- Han, Z. G., Brindley, P. J., Wang, S. Y. & Chen, Z. 2009. Schistosome Genetics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*
- Hartwig, A. & Schwerdtle, T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett*, **127**, 47-54.
- Hasegawa, S. L., Doetsch, P. W., Hamilton, K. K., Martin, A. M., Okenquist, S. A., Lenz, J., *et al.* 1991. DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4915-20.
- Hastings, K. E. 2005. SL trans-splicing: easy come or easy go? *Trends Genet*, **21**, 240-7.
- Hayes, A. P., Sevi, L. A., Feldt, M. C., Rose, M. D. & Gammie, A. E. 2009. Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutSalpha DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 739-51.
- Hayman, M. L., Miller, M. M., Chandler, D. M., Goulah, C. C. & Read, L. K. 2001. The trypanosome homolog of human p32 interacts with RBP16 and stimulates its gRNA binding activity. *Nucleic Acids Res*, **29**, 5216-25.
- Hayman, M. L. & Read, L. K. 1999. Trypanosoma brucei RBP16 is a mitochondrial Y-box family protein with guide RNA binding activity. *J Biol Chem*, **274**, 12067-74.
- Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H. & Nakatsuka, I. 2003. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem*, **278**, 43470-9.
- Hirumi, H. & Hirumi, K. 1994. Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. *Parasitol Today*, **10**, 80-4.
- Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-74.
- Hoffmann, K. F., Davis, E. M., Fischer, E. R. & Wynn, T. A. 2001. The guanine protein coupled receptor rhodopsin is developmentally regulated in the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, **112**, 113-23.
- Hollingsworth, N. M., Ponte, L. & Halsey, C. 1995. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev*, **9**, 1728-39.
- Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W. & Kalbitzer, H. R. 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 1457-70.
- Hotez, P. J., Engels, D., Fenwick, A. & Savioli, L. 2010. Africa is desperate for praziquantel. *Lancet*, **376**, 496-8.

- Hyogotani, A., Ito, K., Yoshida, K., Izumi, H., Kohno, K. & Amano, J. 2012. Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer. *Clin Lung Cancer*, **13**, 375-84.
- Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., *et al.* 1999. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res*, **59**, 342-6.
- Ito, K., Tsutsumi, K., Kuzumaki, T., Gomez, P. F., Otsu, K. & Ishikawa, K. 1994. A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2036-41.
- Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., *et al.* 2001. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1200-7.
- Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, **99**, 2467-98.
- Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., *et al.* 2002. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer*, **97**, 278-82.
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. & Stevnsner, T. 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, **94**, 166-200.
- Jin, Y. H., Clark, A. B., Slebos, R. J., Al-Refai, H., Taylor, J. A., Kunkel, T. A., *et al.* 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet*, **34**, 326-9.
- Jolly, E. R., Chin, C. S., Miller, S., Bahgat, M. M., Lim, K. C., DeRisi, J., *et al.* 2007. Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biol*, **8**, R65.
- Jonsson, Z. O. & Hubscher, U. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays*, **19**, 967-75.
- Junop, M. S., Yang, W., Funchain, P., Clendenin, W. & Miller, J. H. 2003. In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 387-405.
- Keene, J. D. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*, **8**, 533-43.
- Kloks, C. P., Spronk, C. A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G. W., Grzesiek, S., *et al.* 2002. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol*, **316**, 317-26.
- Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M., Kunz, W. & Grevelding, C. G. 2002. A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene*, **294**, 87-97.
- Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M. & Kuwano, M. 2003. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, **25**, 691-8.
- Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., *et al.* 1997. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett*, **417**, 390-4.
- Kovtun, I. V. & McMurray, C. T. 2007. Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 517-29.

- Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D. & Binns, G. 1991. Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell*, **66**, 383-94.
- Krautz-Peterson, G. & Skelly, P. J. 2008. Schistosoma mansoni: the dicer gene and its expression. *Exp Parasitol*, **118**, 122-8.
- Kunkel, T. A. & Erie, D. A. 2005. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, **74**, 681-710.
- Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S. J., Uchiyumi, T., Iwamoto, Y., *et al.* 2004. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Mol Cancer Ther*, **3**, 1485-92.
- Lambrecht, F. L. 1965. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **7**, 346-52.
- Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R. & Watson, J. 2000. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*, **252**, 1-13.
- Lehmeier, T., Foulaki, K. & Luhrmann, R. 1990. Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6475-84.
- Leutner, S., Beckmann, S. & Grevelding, C. G. 2011. Characterization of the cGMP-dependent protein kinase SmcGK1 of Schistosoma mansoni. *An Acad Bras Cienc*, **83**, 637-48.
- Lindahl, T. & Wood, R. D. 1999. Quality control by DNA repair. *Science*, **286**, 1897-905.
- Lopez, M. A., Nguyen, H. T., Oberholzer, M. & Hill, K. L. 2011. Social parasites. *Curr Opin Microbiol*, **14**, 642-8.
- Lukes, J., Hashimi, H. & Zikova, A. 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*, **48**, 277-99.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S., *et al.* 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3799-811.
- Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., Skabkina, O. V. & Ovchinnikov, L. P. 2011. Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation. *RNA Biol*, **8**, 883-92.
- Machado-Silva, A. 2008. Reparo de DNA em tripanossomatédeos: análises in vitro e in vivo e envolvimento na resposta a estresse oxidativo.) *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Machado-Silva, A., Teixeira, S. M., Franco, G. R., Macedo, A. M., Pena, S. D., McCulloch, R., *et al.* 2008. Mismatch repair in Trypanosoma brucei: heterologous expression of MSH2 from Trypanosoma cruzi provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene*, **411**, 19-26.
- Machado, C. A. & Ayala, F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of Trypanosoma cruzi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7396-401.
- Machado, C. R., Augusto-Pinto, L., McCulloch, R. & Teixeira, S. M. 2006. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res*, **612**, 40-57.
- Marsischky, G. T., Filosi, N., Kane, M. F. & Kolodner, R. 1996. Redundancy of Saccharomyces cerevisiae MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev*, **10**, 407-20.

- Mata, J., Marguerat, S. & Bahler, J. 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci*, **30**, 506-14.
- Matsumoto, K., Meric, F. & Wolffe, A. P. 1996. Translational repression dependent on the interaction of the Xenopus Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem*, **271**, 22706-12.
- Matsumoto, K. & Wolffe, A. P. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol*, **8**, 318-23.
- Matthews, K. R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, **118**, 283-90.
- McCulloch, R. & Horn, D. 2009. What has DNA sequencing revealed about the VSG expression sites of African trypanosomes? *Trends Parasitol*, **25**, 359-63.
- McManus, M. T., Adler, B. K., Pollard, V. W. & Hajduk, S. L. 2000. *Trypanosoma brucei* guide RNA poly(U) tail formation is stabilized by cognate mRNA. *Mol Cell Biol*, **20**, 883-91.
- Melville, S. E., Leech, V., Gerrard, C. S., Tait, A. & Blackwell, J. M. 1998. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasitol*, **94**, 155-73.
- Michel, A., Knobloch, J. & Kunz, W. 2003. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology*, **127**, 519-24.
- Mihailovich, M., Militti, C., Gabaldon, T. & Gebauer, F. 2010. Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression. *Bioessays*, **32**, 109-18.
- Militello, K. T., Hayman, M. L. & Read, L. K. 2000. Transcriptional and post-transcriptional in organello labelling of *Trypanosoma brucei* mitochondrial RNA. *Int J Parasitol*, **30**, 643-7.
- Militello, K. T. & Read, L. K. 1999. Coordination of kRNA editing and polyadenylation in *Trypanosoma brucei* mitochondria: complete editing is not required for long poly(A) tract addition. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1377-85.
- Miller, M. M., Halbig, K., Cruz-Reyes, J. & Read, L. K. 2006. RBP16 stimulates trypanosome RNA editing in vitro at an early step in the editing reaction. *RNA*, **12**, 1292-303.
- Miller, M. M. & Read, L. K. 2003. *Trypanosoma brucei*: functions of RBP16 cold shock and RGG domains in macromolecular interactions. *Exp Parasitol*, **105**, 140-8.
- Milligan, J. N. & Jolly, E. R. 2012. Identification and characterization of a Mef2 transcriptional activator in schistosome parasites. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**, e1443.
- Minich, W. B. & Ovchinnikov, L. P. 1992. Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie*, **74**, 477-83.
- Minich, W. B., Volyanik, E. V., Korneyeva, N. L., Berezin, Y. V. & Ovchinnikov, L. P. 1990. Cytoplasmic mRNP proteins affect mRNA translation. *Mol Biol Rep*, **14**, 65-7.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., *et al.* 2000. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4156-61.
- Momen, H. 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **94 Suppl 1**, 181-4.

- Mookerjee, S. A., Lyon, H. D. & Sia, E. A. 2005. Analysis of the functional domains of the mismatch repair homologue Msh1p and its role in mitochondrial genome maintenance. *Curr Genet*, **47**, 84-99.
- Nahum, L. A., Mourao, M. M. & Oliveira, G. 2012. New frontiers in schistosoma genomics and transcriptomics. *J Parasitol Res*, **2012**, 849132.
- Ndjonka, D., Rapado, L. N., Silber, A. M., Liebau, E. & Wrenger, C. 2013. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *Int J Mol Sci*, **14**, 3395-439.
- Nekrasov, M. P., Ivshina, M. P., Chernov, K. G., Kovrigina, E. A., Evdokimova, V. M., Thomas, A. A., *et al.* 2003. The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem*, **278**, 13936-43.
- Neves, D. P. 2005. *Parasitologia Humana*, São Paulo, Livraria Atheneu.
- New, L., Liu, K. & Crouse, G. F. 1993. The yeast gene MSH3 defines a new class of eukaryotic MutS homologues. *Mol Gen Genet*, **239**, 97-108.
- Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S. D., Inouye, M., *et al.* 1994. Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5114-8.
- Ni, T. T., Marsischky, G. T. & Kolodner, R. D. 1999. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, **4**, 439-44.
- Njiokou, F., Laveissiere, C., Simo, G., Nkinin, S., Grebaut, P., Cuny, G., *et al.* 2006. Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect Genet Evol*, **6**, 147-53.
- Novo, E. & Parola, M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, **1**, 5.
- Nussbaum, K., Honek, J., Cadmus, C. M. & Efferth, T. 2010. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Curr Med Chem*, **17**, 1594-617.
- O'Brien, V. & Brown, R. 2006. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*, **27**, 682-92.
- Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., *et al.* 2003. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol*, **199**, 251-8.
- Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., *et al.* 1996. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res*, **56**, 4224-8.
- Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., *et al.* 1998. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem*, **273**, 5997-6000.
- Ojopi, E. P., Oliveira, P. S., Nunes, D. N., Paquola, A., DeMarco, R., Gregorio, S. P., *et al.* 2007. A quantitative view of the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult-worms using SAGE. *BMC Genomics*, **8**, 186.
- Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., *et al.* 2000. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, **19**, 6194-202.

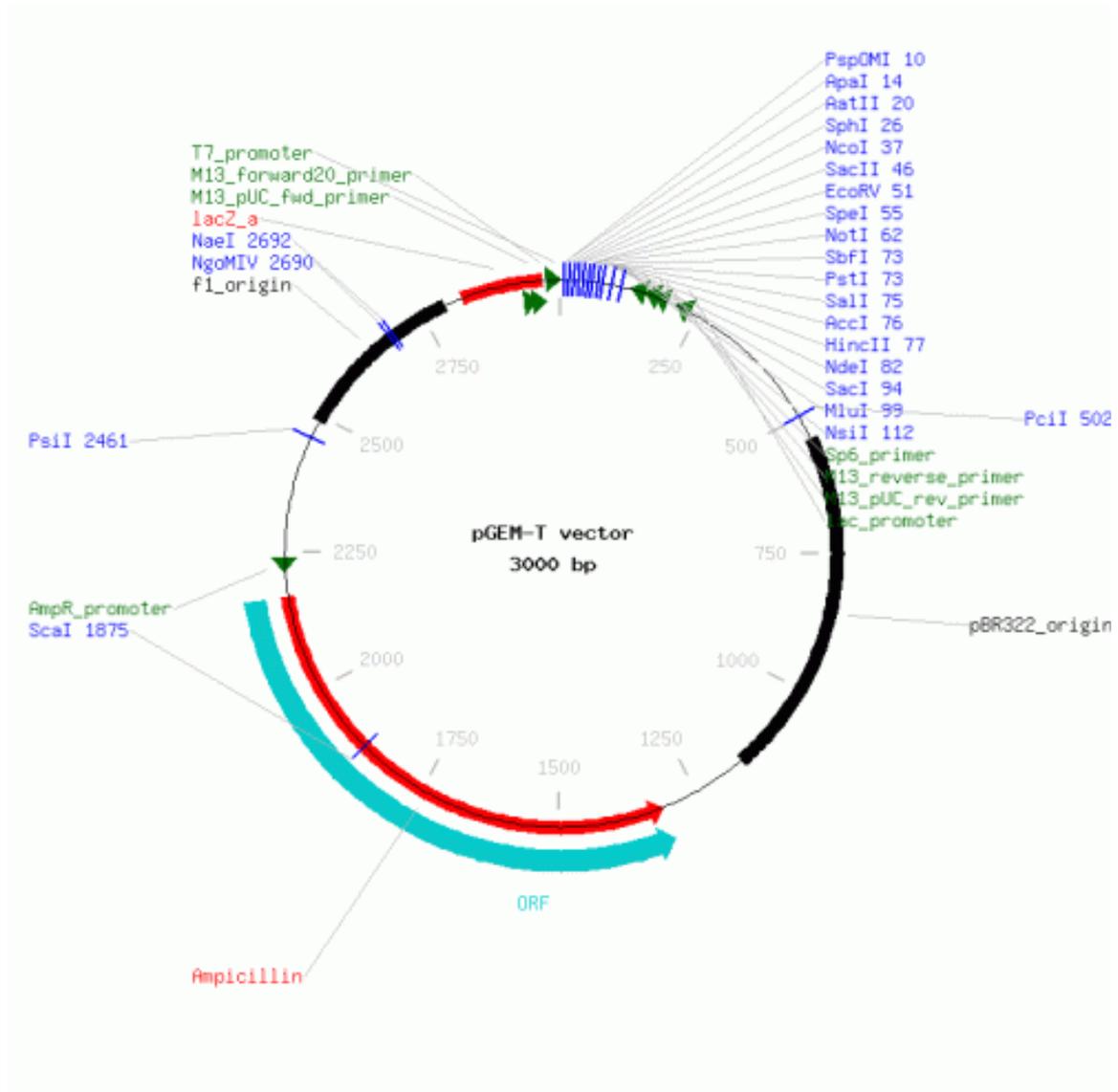
- Ozer, J., Faber, M., Chalkley, R. & Sealy, L. 1990. Isolation and characterization of a cDNA clone for the CCAAT transcription factor EFIA reveals a novel structural motif. *J Biol Chem*, **265**, 22143-52.
- Parker-Manuel, S. J., Ivens, A. C., Dillon, G. P. & Wilson, R. A. 2011. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**, e1274.
- Passos-Silva, D. G., Rajao, M. A., Nascimento de Aguiar, P. H., Vieira-da-Rocha, J. P., Machado, C. R. & Furtado, C. 2010. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids*, **2010**, 840768.
- Pelletier, M., Miller, M. M. & Read, L. K. 2000. RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBP16. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1266-75.
- Pelletier, M. & Read, L. K. 2003. RBP16 is a multifunctional gene regulatory protein involved in editing and stabilization of specific mitochondrial mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, **9**, 457-68.
- Pestryakov, P., Zharkov, D. O., Grin, I., Fomina, E. E., Kim, E. R., Hamon, L., *et al.* 2012. Effect of the multifunctional proteins RPA, YB-1, and XPC repair factor on AP site cleavage by DNA glycosylase NEIL1. *J Mol Recognit*, **25**, 224-33.
- Pica-Mattocchia, L. & Cioli, D. 2004. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol*, **34**, 527-33.
- Pogorzala, L., Mookerjee, S. & Sia, E. A. 2009. Evidence that msh1p plays multiple roles in mitochondrial base excision repair. *Genetics*, **182**, 699-709.
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, **1**, 92-100.
- Protasio, A. V., Tsai, I. J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M. A., *et al.* 2012. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**, e1455.
- Proudfoot, C. & McCulloch, R. 2005. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6906-19.
- Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H. D., Jansen, P. L., *et al.* 2003. Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *J Biol Chem*, **278**, 18241-8.
- Ramachandran, S., Temple, B. R., Chaney, S. G. & Dokholyan, N. V. 2009. Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, **37**, 2434-48.
- Reenan, R. A. & Kolodner, R. D. 1992. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics*, **132**, 963-73.
- Robello, C., Gamarro, F., Castanys, S. & Alvarez-Valin, F. 2000. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene*, **246**, 331-8.
- Rubinstein, D. B., Stortchevoi, A., Boosalis, M., Ashfaq, R. & Guillaume, T. 2002. Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer Res*, **62**, 4985-91.
- Russo, M. T., De Luca, G., Casorelli, I., Degan, P., Molatore, S., Barone, F., *et al.* 2009. Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis. *Cancer Res*, **69**, 4372-9.

- Sajid, M., McKerrow, J. H., Hansell, E., Mathieu, M. A., Lucas, K. D., Hsieh, I., *et al.* 2003. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol*, **131**, 65-75.
- Sakura, H., Maekawa, T., Imamoto, F., Yasuda, K. & Ishii, S. 1988. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene*, **73**, 499-507.
- Sales, D. M., Santos, J. E. M., Shigueoka, D. C., Leão, A. R. S., Neto, R. C. & Borges, D. R. 2009. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. *Radiol Bras*, **42**, 277-282.
- Schindelin, H., Marahiel, M. A. & Heinemann, U. 1993. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*, **364**, 164-8.
- Schitteck, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T. & Garbe, C. 2007. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer*, **120**, 2110-8.
- Schmunis, G. A. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **102 Suppl 1**, 75-85.
- Schnuchel, A., Wiltscheck, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., *et al.* 1993. Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature*, **364**, 169-71.
- Schofield, M. J. & Hsieh, P. 2003. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol*, **57**, 579-608.
- Schumacher, M. A., Karamooz, E., Zikova, A., Trantirek, L. & Lukes, J. 2006. Crystal structures of *T. brucei* MRP1/MRP2 guide-RNA binding complex reveal RNA matchmaking mechanism. *Cell*, **126**, 701-11.
- Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E. 2006a. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, **12**, 2063-72.
- Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E. 2006b. Functional replacement of *Trypanosoma brucei* Argonaute by the human slicer Argonaute2. *RNA*, **12**, 943-7.
- Simarro, P. P., Jannin, J. & Cattand, P. 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med*, **5**, e55.
- Skabkina, O. V., Lyabin, D. N., Skabkin, M. A. & Ovchinnikov, L. P. 2005. YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Mol Cell Biol*, **25**, 3317-23.
- Skehel, P. A. & Bartsch, D. 1994. Characterization of a Y-Box factor from *Aplysia californica*. *Gene*, **145**, 231-5.
- Slebos, R. J., Li, M., Evjen, A. N., Coffa, J., Shyr, Y. & Yarbrough, W. G. 2006. Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells. *Mutat Res*, **602**, 92-9.
- Slupphaug, G., Kavli, B. & Krokan, H. E. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, **531**, 231-51.
- Smith, A. B., Esko, J. D. & Hajduk, S. L. 1995. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. *Science*, **268**, 284-6.
- Smith, A. B. & Hajduk, S. L. 1995. Identification of haptoglobin as a natural inhibitor of trypanocidal activity in human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10262-6.
- Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104 Suppl 1**, 89-100.

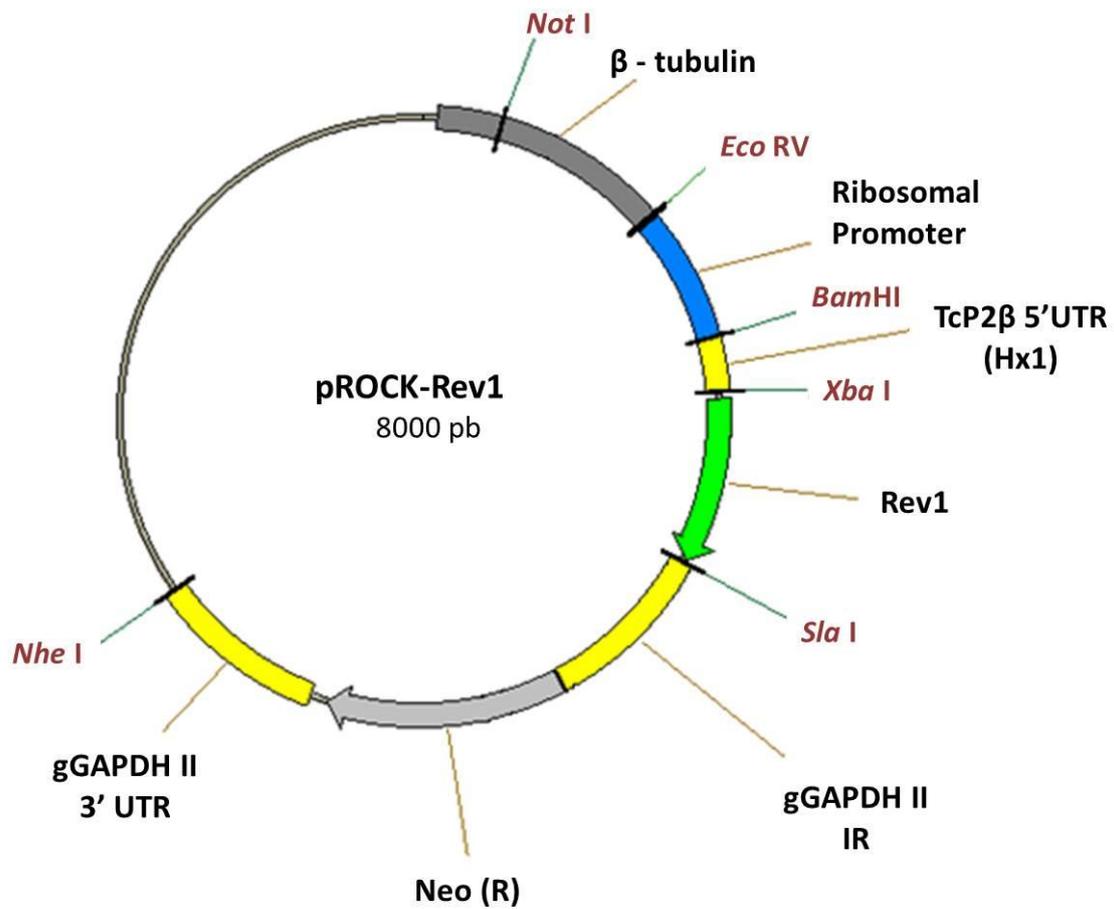
- Spitkovsky, D. D., Royer-Pokora, B., Delius, H., Kisseljov, F., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., *et al.* 1992. Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42 kD nuclear CCAAT binding protein. *Nucleic Acids Res*, **20**, 797-803.
- Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P. M. & Royer, H. D. 2001. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem*, **276**, 28562-9.
- Stockdale, C., Swiderski, M. R., Barry, J. D. & McCulloch, R. 2008. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. *PLoS Biol*, **6**, e185.
- Stohl, E. A. & Seifert, H. S. 2006. Neisseria gonorrhoeae DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, **188**, 7645-51.
- Stojic, L., Brun, R. & Jiricny, J. 2004. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1091-101.
- Stuart, K. & Panigrahi, A. K. 2002. RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol*, **45**, 591-6.
- Sturrock, R. F. 2001. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **96 Suppl**, 17-27.
- Svitkin, Y. V., Evdokimova, V. M., Brasey, A., Pestova, T. V., Fantus, D., Yanagiya, A., *et al.* 2009. General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation. *EMBO J*, **28**, 58-68.
- Swierczewski, B. E. & Davies, S. J. 2010. Developmental regulation of protein kinase A expression and activity in *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, **40**, 929-35.
- Tafuri, S. R. & Wolffe, A. P. 1992. DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *New Biol*, **4**, 349-59.
- Taylor, M. 2008. Global trends in schistosomiasis control. *Bull World Health Organ*, **86**, 738.
- Teixeira, S. M. & daRocha, W. D. 2003. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res*, **2**, 148-58.
- Tobe, E. H. 2013. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and major depressive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*, **9**, 567-73.
- Toh, S., Nakamura, T., Ohga, T., Koike, K., Uchiumi, T., Wada, M., *et al.* 1998. Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene*, **206**, 93-7.
- Turrens, J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*, **17**, 3-8.
- Valadão, A. F. 1998. Estudos funcionais da proteína SMYB1 de *Schistosoma mansoni*.) *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Valadão, A. F. 2002. Aspectos funcionais da proteína SMYB1 de *Schistosoma mansoni* pela avaliação de sua interação com proteínas e ácidos nucléicos.) *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Valadao, A. F., Fantappie, M. R., LoVerde, P. T., Pena, S. D., Rumjanek, F. D. & Franco, G. R. 2002. Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. *Mol Biochem Parasitol*, **125**, 47-57.
- van Loon, B., Markkanen, E. & Hubscher, U. 2010. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 604-16.

- Vanhamme, L. & Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*, **59**, 223-40.
- Verjovski-Almeida, S. & DeMarco, R. 2011. Gene structure and splicing in schistosomes. *J Proteomics*, **74**, 1515-8.
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimaraes, P. E., Ojopi, E. P., Paquola, A. C., *et al.* 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet*, **35**, 148-57.
- Verjovski-Almeida, S., Leite, L. C., Dias-Neto, E., Menck, C. F. & Wilson, R. A. 2004. Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends Parasitol*, **20**, 304-8.
- Vlasova, I. A. & Bohjanen, P. R. 2008. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol*, **5**, 201-7.
- Wang, W., Wang, L. & Liang, Y. S. 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res*, **111**, 1871-7.
- WHO 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- WHO 2011. Neglected tropical diseases.) [http://www.who.int/neglected\\_diseases/faq/en/index2.html](http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index2.html).
- WHO 2012. International travel and health. *World Health Organization*.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. & Gull, K. 2004. The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Res*, **14**, 1014-24.
- Willimsky, G., Bang, H., Fischer, G. & Marahiel, M. A. 1992. Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol*, **174**, 6326-35.
- Wistow, G. 1990. Cold shock and DNA binding. *Nature*, **344**, 823-4.
- Wolffe, A. P. 1994. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*, **16**, 245-51.
- Wolffe, A. P., Tafuri, S., Ranjan, M. & Familari, M. 1992. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol*, **4**, 290-8.
- Wyatt, M. D. & Pittman, D. L. 2006. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, **19**, 1580-94.
- Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., *et al.* 2002. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **128**, 621-6.
- Yang, J., Medvedev, S., Yu, J., Schultz, R. M. & Hecht, N. B. 2006. Deletion of the DNA/RNA-binding protein MSY2 leads to post-meiotic arrest. *Mol Cell Endocrinol*, **250**, 20-4.
- Zhang, Y., Macarthur, C., Mubila, L. & Baker, S. K. 2010. Control of the neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Med*, **8**, 67.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., *et al.* 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**, 1051-4.

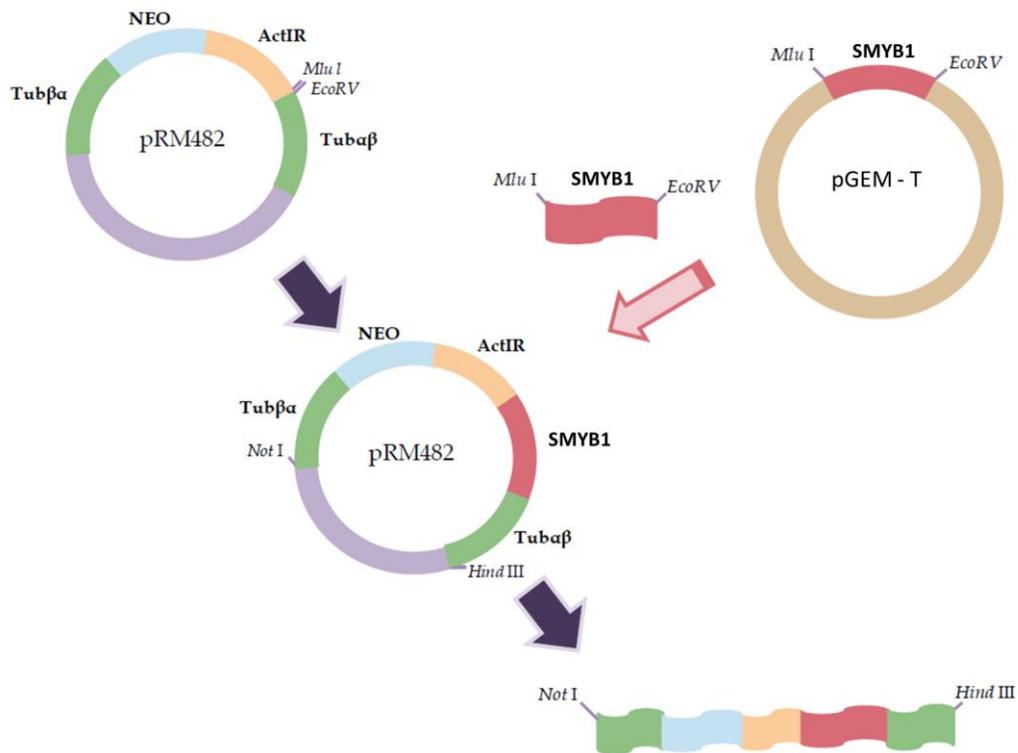
## **9. ANEXOS**



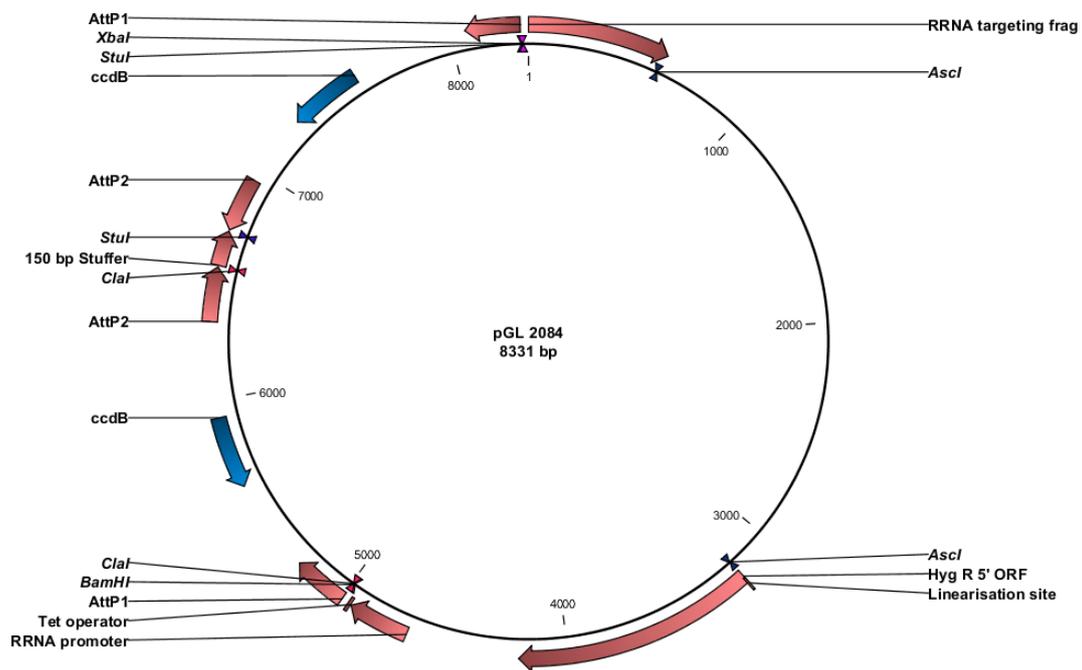
Anexo I: Mapa do vetor pGEM-T.



**Anexo II: Mapa do vetor pROCKneo.** O gene SMYB1 foi clonado no sítio de gene Rev1.



**Anexo III: Montagem do vetor para complementação de SMYB1 em *T. brucei*.** O vetor pRM482 e pGEM-T com SMYB1 foram digeridos com as enzimas *MluI* e *EcoRV* e posteriormente ligados (Adaptado de Gomes 2010).



Anexo IV: Mapa do vetor pGL2084.

**Anexo V: Artigo aceito para publicação no periódico Parasitology**

# Identification of a new *Schistosoma mansoni* SMYB1 partner: putative roles in RNA metabolism

ELIZÂNGELA A. ROCHA<sup>1</sup>†, ANALINA F. VALADÃO<sup>2</sup>†, CÍNTIA M. REZENDE<sup>1</sup>, SILVIA REGINA COSTA DIAS<sup>1</sup>, ANDRÉA M. MACEDO<sup>1</sup>, CARLOS R. MACHADO<sup>1</sup>, MARCELO R. FANTAPPIÉ<sup>3</sup>, FRANKLIN D. RUMJANEK<sup>3</sup>, ALFREDO M. GOES<sup>1</sup>, DAWIDSON A. GOMES<sup>1</sup>, PHILIP T. LOVERDE<sup>4</sup>, MARCELA G. DRUMMOND<sup>1</sup> and GLÓRIA R. FRANCO<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup> Instituto Metropolitano de Ensino Superior (IMES), Univaço, Ipatinga, MG, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup> Departments of Biochemistry and Pathology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA

(Received 21 December 2012; revised 25 February 2013; accepted 22 March 2013; first published online 14 May 2013)

## SUMMARY

SMYB1 is a *Schistosoma mansoni* protein highly similar to members of the Y-box binding protein family. Similar to other homologues, SMYB1 is able to bind double- and single-stranded DNA, as well as RNA molecules. The characterization of proteins involved in the regulation of gene expression in *S. mansoni* is of great importance for the understanding of molecular events that control morphological and physiological changes in this parasite. Here we demonstrate that SMYB1 is located in the cytoplasm of cells from different life-cycle stages of *S. mansoni*, suggesting that this protein is probably acting in mRNA metabolism in the cytoplasm and corroborating previous findings from our group that showed its ability to bind RNA. Protein–protein interactions are important events in all biological processes, since most proteins execute their functions through large supramolecular structures. Yeast two-hybrid screenings using SMYB1 as bait identified a partner in *S. mansoni* similar to the SmD3 protein of *Drosophila melanogaster* (SmRNP), which is important in the assembly of small nuclear ribonucleoprotein complexes. Also, pull-down assays were conducted using immobilized GST-SMYB1 proteins and confirmed the SMYB1–SmRNP interaction. The interaction of SMYB1 with a protein involved in mRNA processing suggests that it may act in processes such as turnover, transport and stabilization of RNA molecules.

Key words: *Schistosoma mansoni*, two-hybrid, SMYB1, RNA metabolism.

## INTRODUCTION

*Schistosoma mansoni* is one of the 3 major species from the genus *Schistosoma* that cause schistosomiasis, a worldwide disease that, according to the World Health Organization, affected at least 243 million people in 2011 (WHO, 2013). Due to its complex life cycle, the parasite can be considered as a challenging biological system to study regulation of gene expression (El-Ansary and Al-Daihan, 2005; Jolly *et al.* 2007; Fantappie *et al.* 2008). Thus, characterization of the proteins involved in the control of gene expression is of utmost importance and this is corroborated by the growing number of publications in this field (Lu *et al.* 2006; Wu *et al.* 2007, 2008; Wu and Loverde, 2008; Drummond *et al.* 2009; Bitar *et al.* 2012). Also, the functional characterization of these proteins could lead to the

identification of new potential drug targets in the parasite. Interestingly, proteins that participate in mRNA processes (such as splicing) are being studied as targets for anti-cancer drugs (Allemand *et al.* 2007, reviewed by Rymond, 2007 and van Alphen *et al.* 2009).

The Y-box binding proteins (YBPs) were originally described in humans for their ability to bind to the Y-box element present in promoters of HLA class II genes (Didier *et al.* 1988). The binding site for the human YB-1 was determined as being the DNA sequence 5'–CTGATTGGCCAA–3', that presents an inverted CCAAT box (underlined) (Mathis *et al.* 1983; Saito *et al.* 1983; Dorn *et al.* 1987). This sequence is also present at the promoter region of several other genes (Sakura *et al.* 1988; Lipson *et al.* 1989; Pearson *et al.* 1991; Goldsmith *et al.* 1993; Sommerville and Ladomery, 1996; Nie *et al.* 2009). YBPs are found in many eukaryotes, but absent in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Evdokimova *et al.* 2006). The YBPs contain a highly conserved nucleic acid-binding domain, named the cold-shock domain (CSD) which, although not involved in the cold shock

\* Corresponding author: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais–UFMG, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-010, Brazil. E-mail: gfrancoufmg@gmail.com

† Both authors contributed equally to this work.

response in eukaryotes, possesses great similarity to bacterial cold-shock proteins (Wistow, 1990). In addition to the CSD, proteins from this family have a variable C-terminal TAIL domain consisting of alternate regions of predominantly basic or acid amino acids, which are responsible for either nucleic acid-binding or protein–protein interactions (reviewed by Matsumoto and Bay, 2005).

YBPs are DNA- and RNA-binding proteins that present properties of a nucleic acid chaperone, and also interact with a great variety of other proteins (reviewed by Eliseeva *et al.* 2011). Although the YBPs were first characterized as transcription factors binding to the Y-box element, various articles associate these proteins with other functions such as translational regulation, DNA repair and pre-mRNA splicing (reviewed by Eliseeva *et al.* 2011; reviewed by Kohno *et al.* 2003). In this context, YBPs are pleiotropic proteins capable of coupling transcriptional and translational regulation. Furthermore, these proteins are often related to proliferation and transformation of eukaryotic cells (reviewed by Matsumoto and Wolffe, 1998), being also correlated with tumour size, degree of invasion, lymph node metastasis and poor prognosis in certain cancer types (reviewed by Kohno *et al.* 2003).

Prior studies from our group identified an *S. mansoni* cDNA encoding a 217 amino acid protein homologous to the human YB-1, which was named SMYB1 (Franco *et al.* 1997). Using protein comparative modelling we suggested that the N-terminus of SMYB1 folds as a closed  $\beta$ -barrel in a similar conformation to the *Escherichia coli* (CspA) and *Bacillus subtilis* (CspB) cold-shock proteins (Saito *et al.* 1983; Sakura *et al.* 1988; Lipson *et al.* 1989; Pearson *et al.* 1991; Sommerville and Ladomery, 1996). However, the C-terminal domain differs from other YBPs as there are abundant arginine and glycine residues, which probably result in a  $\beta$ -pleated conformation of this domain. We have previously shown that SMYB1 is capable of binding to single- and double-stranded DNA sequences and, in particular, to oligonucleotides containing the CCAAT motif (Valadão *et al.* 2002). Moreover, the protein binds to RNA as well, but independently of the presence of the CCAAT motif (Valadão *et al.* 2002). We also demonstrated that SMYB1 is able to interact both *in vivo* and *in vitro* with the multi-functional protein SmPUR- $\alpha$ , acting synergistically to bind preferentially to pyrimidine-rich sequences (de Oliveira *et al.* 2004).

According to Kohno *et al.* (2003), the pleiotropic functions of YBP proteins result from a diverse range of molecular interactions, and the elucidation of these interactions is crucial for a further understanding of the YBPs functions. We report herein the identification of a novel SMYB1-interacting partner, as well as the cellular localization of SMYB1 in different stages of the parasite life cycle.

## MATERIALS AND METHODS

### *Immunolocalization of the SMYB1 protein*

**Anti-SMYB1 specific antibodies.** Polyclonal rabbit serum was produced against preparations of recombinant MBP-SMYB1. Rabbits were inoculated three times, at 15-day intervals with 250  $\mu$ g of MBP-SMYB1. Recombinant protein was formulated with Freund's adjuvant (Complete Freund's adjuvant for the first immunization and Incomplete Freund's adjuvant for the subsequent injections). Fifteen days after the last inoculation, rabbits were exsanguinated and the serum containing anti-SMYB1 antibodies was collected. Pre-immune serum was obtained before the first immunization.

**Schistosoma mansoni immunohistochemistry assays.** *Schistosoma mansoni* stages of the adult worm, egg, schistosomulum, miracidium and cercaria were used in immunohistochemistry assays. Adult worms were recovered from perfused mice, separated into adult male and female worms and then fixed with dimethyl sulfoxide (DMSO)-methyl alcohol (1:5) solution. *Schistosoma mansoni* eggs present in fragmented livers of experimentally infected mice were fixed with DMSO-methyl alcohol (1:5) solution. Fixed adult male and female worms and fragments of livers were processed for Paraplast (Sigma, St Louis, MO, USA) embedding and histopathological sections were cut using a microtome at 5  $\mu$ m. Lung-stage schistosomula were prepared according to the method of Harrop and Wilson (1993). Cercariae were obtained from *Biomphalaria glabrata* by exposing the infected snails to light for 2 h to induce shedding of parasites.

Sections of Omnifix (AnCon Genetics Inc., Melville, NY, USA) fixed, Paraplast-embedded adult male or female worms and livers containing *S. mansoni* eggs were deparaffinized using xylol, hydrated with an ethanol series, washed in PBS and then incubated in a blocking solution (0.05% Tween 20, 10% (w/v) BSA (bovine serum albumin) in PBS, pH 7.2) overnight at 4 °C. Samples were reacted for 1 h with either the anti-SMYB1 or a control, pre-immune rabbit serum, both diluted 1:30 in 10 $\times$  diluted blocking solution. Sections were then washed in PBS and reacted for 1 h with a goat anti-rabbit IgG-Cy-5 conjugate (1:400 – Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) in 10 $\times$  diluted blocking solution, which also contained Alexa Fluor 488 phalloidin (1:100 – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to stain the actin microfilaments. Afterwards, samples were washed, incubated for 10 min with propidium iodide (1:3000 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 10 $\times$  diluted blocking solution to stain the nuclei and were then washed with PBS.

For experiments using Omnifix-fixed cercariae, miracidia and lung-stage schistosomula, a

whole-mount protocol was chosen. Samples were first treated with a permeabilizing solution (0.1% Triton X-100, 1% (w/v) BSA and 0.1% (w/v) sodium azide in PBS, pH 7.4) for 3 h at 4 °C under constant agitation. Subsequent immunostaining steps used the same solution and conditions. Samples were incubated overnight with the anti-SMYB1 antibody (1:60), washed five times and reacted for 4 h with the goat anti-rabbit IgG-Cy-5 conjugate, diluted 1:1000 in a solution containing Alexa Fluor 488 phalloidin (1:200). Samples were then incubated for 20 min with propidium iodide (1:5000), washed once more and prepared with a mounting solution (90% glycerol, 10% Tris-HCl 1 M, pH 8.0).

The fluorescence images were captured with a Carl Zeiss LSM 510 META confocal microscope using a 63× oil-immersion objective lens in the Center of Electron Microscopy (CEMEL-ICB/UFGM). Images were analysed with Zeiss LSM Image Browser software and edited with Adobe Photoshop CS. All research protocols involving mice used in the course of this study were reviewed and approved by the local Ethics Committee on Animal Care at Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFGM # 043/2008).

#### Yeast two-hybrid assays

**Plasmid construction.** The cDNA encoding the full-length SMYB1 protein, as well as the cDNA fragments encoding its CSD and TAIL domains, were PCR amplified using as template the clone SMPAC89, obtained from an *S. mansoni* adult worm cDNA library (Mathis *et al.* 1983). Amplifications were performed in a 100 µL final volume containing 50 ng of template DNA, 0.2 pmol/µL of each primer Y-boxFwd 5'–CTGGAATTCACAATGGCGG-ACACTAGAC–3' and Y-boxRev 5'–GACCTGCAGTCAAATGCATATTTGATTACG–3', CSDFwd 5'–CTGGAATTCATGGAAGAGCGTGTCAAAGG–3' and CSDRev 5'–GACCTGCAGTTAAGGGCCT GTCACCTTCGGA–3' or TailFwd 5'–CTGGAATTCGGCAGTGTCTACGCAGCTTT–3' and TailRev 5'–GACCTGCAGCGTTTCTCAGTATTTGATCAGAGA–3' (the Fwd and Rev primers contained *Eco* RI and *Pst* I restriction enzyme sites, respectively), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs and 5 U of Taq DNA polymerase (Phonutria, Belo Horizonte, Brazil) in the appropriate buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 and 0.1% Triton X-100). The fragments obtained after PCR amplification (SMYB1, CSD or TAIL), as well as the expression vectors pGAD424 (Clontech, Mountain View, CA, USA), pGBT9 (Clontech) and pAS2.1 (Clontech) were double digested with *Eco* RI and *Pst* I enzymes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The digested DNAs were then purified using a GeneClean Kit (BIO101, La Jolla, CA, USA) and

used to generate the following constructs: pGAD-SMYB1, pGAD-CSD and pGAD-TAIL; pGBT-SMYB1, pGBT-CSD and pGBT-TAIL; and pAS-SMYB1. Ligation products were used to transform the *E. coli* DH5a strain and the rescued plasmids were sequenced using 10 pmol of appropriate primers (ADFwd 5'–CAGG-GATGTTTAATACCACATC–3' and ADRev 5'–GCACAGTTGAAGTGAACCTTGC–3' from constructions with pGAD vector, and BDFwd 5'–TCATCGGAAGAGAGTAG–3' from constructions with pGBT vector), 4 µL of DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) and 200 ng of DNA. The sequencing products were analysed in the MegaBACE 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare Life Sciences). The pGAD-SmPUR-α construct was available (Fantappie *et al.* 2000).

**Protein–protein interaction assays.** To assess protein–protein interactions involving SMYB1 and its domains, a yeast two-hybrid assay was used, in which the transcription of the LacZ and His3 reporter genes was examined (Matchmaker-Clontech). To perform this, competent yeast strains Y190 (MATα, *trp1-901 his3Δ200, leu2-3, 112 ura3-52 ade2-101, gal4, gal80, URA3::GAL1-lacZ, LYS2::GAL1-HIS3*) were prepared using the Frozen-EZ Yeast Transformation II kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The strains were then co-transformed with 2 µg of different pair combinations of the constructs pGAD-SMYB1, pGAD-CSD or pGAD-TAIL and pGBT-SMYB1, pGBT-CSD or pGBT-TAIL in order to determine protein–protein interactions. The plasmid pair pVA3-pTD1 was used as a positive control. Co-transformants were selected onto SD/-Leu -Trp -His (synthetic dextrose growth medium lacking leucine, tryptophan and histidine) containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT, a *HIS* inhibitor-competitor used to suppress background growth). The plates were incubated at 30 °C for 6 days and checked each day for growth. On day 7, selected colonies were restreaked onto SD/-Leu-Trp-His containing 25 or 35 mM 3-AT. Histidine prototroph clones were transferred onto nitrocellulose membrane and permeabilized by freeze/thaw cycles (liquid N<sub>2</sub>/37 °C). β-galactosidase activity assay was performed by overlaying the filters on Whatman 3MM paper soaked in Z buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mM NaHPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 35 mM β-mercaptoethanol) containing 1 mg of X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). The filters were incubated at 30 °C for approximately 6 h to develop the blue colour.

**Library screening.** The pAS-SMYB1 construct was used as bait for the screening of an *S. mansoni* adult

worm cDNA library previously cloned into the pAD-GAL4-2 activation domain vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The competent yeast strain Y190 was co-transformed with 10 µg of pAS-SMYB1 and 40 µg of pAD-GAL4-2 vector. Co-transformants were selected onto SD/-Leu-Trp plates to test the transformation efficiency and onto SD/-Leu-Trp-His plates containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole to test the activation of His3 gene transcription. The plates were incubated at 30 °C for 6 days. On day 7, selected colonies were restreaked onto SD/-Leu-Trp-His plates containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Histidine prototroph clones were assayed for β-galactosidase activity by a filter assay, as detailed previously. Positive clones for the two assays were grown in liquid YPD medium (2% peptone, 1% yeast extract, 2% glucose, pH 7.0) and the binding and activation domain plasmids were isolated using the Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA). The plasmids were used to transform *E. coli* TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then were rescued and sequenced using 10 pmol of the appropriate primers (ADFwd and ADRev, described above). The sequencing products were identified by NCBI BLAST searches (Altschul *et al.* 1990). To confirm the results, the isolated plasmids were then co-transformed with the pAS-SMYB1 plasmid into strains Y190 and PJ69-4A (MATa *trp1-901 leu2-3, 112 ura 3-52 his 3-200gal 4Δgal80ΔLYS2::GAL1-HIS3GAL2-ADE2met2::GAL7-lacZ* – kindly provided by Dr Philip James, University of Wisconsin Medical School). After transformation, PJ69-4A yeast cells were spread onto SD/-Leu -Trp -His; SD/-Leu -Trp -ADE and SD/-Leu -Trp -His -ADE containing 2 mM 3-AT. To investigate which part of the SMYB1 protein was involved in the interaction, pGBT-CSD or pGBT-TAIL were co-transformed with pAD-vectors isolated by screening into the Y190 strain.

#### Pull-down assays

**Cloning, expression and purification of recombinant GST proteins.** The complete coding region of SMYB1 was PCR amplified using as template a pGAD/SMYB1 construct (described above). Amplification was performed as depicted in the section 'Plasmid construction' using the primers Y-boxFwd and Y-boxRev. The fragments obtained after PCR amplification were cloned into predigested pGEX 4T-1 (GE Healthcare Life Sciences) as described in that same section. Isolated plasmids were sequenced using the MegaBACE 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare Life Sciences), 10 pmol of each primer (pGEXFwd 5' – GTAAAACGACGGCCAGTGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG – 3' and pGEXRev 5' – CAGGAAACAGCTATGACCCGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG – 3'), 4 µL of

DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare Life Sciences) and 200 ng of DNA. *Escherichia coli* clones harbouring the empty pGEX 4T-1 plasmid (negative control) or the pGEX-SMYB1 construct was used for expression of the fusion proteins, induced by 0.6 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). The expression protocol was maintained for 4 h at 30 °C. Cells were then harvested by centrifugation at 4000 g for 20 min, resuspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µM leupeptin and 75 µM aprotinin) and sonicated. The supernatant fraction, containing the soluble proteins, was collected after centrifugation at 20000 g for 25 min at 4 °C and filtered through a 0.45 µm filter. The GST and GST-SMYB1 proteins were then purified by passage over glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10% glycerol). GST fusion proteins were eluted by addition of 10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Protein samples were analysed on 10% SDS-PAGE gels and visualized by Coomassie blue staining.

**Construction of plasmids used in transcription-translation in vitro assay.** The fragments containing either the SMYB1 complete coding region or the portions coding for the CSD and TAIL domains were removed, using the restriction enzymes *Eco* RI and *Bgl* II, from the vectors pGAD/SMYB1, pGAD/CSD and pGAD/TAIL (described above), respectively, and cloned into pCITE-4a-c(+) (Novagen, Darmstadt, Germany), forming the constructs pCITE-SMYB1, pCITE-CSD and pCITE-TAIL. The cDNA fragments isolated in yeast two-hybrid screening using pAS-SMYB1 as a bait (described above) were removed from pAD-GAL4-2 activation domain vector using the restriction enzymes *Eco* RI and *Xho* I and cloned into pCITE-4a-c(+). The constructs were used to transform *E. coli* TOP 10 strains (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 200 ng of each rescued plasmid were sequenced using the MegaBACE 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare Life Sciences) and 10 pmol of each primer (pCITEFwd 5' – CGAACGCCAGCACATGGACA – 3' or pCITERev 5' – CAGGAAACAGCTATGAC GCTAGTTATTGCTCAGGC – 3'). Plasmids showing the correct sequence were used in downstream pull-down experiments.

**In vitro binding studies by pull-down assay.** The GST, GST-SMYB1 and GST-SmPUR-α (available from Fantappie *et al.* 2000) proteins were, individually, immobilized in glutathione-Sepharose 4B resin. For each reaction, 150 µL of resin was centrifuged at 12000 g and the pellet, containing the resin, was washed 3 times with PBS buffer 0.015 M, pH 7.2.

After the last wash, the resin was incubated with approximately 10 µg of the appropriate protein for 2 h. The resin was then washed 3 times with PBS, to remove the non-binding proteins, and used in the pull-down assays. The cDNA inserts cloned into pCITE-4a-c(+) were transcribed and translated using the Single Protein System (Novagen) following the manufacturer's protocol for <sup>35</sup>S methionine incorporation.

Physical association of proteins was tested by the GST pull-down assay. For this, 10 µL of each of the <sup>35</sup>S labelled products were added to the suspension of glutathione Sepharose beads immobilized with appropriate GST-fusion proteins (GST-SMYB1 or GST-TAIL) in 200 µL final volume of binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.1% NP 40). After overnight mixing (4 °C), the protein-complexed beads were washed extensively with binding buffer in order to remove non-bound proteins and were then boiled with 50 µL of SDS loading buffer. Proteins were separated by 12% SDS-PAGE and detected by autoradiography.

## RESULTS

### *SMYB1 is mainly localized in the cytoplasm of S. mansoni cells*

It has been shown that SMYB1 is able to bind both DNA and RNA molecules (Valadão *et al.* 2002) and, like other members of this group, it can be involved in transcriptional or post-transcriptional regulation mechanisms. Aiming to better understand SMYB1 functions we verified its subcellular localization throughout *S. mansoni* life-cycle stages.

We carried out *in situ* immunohistochemistry experiments using an anti-SMYB1 antibody on *S. mansoni* samples from various life-cycle stages. The results show that SMYB1 is present in the cytoplasm of cells from eggs (Fig. 1 A1–A4), cercariae (Fig. 1 B1–B4), miracidia (Fig. 1 C1–C4), adult female (Fig. 1 D1–D4) and male (Fig. 1 E1–E4) worms, as well as in the schistosomula lung stage (Fig. 1 F1–F4). Supplementary Fig. 1S (in Online version only) shows a higher magnification image of male and female adult worms showing PI-stained nuclei surrounded by cytoplasmic labelled protein. Furthermore, it is interesting to note that the protein is accumulated in the subtegumental region in cercariae, miracidia and adult worms (see Supplementary Fig. 1S to observe this localization in male and female adult worms). While in cercariae and schistosomula the SMYB1 pattern of distribution seems to be anterior; in adult worms, miracidia and eggs the protein seems to be distributed all over the parasite body. Supplementary Fig. 2S shows the whole body of male and female worms demonstrating that there is no specific anterior or posterior

distribution of the protein in adult worm bodies. No staining was observed in the negative controls (Fig. 1 A5, B5, C5, D5, E5 and F5) in which only the rabbit pre-immune serum was used.

### *The SMYB1 TAIL domain is responsible for protein–protein interactions*

The CSD of SMYB1 is 64% identical to the cold-shock domain of other members of the Y-box binding protein family and shows 43% similarity to the *E. coli* (CspA) and 40% similarity to the *B. subtilis* (CspB) cold-shock proteins. The crystal structure of CspB reveals the formation of a homodimer stabilized by 6 hydrogen bonds linking 2 adjacent β4 strands (Saito *et al.* 1983). Sequence analyses of *S. mansoni* SMYB1 revealed some structural characteristics that permit the dimerization interface required for protein–protein interaction as occurs in the *B. subtilis* CspB (Schindelin *et al.* 1993).

To determine whether SMYB1 is capable of forming stable homo- and heterodimers, and to elucidate protein domains responsible for these interactions, we first performed *in vitro* pull-down assays using GST affinity chromatography. In order to perform the experiments, SMYB1 and its CSD or TAIL domains were translated *in vitro* and labelled with <sup>35</sup>S. These proteins were then incubated with GST (negative control), GST-SMYB1 or GST-SmpPUR-α immobilized on glutathione-Sepharose beads. After washing, proteins retained on the beads were separated by 12% SDS-PAGE and detected by autoradiography.

As shown in Fig. 2, SMYB1 was able to form a homodimer (Fig. 2, lane 1) and this interaction seemed to be via its TAIL domain (Fig. 2, lane 3). The CSD domain alone was not able to interact with the entire SMYB1 protein (Fig. 2, lane 2). As shown in Fig. 2, lane 4, it was confirmed that SMYB1 was able to interact with SmpPUR-α (a single-stranded DNA/RNA binding protein), as previously reported (de Oliveira *et al.* 2004). Again, these interactions were mediated by the TAIL domain of SMYB1 (Fig. 2, lane 6), and the CSD domain was not involved in the interaction between SMYB1 and SmpPUR-α (Fig. 2, lane 5). Negative controls, using only immobilized GST, were not able to retain any of the labelled proteins (Fig. 2, lanes 7–9).

We next tested whether the homodimer formation could be confirmed *in vivo* by yeast two-hybrid assays. Yeast cells co-transformed with pGBT-SMYB1/pGAD-SMYB1 or pGBT-SMYB1/pGAD-CSD showed neither β-galactosidase activity nor histidine prototrophism (Fig. 3, sections 2–5). Nonetheless, when yeast cells were co-transformed with pGBT-SMYB1/pGBT-TAIL, a strong β-galactosidase activity was observed (Fig. 3 sections 6 and 7), comparable to that obtained with

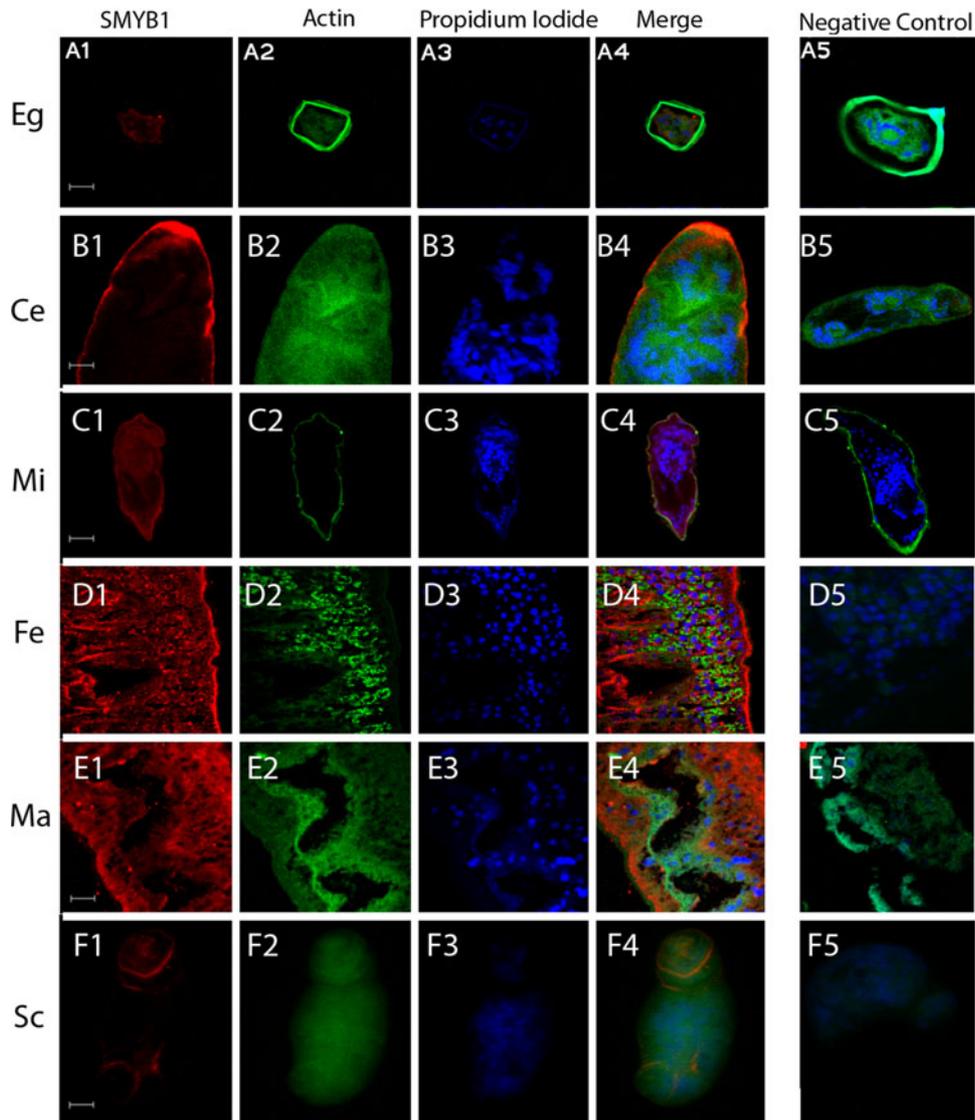


Fig. 1. Native SMYB1 displays cytoplasmic localization in various life-cycle stages of *Schistosoma mansoni*. Fixed parasites were incubated with a rabbit anti-SMYB1 antibody, and then with a Cy-5-conjugated anti-rabbit IgG in a solution containing Alexa Fluor 488 phalloidin to stain actin microfilaments. Samples were incubated with propidium iodide to visualize cell nuclei. Fluorescent images were obtained using a  $63\times$  oil-immersion objective lens and confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510 META). Images were analysed with the Zeiss LSM Image Browser software and edited with Adobe Photoshop CS. To help distinguish the individual fluorescence signals, the original fluorescence colours were digitally modified. In the figure, fluorescence from Cy-5 is shown in red, propidium iodide in blue and phalloidin-Alexa fluor 488 in green. For adult male worms a phase-contrast image is also presented. The following developmental stages were assayed: egg (A1–A4), cercaria (B1–B4), miracidium (C1–C4), adult female (D1–D4) and male (E1–E4) worms, and schistosomulum (F1–F4). Rabbit pre-immune serum was used as a control and was negative in all samples (A5, B5, C5, D5, E5 and F5). Bars = 20  $\mu$ m.

the positive control pVA3/pTD1 (Fig. 3, section 1), which encodes the interacting proteins p53 and SV40.

#### *SmRNP is a novel SMYB1-interacting partner*

In order to identify novel potential *S. mansoni* proteins capable of forming heterodimers with SMYB1, a yeast two-hybrid screening of an adult worm cDNA library was performed. The full-length SMYB1 was used as a bait protein fused to the GAL4

DNA-binding domain (pAS-SMYB1), and the library was fused downstream of the GAL4-activation domain. An initial screen for growth on selective medium yielded 42 positive colonies. Of these, however, only 19 showed  $\beta$ -galactosidase activity. These clones were rescued and the cDNAs sequenced for subsequent BLAST search at NCBI. After the BLAST analysis, only 2 out of the 19 clones were considered with potential biological relevance in terms of SMYB1 interaction. These clones had significant similarity with the *Homo sapiens* Ring box

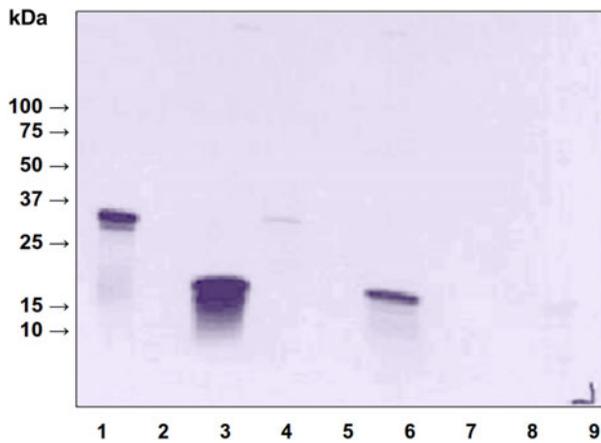


Fig. 2. The ability of SMYB1 to form homodimers and heterodimers with SmPUR- $\alpha$ . Autoradiogram showing the results of the pull-down assay performed *in vitro* to verify protein-protein interaction. GST-SMYB1, GST-SmPUR- $\alpha$  or GST were immobilized in a glutathione-Sepharose 4B resin. After washing steps, the resin was incubated with SMYB1, CSD or TAIL labelled proteins. Non-bound proteins were removed and the bound ones were separated by 12% SDS-PAGE. Detection was performed by autoradiography. 1-GST-SMYB1/SMYB1; 2-GST-SMYB1/CSD; 3-GST-SMYB1/TAIL; 4-GST-SmPUR- $\alpha$ /SMYB1; 5-GST-SmPUR- $\alpha$ /CSD; 6-GST-SmPUR- $\alpha$ /TAIL; 7-GST/SMYB1; 8-GST/CSD; 9-GST/TAIL.

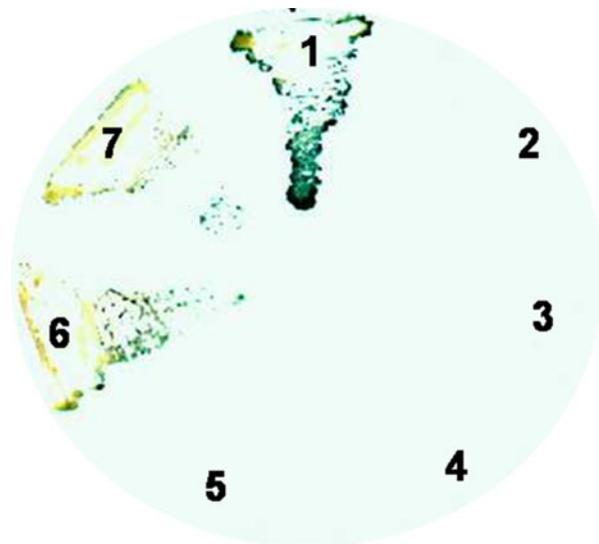


Fig. 3. The ability of SMYB1 to form homodimers *in vivo* using the yeast two-hybrid assay. X-gal filter lift assay with the yeast strain 190 transformed with the pairs of vectors: 1- pVA3 (p53)/pTD1 (SV40); 2 and 3- pGBT-SMYB1/pGAD-SMYB1; 4 and 5- pGBT-CSD/ pGAD-SMYB1; 6 and 7- pGBT-TAIL/pGAD-SMYB1. Co-transformed cells were plated on SD/-Leu -Trp -His containing 25 mM 3-AT.

protein 1 (Rbx1) and with the *Drosophila melanogaster* SmD3 ribonucleoprotein. The *S. mansoni* SMYB1-interacting proteins were named SmRingBOX (SmRbx) and SmRNP, accordingly.

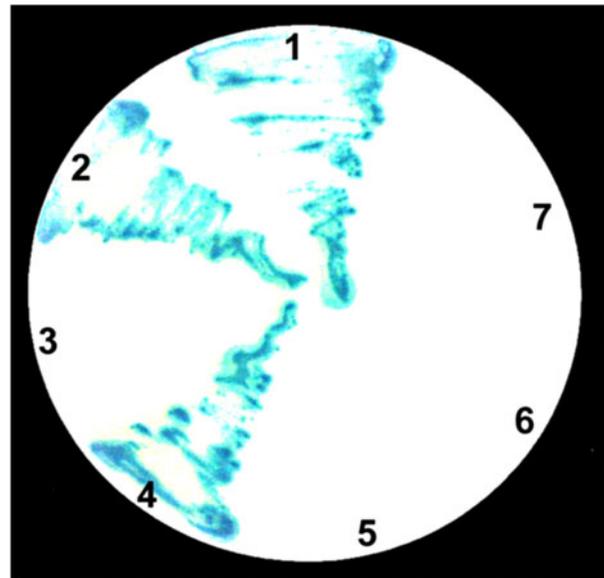


Fig. 4. Evaluation of the interaction of SMYB1 and its CSD and TAIL domains with the proteins SmRNP and SmRbx *in vivo* using the yeast two-hybrid assay. X-gal filter lift assay with the yeast strain 190 transformed with the pairs of vectors: 1-pVA3(p53)/pTD1 (SV40); 2-pAS-SMYB1/pAD-SmRNP; 3-pGBT-CSD/pAD-SmRNP; 4-pGBT-TAIL/pAD-SmRNP; 5-pAS-SMYB1/pAD-SmRbx; 6-pGBT-CSD/pAD-SmRbx; 7-pGBT-TAIL/pAD-SmRbx. Co-transformed cells were plated on SD/-Leu -Trp -His containing 25 mM 3-AT.

The other clones obtained were considered as 'false positives', which are very frequent in two-hybrid library screening. These false positive clones include proteins that interact with the bait in a partially specific manner (i.e. they will appear specific for the bait *vs* a small number of negative controls, but on subsequent analysis they will be found to interact with many partners) (Bruckner *et al.* 2009). Other false positives have been found to induce changes in the metabolic functioning of yeast, resulting in bias of the reporter assays used in the two-hybrid system (Serebriiskii *et al.* 2000).

To investigate which part of SMYB1 is involved in the interaction with SmRbx or SmRNP, the isolated plasmids coding for these proteins (pAD-SmRbx or pAD-SmRNP) were co-transformed with plasmids encoding SMYB1, CSD and TAIL (pAS-SMYB1, pGBT-CSD and pGBT-TAIL, respectively) into the yeast strain Y190. After transformation, the yeasts containing the pAS-SMYB1/pAD-SmRNP and pGBT-TAIL/pAD-SmRNP grew on selective medium and were still blue on  $\beta$ -galactosidase assay (Fig. 4, sections 2 and 4). With this result we can conclude that the TAIL is the domain of the protein responsible for these protein-protein interactions. However, when assaying for SMYB1/SmRbx interactions, none of the constructs grew on selective media (Fig. 4, sections 5-7), which led us to conclude that SmRbx

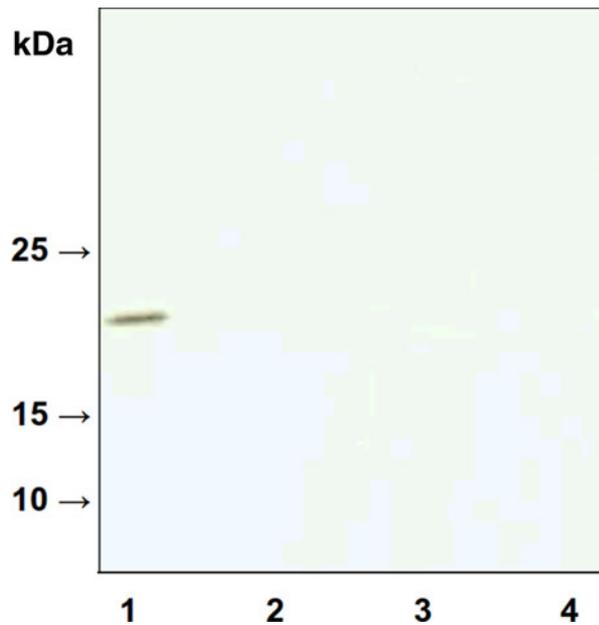


Fig. 5. The ability of SMYB1 to form a heterodimer with SmRNP. Autoradiogram showing the result of the pull-down assay performed *in vitro* to verify protein–protein interaction. GST-SMYB1 or GST was immobilized in a glutathione-Sepharose 4B resin. After washing steps, the resin was incubated with SmRNP- or SmRbx-labelled proteins. Non-bound proteins were removed and the bound ones were separated by 12% SDS-PAGE. Detection was performed by autoradiography. 1- GST-SMYB1/SmRNP; 2- GST/SmRNP; 3- GST-SMYB1/SmRbx and 4-GST/SmRbx.

is a false-positive result of the library screening. The positive control of these experiments was able to grow on selective media, as well as to show a blue colour on the  $\beta$ -galactosidase assay (Fig. 4, lane 1).

We next tested whether we could reproduce these interactions *in vitro* by GST pull-down assays. To perform this, the cDNAs coding to SmRNP and SmRbx were cloned into pCITE-4a-c(+) and transcribed and translated using the Single Protein System (Novagen). The labelled SmRNP and SmRbx were then incubated with GST-SMYB1 or GST (negative control) immobilized on glutathione-Sepharose beads. After washing, proteins retained on the beads were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and detected by autoradiography. Our pull-down data showed that SMYB1 could bind *in vitro* only to SmRNP (Fig. 5, lane 1), but not to SmRbx (Fig. 5, lane 3), confirming the results obtained with the two-hybrid assays. The GST protein alone showed no interaction with any of the assayed proteins (Fig. 5, lanes 2 and 4).

#### DISCUSSION

It has been demonstrated already that, similar to other YBP proteins, SMYB1 is able to bind single- and double-stranded DNA, as well as RNA (Valadao

*et al.* 2002). Also, it was demonstrated that SMYB1 can form a heterodimer with SmpPUR- $\alpha$ , a DNA-binding protein (Fantappie *et al.* 2000).

The cellular localization of a protein is valuable information that can help to improve the knowledge about its biological functions. Thus, as an important step in SMYB1 characterization, we conducted immunohistochemistry analyses using an anti-SMYB1 antibody on different parasite developmental stages. We were able to show that SMYB1 is localized in the cytoplasm of *S. mansoni* adult female and male worms, eggs, miracidia, cercariae and schistosomula cells. The protein is present in all stages of the parasite life cycle studied, confirming previous results obtained by our group (Franco *et al.* 1997) showing that the SMYB1 cDNA could be found in cDNA pools from different life-cycle stages. Also, a search for cDNAs annotated as Y-box binding protein at the UniGene database from NCBI retrieved sequences from the following *S. mansoni* library sources: adult, schistosomule larvae, miracidia, sporocyst, egg, cercariae and an unknown developmental stage. These data together suggest that SMYB1 might play important roles during all life-cycle stages. Also, its cytoplasmic localization, together with its ability to bind RNA (Valadao *et al.* 2002), suggests a function in RNA metabolism.

It has already been shown that mRNA localization in the cell context is important for the spatial regulation of gene expression (Matsumoto *et al.* 2012). The localization process is determined by elements in the mRNA molecules and by proteins that bind them. YB-1 proteins may exert an important role in this process (Matsumoto *et al.* 2012). As such, SMYB1 localization on *S. mansoni* cells and tissues may give a hint to its role for parasite development. The presence of the protein very near to the tegument in adult worms may suggest an action on the translational regulation of tegument proteins.

The modulation of gene expression depends on a multitude of interactions between protein–DNA, protein–protein and protein–RNA (de Oliveira *et al.* 2004). It is well known that YBPs participate in almost all events of storing, reproduction and expression of genetic information (Lyabin *et al.* 2011), such as DNA repair (Kuwano *et al.* 2004; de Souza-Pinto *et al.* 2009), replication, recombination, mRNA transcription (Skabkina *et al.* 2005), splicing (Raffetseder *et al.* 2003) and post-transcriptional events that control the half-life of transcripts (Evdokimova *et al.* 2001).

Several studies with cytoplasmic YBPs demonstrated their ability to interact with mRNA molecules. Dong *et al.* (2009) showed that the human protein YB-1 of MCF7 breast cancer cells binds preferentially to mRNA with a high GC content. Interestingly, YB-1 is able to bind to its own mRNA (Skabkina *et al.* 2005). Other YBP, MSY2 (a mouse germ cell protein), is predominantly localized in

the cytoplasm and plays an important role in the translational repression and storage of paternal and maternal mRNAs in spermatids and oocytes, respectively (Yang *et al.* 2006).

Protein–protein interactions are important events in all biological processes, since most proteins execute their functions through large supramolecular structures. Thus, several techniques have been developed and are currently available to demonstrate the formation of protein homo- or heterodimers. We used GST pull-down and yeast two-hybrid assays to test the interactions of SMYB1 with its putative protein partners and showed that SMYB1 is able to form homodimers via the TAIL domain. This result is in agreement with Izumi *et al.* (2001) who showed, by pull-down and co-immunoprecipitation assays, that the human YB-1 protein of MCF7 cells is able to form homodimers, with the TAIL domain being the mediator of the homodimerization.

Although the YBPs have a conserved N-terminal domain responsible for nucleic acid interactions, the C-terminal (the TAIL domain) of these proteins is distinct and can perform protein as well as DNA and RNA interactions (Izumi *et al.* 2001). Thus, the different functions of many YBPs may be mediated by protein–protein interactions performed by their C-terminal domain. It has been demonstrated by independent studies that YB-1 can interact with the highly conserved zinc finger transcription factor CTCF (Chernukhin *et al.* 2000), Fragile X mental retardation RNA-binding protein (Ceman *et al.* 2000), tumour suppressor p53 (Okamoto *et al.* 2000), actin (Ruzanov *et al.* 1999) and with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Shnyreva *et al.* 2000). Each one of these complexes exerts different functions in the cellular context.

Aiming to increase our knowledge on SMYB1 functions in the parasite, we focused on finding its potential partners. Heterodimer formation with SmPUR- $\alpha$ , that had already been shown by de Oliveira *et al.* (2004), was confirmed herein. We extended these studies and showed that the interaction between SMYB1 and SmPUR- $\alpha$  was mediated by the TAIL domain of SMYB1, once again highlighting the importance of this domain for protein–protein interactions. It is important to note that SMYB1–SmPUR- $\alpha$  and SMYB1–SMYB1 interactions could not be detected on the yeast two-hybrid assays, although they were confirmed by the pull-down experiments. This can be explained by the fact that the yeast two-hybrid conditions used in this work were very stringent, allowing the detection of very strong interactions only. It can also be speculated that these interactions would form *in vivo* only in a given physiological condition. PUR- $\alpha$  proteins are known to bind to several regulatory sequences present in both DNA and RNA and are involved in many events associated with gene transcription, RNA processing and transport and translation

(Murray *et al.* 1992; Zambrano *et al.* 1997; Kelm *et al.* 1999). SmPUR- $\alpha$  interacts with specific regions of the schistosome female p14 gene promoter and activates transcription of the HIS3 reporter gene. Additionally, the nucleic acid-binding domain of SmPUR- $\alpha$  possesses a high degree of similarity with the human PUR- $\alpha$  (Fantappie *et al.* 2000). Also the human counterpart of SmPUR- $\alpha$  strongly interacts with YB-1 and is able to increase its ability to bind target DNA oligonucleotides (Safak *et al.* 1999).

We searched for other SMYB1 partners by screening a *S. mansoni* cDNA library using a yeast two-hybrid assay. This attempt resulted in the identification of two proteins, SmRNP and SmRbx, possibly able to interact with SMYB1. To confirm these interactions, the plasmids coding for SmRNP and SmRbx were isolated and used in other two-hybrid experiments. Also, pull-down assays were conducted using the immobilized GST-SMYB1 protein. Both analyses confirmed the SMYB1–SmRNP, but not SMYB1–SmRbx interaction. SmRNP is an *S. mansoni* protein similar to the Smd3 protein from *D. melanogaster*, which can form small nuclear ribonucleoprotein complexes (snRNPs) (Lehmeier *et al.* 1990). These complexes are formed by small RNAs and specific proteins (Lehmeier *et al.* 1990) and can constitute, for example, the spliceosomes, where they catalyse the processing of mRNA precursors. SMYB1 interaction with a protein involved in mRNA processing is very interesting and can suggest that it is a constituent of molecular machineries that regulate, transport and stabilize RNA molecules.

Interestingly, once again the TAIL seems to be the responsible domain for the SMYB1–SmRNP interaction. Like other proteins that bind RNA, the SMYB1 TAIL domain contains 20 RG (arginine and glycine) repetitions, from which three are RGG (Franco *et al.* 1997). Such repetitions are also found in other YBPs such as DjY1, described in the *Dugesia japonica* planarian (Salveti *et al.* 1998) and ApY1, a RNA-binding protein identified in the *Aplysia californica* mollusc (Skehel and Bartsch, 1994).

The work described herein showed that SMYB1 is present in the cytoplasm of cells of almost all *S. mansoni* stages. Importantly, we showed that SMYB1 is able to form homodimers (SMYB1–SMYB1) as well as heterodimers (SMYB1–SmPUR- $\alpha$  and SMYB1–SmRNP), and that the TAIL domain mediates these interactions. In conclusion, our work provided new findings towards a better understanding of the roles of SMYB1 in *S. mansoni* cell biology, but future studies are still required to unequivocally address the roles of SMYB1 in RNA metabolism.

#### REFERENCES

- Allemand, E., Hastings, M. L., Murray, M. V., Myers, M. P. and Krainer, A. R. (2007). Alternative splicing regulation by interaction of

- phosphatase PP2Cg with nucleic acid-binding protein YB-1. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 630–637.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Bitar, M., Drummond, M. G., Costa, M. G., Lobo, F. P., Calzavara-Silva, C. E., Bisch, P. M., Machado, C. R., Macedo, A. M., Pierce, R. J. and Franco, G. R. (2012). Modeling the zing finger protein SmZF1 from *Schistosoma mansoni*: insights into DNA binding and gene regulation. *Journal of Molecular Graphical Model* **39C**, 29–38.
- Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. and Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Science* **10**, 2763–2788.
- Ceman, S., Nelson, R. and Warren, S. T. (2000). Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 904–908.
- Chernukhin, I. V., Shamsuddin, S., Robinson, A. F., Carne, A. F., Paul, A., El-Kady, A. I., Lobanekov, V. V. and Klenova, E. M. (2000). Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 29915–29921.
- de Oliveira, F. M., da Silva, I. C., Rumjanek, F. D., Valadao, A. F., Franco, G. R., Mesquita, R. D., da Silva-Neto, M. A. and Fantappie, M. R. (2004). Functional properties of *Schistosoma mansoni* single-stranded DNA-binding protein SmPUR-alpha. Description of the interaction between SmPUR-alpha and SMYB1. *Molecular and Biochemical Parasitology* **135**, 21–30.
- de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevensner, T. V., Rasmussen, L. J. and Bohr, V. A. (2009). Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst)* **8**, 704–719.
- Didier, D. K., Schiftenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M. and Schwartz, B. D. (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **85**, 7322–7326.
- Dong, J., Akcakanat, A., Stivers, D. N., Zhang, J., Kim, D. and Meric-Bernstam, F. (2009). RNA-binding specificity of Y-box protein 1. *RNA Biology* **6**, 59–64.
- Dorn, A., Durand, B., Marfing, C., Le Meur, M., Benoist, C. and Mathis, D. (1987). Conserved major histocompatibility complex class II boxes-X and Y-are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**, 6249–6253.
- Drummond, M. G., Calzavara-Silva, C. E., D'Astolfo, D. S., Cardoso, F. C., Rajao, M. A., Mourao, M. M., Gava, E., Oliveira, S. C., Macedo, A. M., Machado, C. R., Pena, S. D., Kitten, G. T. and Franco, G. R. (2009). Molecular characterization of the *Schistosoma mansoni* zinc finger protein SmZF1 as a transcription factor. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **3**, e547.
- El-Ansary, A. and Al-Daihan, S. (2005). Stage-specifically expressed schistosome proteins as potential chemotherapeutic targets. *Medical Science Monitor* **11**, RA94–103.
- Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P. and Lyabin, D. N. (2011). Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)* **76**, 1402–1433.
- Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P. and Sonenberg, N. (2001). The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO Journal* **20**, 5491–5502.
- Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P. and Sorensen, P. H. (2006). Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle* **5**, 1143–1147.
- Fantappie, M. R., Osman, A., Niles, E. G. and LoVerde, P. T. (2000). Identification and functional characterization of a member of the PUR-alpha family from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **110**, 373–390.
- Fantappie, M. R., de Oliveira, F. M., de Moraes Maciel dos Santos, R., Mansure, J. J., Furtado, D. R., de Abreu da Silva, I. C. and Rumjanek, F. D. (2008). Control of transcription in *Schistosoma mansoni*: chromatin remodeling and other regulatory elements. *Acta Tropica* **108**, 186–193.
- Franco, G. R., Garratt, R. C., Tanaka, M., Simpson, A. J. and Pena, S. D. (1997). Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein. *Gene* **198**, 5–16.
- Goldsmith, M. E., Madden, M. J., Morrow, C. S. and Cowan, K. H. (1993). A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 5856–5860.
- Harrop, R. and Wilson, R. A. (1993). Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **107**, 265–274.
- Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funo, K. and Kohno, K. (2001). Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research* **29**, 1200–1207.
- Jolly, E. R., Chin, C. S., Miller, S., Bahgat, M. M., Lim, K. C., DeRisi, J. and McKerrow, J. H. (2007). Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biology* **8**, R65.
- Kelm, R. J., Jr., Elder, P. K. and Getz, M. J. (1999). The single-stranded DNA-binding proteins, Puralpha, Purbeta, and MSY1 specifically interact with an exon 3-derived mouse vascular smooth muscle alpha-actin messenger RNA sequence. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 38268–38275.
- Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M. and Kuwano, M. (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* **25**, 691–698.
- Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S. J., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Toi, M., Fujii, T., Yamana, H., Kinoshita, H., Kamura, T., Tsuneyoshi, M., Yasumoto, K. and Kohno, K. (2004). The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1485–1492.
- Lehmeier, T., Foulaki, K. and Luhrmann, R. (1990). Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. *Nucleic Acids Research* **18**, 6475–6484.
- Lipson, K. E., Chen, S. T., Koniecki, J., Ku, D. H. and Baserga, R. (1989). S-phase-specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**, 6848–6852.
- Lu, C., Wu, W., Niles, E. G. and LoVerde, P. T. (2006). Identification and characterization of a novel fushi tarazu factor 1 (FTZ-F1) nuclear receptor in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **150**, 25–36.
- Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., Skabkina, O. V. and Ovchinnikov, L. P. (2011). Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation. *RNA Biology* **8**, 883–892.
- Mathis, D. J., Benoist, C. O., Williams, V. E., II, Kanter, M. R. and McDevitt, H. O. (1983). The murine E alpha immune response gene. *Cell* **32**, 745–754.
- Matsumoto, K. and Bay, B. H. (2005). Significance of the Y-box proteins in human cancers. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* **1**, 11–17.
- Matsumoto, K. and Wolffe, A. P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends in Cell Biology* **8**, 318–323.
- Matsumoto, S., Uchiumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T. and Kang, D. (2012). Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion* **12**, 391–398.
- Murray, M. T., Schiller, D. L. and Franke, W. W. (1992). Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 11–15.
- Nie, M., Aijaz, S., Leea Chong San, I. V., Balda, M. S. and Matter, K. (2009). The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription. *EMBO Reports* **10**, 1125–1131.
- Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K. (2000). Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* **19**, 6194–6202.
- Pearson, B. E., Nasheuer, H. P. and Wang, T. S. (1991). Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 2081–2095.
- Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H. D., Jansen, P. L. and Mertens, P. R. (2003). Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 18241–18248.
- Ruzanov, P. V., Evdokimova, V. M., Korneeva, N. L., Hershey, J. W. and Ovchinnikov, L. P. (1999). Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *Journal of Cell Science* **112**(Pt 20), 3487–3496.
- Rymond, B. (2007). Targeting the spliceosome. *Nature Chemical Biology* **3**, 533–535.

- Safak, M., Gallia, G. L. and Khalili, K.** (1999). Reciprocal interaction between two cellular proteins, Puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVY in glial cells. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2712–2723.
- Saito, H., Maki, R. A., Clayton, L. K. and Tonegawa, S.** (1983). Complete primary structures of the E beta chain and gene of the mouse major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **80**, 5520–5524.
- Sakura, H., Maekawa, T., Imamoto, F., Yasuda, K. and Ishii, S.** (1988). Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* **73**, 499–507.
- Salveti, A., Batistoni, R., Deri, P., Rossi, L. and Sommerville, J.** (1998). Expression of DjY1, a protein containing a cold shock domain and RG repeat motifs, is targeted to sites of regeneration in planarians. *Developmental Biology* **201**, 217–229.
- Schindelin, H., Marahiel, M. A. and Heinemann, U.** (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**, 164–168.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. and Golemis, E. A.** (2000). Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques* **28**, 328–330, 332–326.
- Shnyreva, M., Schullery, D. S., Suzuki, H., Higaki, Y. and Bomsztyk, K.** (2000). Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15498–15503.
- Skabkina, O. V., Lyabin, D. N., Skabkin, M. A. and Ovchinnikov, L. P.** (2005). YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 3317–3323.
- Skehel, P. A. and Bartsch, D.** (1994). Characterization of a Y-Box factor from *Aplysia californica*. *Gene* **145**, 231–235.
- Sommerville, J. and Ladomery, M.** (1996). Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma* **104**, 469–478.
- Valadão, A. F., Fantappie, M. R., LoVerde, P. T., Pena, S. D., Rumjanek, F. D. and Franco, G. R.** (2002). Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* **125**, 47–57.
- van Alphen, R. J., Wiemer, E. A. C., Burger, H. and Eskens, F.** (2009). The spliceosome as target for anticancer treatment. *British Journal of Cancer* **100**, 228–232.
- WHO** (2013). Parasitic disease: Schistosomiasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>
- Wistow, G.** (1990). Cold shock and DNA binding. *Nature* **344**, 823–824.
- Wu, W. and Loverde, P. T.** (2008). *Schistosoma mansoni*: identification of SmNR4A, a member of nuclear receptor subfamily 4. *Experimental Parasitology* **120**, 208–213.
- Wu, W., Niles, E. G., Hirai, H. and LoVerde, P. T.** (2007). Identification and characterization of a nuclear receptor subfamily I member in the Platyhelminth *Schistosoma mansoni* (SmNR1). *FEBS Journal* **274**, 390–405.
- Wu, W., Tak, E. Y. and LoVerde, P. T.** (2008). *Schistosoma mansoni*: SmE78, a nuclear receptor orthologue of *Drosophila* ecdysone-induced protein 78. *Experimental Parasitology* **119**, 313–318. doi: S0014-4894(08)00064-7 [pii]10.1016/j.exppara.2008.03.001.
- Yang, J., Medvedev, S., Yu, J., Schultz, R. M. and Hecht, N. B.** (2006). Deletion of the DNA/RNA-binding protein MSY2 leads to post-meiotic arrest. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**, 20–24.
- Zambrano, N., De Renzis, S., Minopoli, G., Faraonio, R., Donini, V., Scaloni, A., Cimino, F. and Russo, T.** (1997). DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *The Biochemical Journal* **328**(Pt 1), 293–300.