

**Carolina Furtado Torres da Silva**

Estudos sobre mutação em  
*Trypanosoma cruzi*: desenvolvimento  
de uma nova abordagem  
metodológica e efeitos do cádmio.

Dissertação apresentada ao programa de pós-  
graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial para obtenção  
do grau de Mestre em Bioquímica

Orientador  
Carlos Renato Machado

Co-orientadora  
Santuzza Maria Ribeiro Teixeira

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2005

**“A resposta certa, não importa nada:  
o essencial é que as perguntas estejam certas”**

**Mário Quintana**

**Ao meu irmão Gregório,  
que abriu mão de tanta coisa  
pra ir atrás de seu sonho  
e mesmo de longe  
force por mim.**

## **Agradecimentos**

Meus mais sinceros agradecimentos

Ao Nem, meu orientador, por sempre acreditar em meu trabalho, pelos valiosos ensinamentos, pela convivência agradável, pelo exemplo de amor à pesquisa, por estar sempre disposto a ajudar.

À Santuza, que despertou meu interesse pela bioquímica e biologia molecular, pela atenção, ensinamentos, sugestões, críticas, que muito contribuíram para meu crescimento científico.

Aos professores Sérgio Pena, Glória Franco e Andréa Macedo pelas sugestões sempre bem vindas, por sempre compartilharem seus conhecimentos, pela boa convivência.

À Neuzinha, Katita e Miroca, obrigada pelo carinho e por viabilizarem a execução de todo o trabalho no laboratório.

Ao Wanderson, quem primeiro guiou meus passos na Bioquímica, pela boa vontade, ensinamentos, bons conselhos e simpatia.

Ao Luiz Augusto Pinto, de quem herdei este projeto.

Ao meu querido amigo Carlos Gustavo, meu primeiro “desorientador” no lab, que me recebeu tão bem, pela paciência, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas conversas agradáveis, por sempre tentar me deixar feliz.

Ao Charles, que faz tanta falta no laboratório, obrigada pelo carinho, por ser sempre tão divertido, pela amizade. As Juliana e Analina

Aos colegas e amigos do LGB, que tornam o dia a dia mais agradável, Alice, Débora, Michelle, Aline, Helder, Jorge, Chico Lobo, Cadu, Claudinha, Vanessa, Lu, Dani, Simone-Mamãe, Simone Santos, Michael, Matheus, João Pedro, Eduardo, Pacu, Marcela, Marina, Alessandra, Heloísa.

Aos alunos do laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas, em especial, à Junia, Rosiane, Priscila, Wanderson, Fabiano, Daniele e Camila, por me receberem tão bem, pelas inúmeras ajudas, pela convivência agradável.

À Fernanda do NAGE, pela ajuda com as seqüências, pela paciência e boa vontade.

Ao Jamil, pelas inúmeras ajudas, pela paciência, simpatia e boa vontade.

Ao Cássio, pela ajuda com o FACS, pela boa vontade comigo.

Aos meus colegas e amigos de Bases, que tornaram o mestrado mais agradável.

Às Estrelas Carol, Cris, Fê e Marina, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de alegria que me proporcionam desde o início da graduação.

Aos meus amigos Manés, em especial, ao Daniel, amigo de todas as horas, meu companheiro de almoço, pelo carinho e pela amizade acima de tudo.

À família Furtado, obrigada pelo carinho, pela alegria que me trazem, em especial à vó Guará, pelo amor e paciência comigo, pelo exemplo de pessoa batalhadora e à Clarinha, por ser tão linda e me deixar tão feliz.

À minha mãe, pelo amor, dedicação, pela força que sempre me deu, pela amizade, compreensão, paciência, por estar disposta a qualquer coisa pra me ver feliz.

Aos meus irmãos, Gregório e Ricardo, por trazerem alegria pra nossa casa, pela amizade, respeito, paciência e amor. Ao Ricardo, por sempre me deixar a par dos Sucessos da Música Brega, por me ceder o computador nesses últimos meses.

Ao meu querido Bugu, meu namorado e amigo, pelo amor, carinho e respeito que tem por mim, por me fazer rir (muito), pela força que me dá, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando o programa é de índio, por ter surgido (e ficado) em minha vida, trazendo tanta alegria.

No mais, agradeço a todos que participaram de alguma forma deste projeto e me acompanharam durante esse percurso.

# Índice geral

Lista de figuras e tabelas	iv
Lista de siglas e abreviaturas	vi
Resumo / abstract	vii
1. Introdução	1
1.1 – O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	2
1.2 – A variabilidade intra-específica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3 – Geração de variabilidade em <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 – Mutações no DNA	5
1.5 – O Sistema de Reparo de DNA	6
1.6 – O reparo de erros de pareamento (MMR)	6
1.7 – Reparo de DNA em <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.8 – O efeito do cádmio como inibidor do MMR	11
1.9 – Justificativa	14
2. Objetivos	15
3. Material e Métodos	17
4. Resultados	36
4.1 – Efeitos do cádmio em <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.2 – Tratamento de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> com cloreto de cádmio	37
4.3 – Desenvolvendo uma metodologia para analisar a taxa de mutação em <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
4.4 – Transfecção de parasitas das cepas CL Brener e Colombiana com o vetores de <i>gfp</i>	44
4.5 – Análise da taxa de mutação	46

---

4.6 – Tratamento das culturas transfectadas com CdCl <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48
4.7 – Inibição da atividade ATPásica de TcMSH2 por cádmio	50
4.8 – Efeitos do cádmio e água oxigenada sobre seqüências no genoma de <i>T. cruzi</i>	51
4.8.1 – Busca por instabilidade de microssatélites	53
4.8.2 – Análise do gene <i>RBP48</i> da cepa Colombiana	62
5. Discussão	66
6. Conclusões	78
7. Perspectivas	80
8. Referências bibliográficas	82

---

## Lista de figuras e tabelas

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da via do MMR em procariotos	8
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática do MMR eucariótico	9
<b>Figura 3</b> – Efeito do cádmio sobre a sobrevivência de <i>T. cruzi</i> em cisplatina e peróxido de hidrogênio	13
<b>Figura 4</b> – Esquema representativo do vetor de expressão em <i>T. cruzi</i> pROCKGFP	22
<b>Figura 5</b> – Esquema representativo do vetor linearizado pUC18GFPHE	23
<b>Figura 6</b> – Investigação sobre a seleção de uma população da cepa JG resistente a cádmio	38
<b>Figura 7</b> – Crescimento de JG e Colombiana na presença de cloreto de cádmio	40
<b>Figura 8</b> – Esquema representativo da técnica de “Mega Primer” para obtenção da mutação em ponto no gene <i>gfp</i>	42
<b>Figura 9</b> – Inserção de um códon de terminação precoce no gene de <i>gfp</i>	43
<b>Figura 10</b> – Verificação da presença de <i>gfp</i> no DNA de culturas de CL Brener e Colombiana transfectadas	45
<b>Figura 11</b> – Atividade ATPásica de TcMsh2 recombinante na presença de cádmio	52
<b>Figura 12</b> – Instabilidade de regiões de microssatélites	54
<b>Figura 13</b> – MCLE01 em CL Brener	56
<b>Figura 14</b> – MCLE01 em JG	57
<b>Figura 15</b> – MCLE01 em Colombiana	58
<b>Figura 16</b> – TAC15 e MCLF10 em JG e Colombiana	59
<b>Figura 17</b> – MCL03 em Colombiana e JG	60
<b>Figura 18</b> – TAT e AAT em Colombiana e JG	61
<b>Figura 19</b> – PCR de colônia para <i>TcRBP48</i>	63
<b>Figura 20</b> – Sequências de <i>TcRBP 48</i>	65

---

<b>Tabela I</b> – Marcadores moleculares, bioquímicos e biológicos utilizados para caracterização das subdivisões de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
<b>Tabela II</b> – Iniciadores utilizados neste trabalho, seqüências e tampões apropriados	19
<b>Tabela III</b> – Composição dos diferentes tampões utilizados nas reações de PCR	20
<b>Tabela IV</b> – Estimativa da taxa de mutação em linhagens de CL Brener transfectadas com <i>gfp</i> mutado	47
<b>Tabela V</b> – Mutação em células transfectadas tratadas com agentes genotóxicos	49
<b>Tabela VI</b> – Resposta relativa, em termos de sobrevivência, das cepas JG, Colombiana e CL Brener aos tratamentos a que foram submetidas	55

---

## Lista de siglas e abreviaturas

**ATP** – trifosfato de adenosina

**ATPase** – trifosfatase de adenosina

**BLAST** – “**B**asic **l**ocal **a**lignment **s**earch **t**ool”

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeo

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**FACS** – “**F**luorescence-**a**ctivated **c**ell **s**orting”

**FITC** – “**F**luorescein **i**sothiocyane”

**GFP** – “**G**reen **f**luorescence **p**rotein”

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**IR** – Região intergênica

**kb** – kilo bases (1000 pares de bases)

**LIT** – “**L**iver **i**nfusion **t**ryptone”

**MBP** – Proteína que se liga à maltose

**MLH** – Homólogo de MutL

**MMR** – “**M**ismatch **r**epair”, Reparo de erros de pareamento

**MSH** – Homólogo de MutS

**PBS** – “**P**hosphate **b**uffered **s**aline”

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PFGE** – “**P**ulsed **F**ield **G**el **E**lectrophoresis”

**pb** – pares de bases

**RAPD** – “**R**andom **A**mplified **P**olimorphic **D**NA”

**RFLP** – “**R**estriction **f**ragment **l**enght **p**olimorphism”

**RNA** – Ácido ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**RNA<sub>r</sub>** – RNA ribossomal

**SL** – “**S**pliced **l**eader”

**UTR** – “**U**ntranslated **r**egion”

**WHO** – “**W**orld **H**ealth **O**rganization”

## **RESUMO / ABSTRACT**

---

---

---

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário agente causador da Doença de Chagas, doença que atinge cerca de 18 milhões de pessoas (WHO, 2002). Estudos biológicos, bioquímicos e moleculares indicam a existência de uma grande variabilidade genética entre as cepas deste parasita (Macedo *et al*, 2004). A estrutura populacional desta espécie, predominantemente clonal, com eventos raros ou ausentes de reprodução sexual (Ayala, 1993) contrasta com a alta variabilidade intra-específica e nos leva a questionar sobre o surgimento de tamanha diversidade. Acredita-se que o sistema de reparo de DNA em *T. cruzi* esteja envolvido nessa geração de variabilidade, já que o papel do reparo de erros de pareamento (MMR) em reduzir a taxa de mutação nos organismos já é bem conhecido (Hsieh, 2001). Foram observadas diferenças na eficiência do MMR sob condições de estresse entre diferentes linhagens de *T. cruzi* (Augusto-Pinto *et al*, 2003) o que nos levou a questionar se esta diferença seria refletida na taxa de mutação destas linhagens. Neste trabalho, realizamos estudos sobre mutações em diferentes cepas deste parasita, através da avaliação do efeito do cádmio sobre a instabilidade genética em *T. cruzi* e a investigação sobre possíveis diferenças na taxa de mutação entre as cepas. Desenvolvemos uma metodologia através da qual será possível determinar diretamente a taxa de mutação neste parasita, através de análise em FACS da fluorescência emitida por linhagens transfectadas com o gene *gfp* contendo uma mutação inserida em sua seqüência (*gfp*<sup>-</sup>). Utilizando as linhagens transfectadas, os resultados indicam que o cádmio, na presença de água oxigenada, induz um aumento na taxa de mutação das cepas CL Brener e Colombiana. Verificamos ainda o efeito do cádmio como inibidor da atividade ATPásica da proteína recombinante TcMSH2. Por fim, foi investigada a estabilidade genômica das cepas JG, CL Brener e Colombiana expostas a cádmio e peróxido de hidrogênio por vários dias através da análise de marcadores clássicos de variabilidade em *T. cruzi*: microssatélites e seqüências que codificam proteínas antigênicas. Em contraste com os resultados obtidos com as linhagens expressando o gene de *gfp* mutado, nas condições utilizadas no tratamento – concentrações dos agentes mutagênicos e período de exposição – não foi possível observar a geração de mutações nos marcadores utilizados.

## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, a chronic illness afflicting over 18 million people in Americas (WHO, 2002). Different studies including biological, biochemical and molecular ones have demonstrated that *T. cruzi* is a very heterogeneous taxon (Macedo *et al*, 2004). However, it has been proposed that *T. cruzi* has a clonal population structure in which sexual reproduction is rare or absent (Ayala, 1993). Therefore, we asked how *T. cruzi* achieves this remarkable heterogeneity among the strains and clones. One could then expect that DNA repair would play a role since the function of mismatch repair (MMR) in decreasing the mutation rate is well understood (Hsieh, 2001). It has been proposed that different *T. cruzi* strains have different mismatch repair ability under stress conditions and consequently different mutations rates (Augusto-Pinto *et al*, 2003). In this work, we have carried out studies about mutation in three *T. cruzi* strains by evaluation of the role of cadmium in causing genomic instability in *T. cruzi* and investigation of possible differences in mutation rates among strains. Here, we described the development of a new methodology, based on strains carrying a mutant *gfp* allele which codes for an inactive GFP protein, through which it will be possible to directly determine the mutation rate in *T. cruzi* through FACS analysis of the fluorescence emitted by cells transfected with *gfp*<sup>-</sup>. Using the transfected strains, the results indicate that cadmium, in the presence of hydrogen peroxide, induces an increase in mutation rate of the CL Brener and Colombiana strains. We also verified that cadmium inhibits ATP hydrolysis by recombinant TcMSH2 protein. Finally, we investigated the genomic stability of the JG, CL Brener and Colombiana strains treated with cadmium and hydrogen peroxide for different period of time (30 to 60 days) through analysis of two markers of *Trypanosoma cruzi* variability: microsatellite instability and sequences which code to antigenic proteins. It was not possible to observe mutations on the used markers, under the treatment conditions, in contrast to the results obtained with the *gfp*<sup>-</sup> transfected strains.

# **INTRODUÇÃO**



## 1.1 O *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas é uma enfermidade crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que afeta cerca de 18 milhões de pessoas nas Américas do Sul e Central, principalmente. O *T. cruzi* é transmitido aos humanos através das fezes contaminadas de insetos triatomíneos hematófagos, transfusão sanguínea, infecção congênita, ou mais raramente, através de transplante de órgãos, acidentes de laboratório e alimentos contaminados (Lambrecht 1965, Prata, 2001).

Sob condições naturais o ciclo de vida do *T. cruzi* alterna entre um hospedeiro invertebrado, um dos mais de 130 hemípteros da família Reduviidae, e um hospedeiro vertebrado mamífero, incluindo mais de 100 espécies, de diferentes ordens. A distribuição geográfica dos hospedeiros, associada à preferência do inseto por fontes de sangue específicas define dois ciclos de transmissão de *T. cruzi*: um ciclo selvagem envolvendo animais silvestres e um ciclo (peri)doméstico em que animais domésticos e humanos atuam como reservatórios do parasita (WHO, 2002).

A doença causada pela infecção humana por *T. cruzi* apresenta um quadro clínico bastante variável. Após a infecção pelo parasita, ocorre uma curta fase aguda, caracterizada por alta parasitemia e sintomas geralmente brandos e inespecíficos, o que dificulta o reconhecimento do contágio. A infecção evolui então para uma fase crônica, com baixa parasitemia e um curso clínico imprevisível, que vai desde a ausência de sintomas até formas graves, com envolvimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (Prata 2001).

As razões dessa diversidade de sintomas ainda são desconhecidas, mas acredita-se que grande parte dessa diversidade seja determinada por variações genéticas do *T. cruzi*, que apresenta uma estrutura populacional bastante heterogênea. Aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro também podem ser a causa da variedade de sintomas observada (revisado por Macedo *et al*, 2004).

## 1.2 A VARIABILIDADE INTRA-ESPECÍFICA EM *Trypanosoma cruzi*

Isolados de *T. cruzi* apresentam uma alta heterogeneidade em parâmetros biológicos como morfologia, cinética de crescimento, tropismo tecidual, curso da infecção em

---

modelos experimentais, susceptibilidade a quimioterápicos, constituição antigênica e propriedades bioquímicas, dentre outros. Estas variações também são encontradas no genoma, como demonstrado por uma série de estudos independentes, baseados em dados bioquímicos e moleculares (revisado por Macedo *et al*, 2004) (ver tabela I). Dentre eles destacam-se as análises de polimorfismo de isoenzimas (Miles *et al*, 1977), de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (Morel *et al*, 1980), de DNA mitocondrial (Vago *et al*, 1996), mini-éxon e DNA ribossômico (Souto *et al*, 1996), microssatélites (Macedo *et al*, 2001), além de análise por RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olimorphic **D**NA) de regiões aleatoriamente amplificadas do genoma (Tibayrenc *et al*, 1993) e análise de variabilidade de genes nucleares que codificam proteínas, tais como *DHFR* (Machado e Ayala, 2001) e o gene *TcMSH2* (Augusto-Pinto *et al*, 2003).

Apesar dessa grande variabilidade genética, os estudos desses marcadores sugerem a existência de duas linhagens filogenéticas principais dentro da espécie *T. cruzi*, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Até o momento, espécies possivelmente híbridas, que não podem ser classificadas como *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II permanecem identificadas como *T. cruzi*, apenas, sem outro tipo de especificação, até que novos estudos consigam elucidar as relações filogenéticas deste grupo (Satellite Meeting, 1999).

Nos últimos anos, estudos sugerem que a variabilidade genética presente entre as cepas do grupo II é maior que a presente entre as cepas do grupo *T. cruzi* I (Brisse *et al*, 2001, Cerqueira, 2004). Vários estudos demonstram ainda a associação preferencial de *T. cruzi* I com o ciclo silvestre e *T. cruzi* II com o ciclo doméstico da doença de Chagas (revisado por Buscaglia e DiNoia, 2003). É possível que a maior diversidade genética das cepas de *T. cruzi* II esteja relacionada à sua maior adaptação ao ciclo doméstico, uma vez que a variabilidade facilitaria o escape ao sistema imunológico humano (Augusto-Pinto, 2004).

**Tabela I** – Marcadores moleculares, bioquímicos e biológicos utilizados para caracterização das subdivisões de *Trypanosoma cruzi*\*

<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II	Hybrid	Reference
Type III	Type II	Type I	Andrade (1974)
Strain-group 1	Strains-group 2		Miles et al. (1977)
Type 1	Type 2		Miles et al. (1978)
Zymodeme 1	Zymodeme A	Zymodeme B	Romunha et al. (1979)
Group 1	Zymodeme 2	Zymodeme 3	Barret et al. (1980)
Type 2 (PNA)	Group 2		Ebert (1982)
Braz Z1	Type 1 (WGA)		Schottelius (1982)
Group A	Braz Z2	Bol Z2	Tibayrenc & Miles (1983)
Chilean Z1	Group B		Zillman & Ebert (1983)
Isoenzyme strain (IS) 1	Chilean Z2a	Chilean Z2b	Miles et al. (1984)
Zymodeme 17	IS 2e	IS 2	Tibayrenc et al. (1984)
DNA group 1	Zymodeme 30	Zymodeme 39	Tibayrenc & Ayala (1988)
Ribodeme II	DNA group 2		Muhlfördt & Berger (1990)
Group I	Ribodeme I		Clark & Pung (1994)
Lineage II	Group II	Genotype 39	Tibayrenc (1995)
Biodeme III	Lineage I	Group 1/2	Souto et al. (1996)
Group II	Biodeme II	Biodeme I	Andrade & Magalhães (1997)
1st Major Clade	Group I		Nunes et al. (1997)
Clade A	2nd Major Clade	Lower Clade	Tibayrenc (1998)
Clade A	Clade C	Clade B	Machado & Ayala (2001)
	Clade C	Clade B	Augusto-Pinto et al. (2003)

\* Fonte: Macedo *et al.*, 2004

### 1.3 GERAÇÃO DE VARIABILIDADE EM *Trypanosoma cruzi*

O fato de a variabilidade genética ser maior em cepas *T. cruzi* II em relação a *T. cruzi* I nos leva a questionar sobre a maneira como essa variabilidade é gerada. As mutações no DNA são a base das alterações surgidas no genoma. Elas podem surgir devido a erros no processo de replicação e reparo do DNA.

A função do reparo de DNA, especialmente de erros de pareamento (MMR) em reduzir a taxa de mutação já é bem conhecida (revisado por Hsieh, 2001). Sabe-se que a perda desse mecanismo pode causar alguns tipos de câncer humano (Peltomaki, 2003). No entanto, foram isolados, em uma proporção bem maior que a esperada, microorganismos patógenos apresentando MMR deficiente, o que levantou a hipótese de que uma maior taxa de mutação permitiria uma maior adaptabilidade desses organismos aos seus respectivos hospedeiros (LeClerc et al., 1996, Picard et al., 2001).

Com o objetivo de se estudar o papel do reparo de DNA e da taxa de mutação na geração de variabilidade em *T. cruzi*, vários trabalhos vem sendo desenvolvidos por nosso grupo, incluindo estudos sobre mecanismos de reparo em *Trypanosoma cruzi*, como MMR e recombinação, além de estudos sobre genes e proteínas envolvidas nos processos. Este trabalho tem como foco o estudo de mutações em *Trypanosoma cruzi*.

### 1.4 MUTAÇÕES NO DNA

O DNA, ou ácido desoxirribonucléico foi a molécula selecionada durante o processo evolutivo como portadora da informação genética da célula. A natureza complementar das duas cadeias dessa molécula explica seu modelo de replicação semiconservativo, em que cada cadeia serve como molde para a síntese da outra. Através das informações contidas no DNA (genoma), a célula é capaz de produzir as proteínas e RNAs responsáveis pelo seu metabolismo e manutenção. O DNA é uma molécula instável, metabolicamente ativa, e, portanto, susceptível a alterações químicas causadas por agentes ambientais, por produtos metabólicos celulares ou por erros ocorridos durante o processo de replicação. Estas modificações podem levar a mutações. As mutações podem ter como efeito alterações na seqüência de nucleotídeos, que podem ser neutras, toleradas ou até

---

mesmo letais. Assim, as mutações podem levar à variabilidade fenotípica ou à morte. Uma vez que a variabilidade é necessária para a ocorrência do processo de seleção natural, é ideal que as espécies apresentem uma taxa de mutação suficiente para gerar variabilidade, mas não alta o bastante para gerar a morte do indivíduo. Dessa forma, durante o processo evolutivo surgiram proteínas capazes de manter uma taxa de mutação condizente com uma relativa integridade e estabilidade no genoma de um organismo. Estas proteínas realizam um processo conhecido como reparo de DNA.

## 1.5 O SISTEMA DE REPARO DE DNA

Todas as espécies conhecidas, de bactérias a seres humanos, apresentam proteínas de reparo de DNA. Já foram descritas mais de 100 proteínas distintas envolvidas nesse processo. Os mecanismos de reparo podem ser classificados em seis vias distintas, mas não totalmente independentes: (i) reversão direta da lesão; (ii) reparo por excisão de base; (iii) reparo por excisão de nucleotídeo; (iv) reparo de erros de pareamento; (v) reparo por recombinação e (vi) reparo de quebra por ligação não-homóloga. Algumas enzimas participam exclusivamente de certas vias, agindo em substratos específicos, outras são redundantes. O conhecimento acerca dessas vias tem sido produzido em estudos com poucas espécies. A maior parte das informações são relativas ao processo em bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), camundongos e em humanos. No entanto, tendo em vista a importância do sistema de reparo, novos estudos têm surgido, envolvendo também outros organismos. Neste trabalho focalizaremos o sistema de reparo de erros de pareamento, uma vez que ele é diretamente responsável pelo controle da taxa de mutação na célula.

## 1.6 O REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO (MMR)

O reparo de erros de pareamento ou MMR (do inglês **M**ismatch **R**epair) é uma via de reparo que corrige bases mal pareadas no DNA após a replicação (revisado por Wu *et al*, 2004). A replicação é uma importante fonte de mutações, visto que a DNA polimerase incorpora um erro de pareamento a cada  $10^4 - 10^5$  nucleotídeos adicionados (Kornberg e

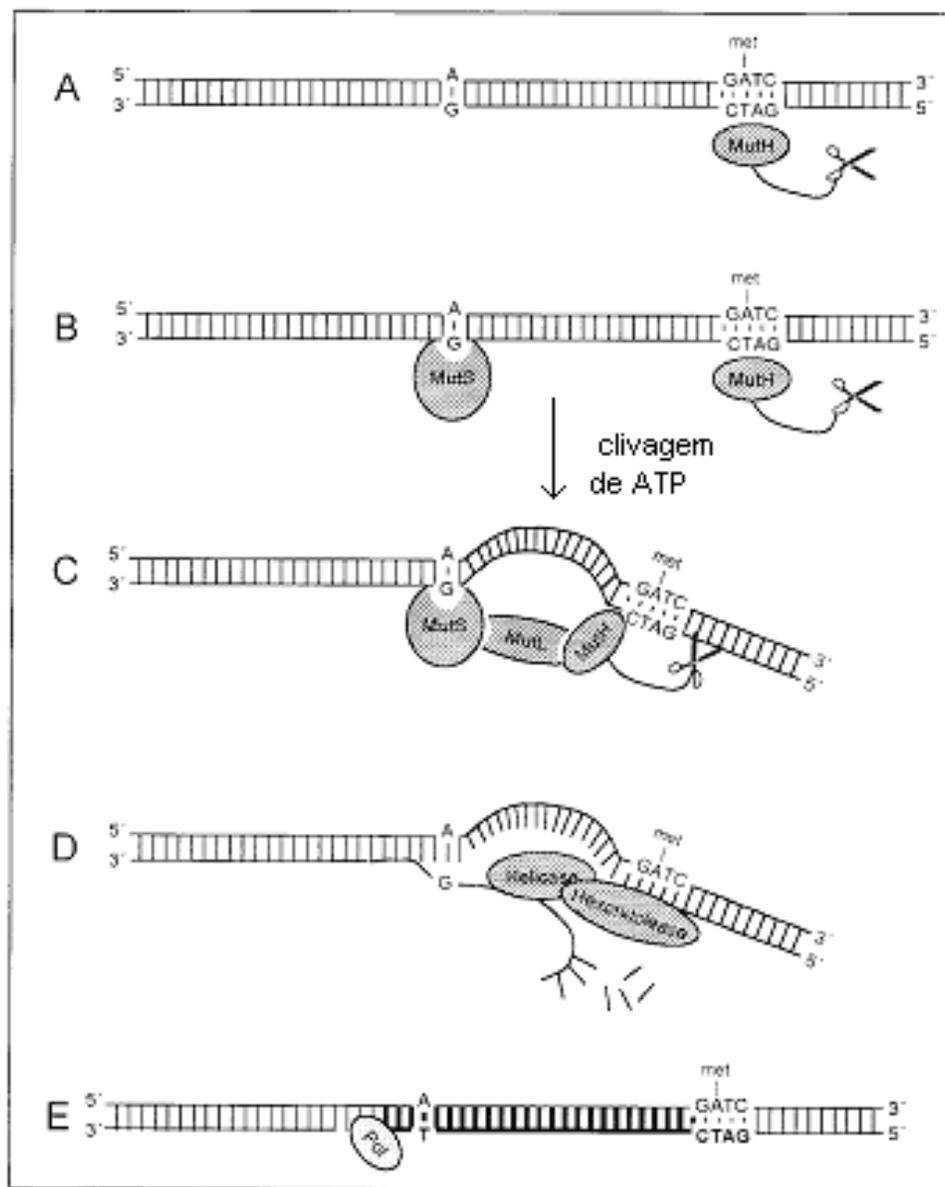
---

Barker, 1991). A atividade revisora da enzima corrige alguns, mas não todos os erros. O reparo de erros de pareamento consiste no reconhecimento da base mal pareada, excisão do segmento de DNA que contém o erro e a síntese da região removida utilizando a fita parental como molde.

Oito diferentes tipos de erros de pareamento podem ser gerados durante a replicação, além de estruturas em forma de alça resultantes de inserções ou deleções de nucleotídeos em uma das fitas de DNA. O MMR reconhece com eficiência a maioria dos erros, retirando-os do genoma recém replicado. É necessário que haja uma coordenação entre o MMR e a replicação do DNA, para que seja feito o direcionamento do reparo à fita recém sintetizada (Bowers *et al*, 2001).

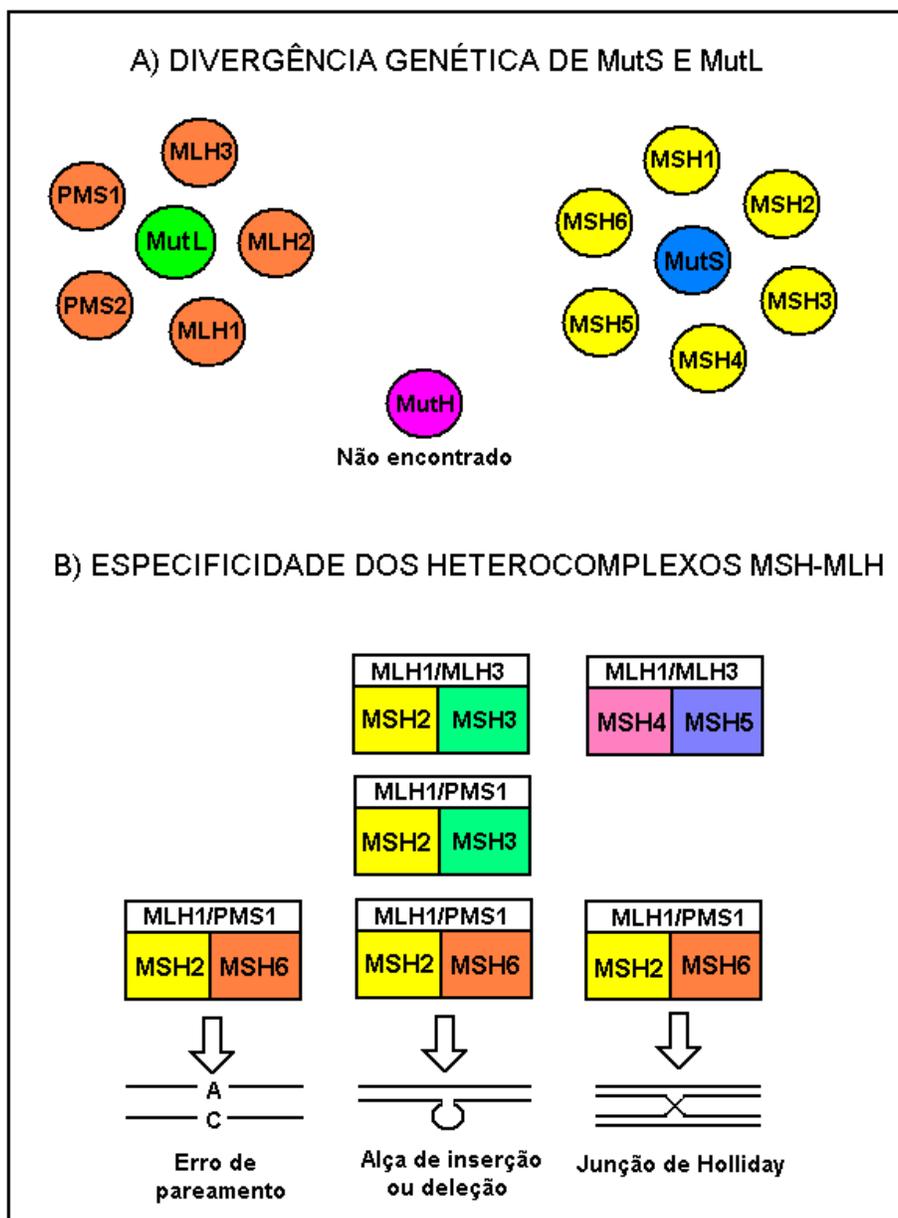
Em procariotos, as proteínas MutS, MutL e MutH, exclusivas do MMR, atuam no reconhecimento, ligação e clivagem da lesão (figura 1). O homodímero de MutS reconhece e liga-se especificamente ao erro de pareamento no DNA (ou a alças de inserção e deleção) e, com o gasto de 2 ATPs, recruta o homodímero de MutL que então recruta MutH. Como MutH permanece ligada à seqüência GATC, sua ligação com MutL forma uma alça no DNA. MutL ativa MutH, que cliva a 5' da seqüência GATC na fita não metilada. Uma helicase desenovela as fitas e uma exonuclease degrada a região que contém o erro. A região é novamente sintetizada por uma DNA polimerase e DNA ligase (Marra e Schar, 1999).

Existem vários homólogos de MutS e MutL em eucariotos (figura 2a). Tais homólogos são denominados MSH e MLH (**MutS** ou **MutL Homologue**) e enumerados cronologicamente de acordo com sua descrição. Essas proteínas formam heterocomplexos que exercem funções múltiplas (figura 2b), tais como reconhecimento e reparo de erros de pareamento, alças de inserções ou deleções e junções de Holliday. É interessante notar que MSH2 está presente na maioria dos heterocomplexos funcionais, indicando o papel central que executa no MMR eucarioto (Alani *et al*, 1997). A interação com homólogos de MutL e outras proteínas altera a especificidade de MSH2, permitindo que ele atue em substratos variados e vias diversas.



**Figura 1 – Representação esquemática da via do MMR em procariotos.** (A) Lesão no DNA e MutH ligada à seqüência GATC; (B) A proteína MutS reconhece o erro de pareamento; (C) MutS recruta MutL, que se liga a MutH formando uma alça no DNA. MutL ativa MutH, que cliva a 5' da seqüência GATC na fita não metilada; (D) Uma helicase desenovela as fitas e uma exonuclease degrada a região que contém o erro; (E) A DNA polimerase III re-sintetiza a região. O reparo é finalizado pela ação da DNA ligase.

Fonte: Machado-Silva, 2003.



**Figura 2 – Representação esquemática do MMR eucariótico.** (A) As proteínas MutL e MutS apresentam, respectivamente, cinco e seis ortólogos em eucariotos. Ainda não foi encontrado um homólogo de MutH em eucariotos. (B) heterocomplexos dos homólogos de MutS e MutL em leveduras, que reconhecem vários tipos de substratos, dentre eles, erros de pareamento, alças de fitas simples e junções de Holliday. Adaptado de Nakagawa *et al*, 1999.

## 1.7 REPARO DE DNA EM *Trypanosoma cruzi*

Pesquisas em bancos de dados de seqüências gênicas (GenBank-Entrez) e na literatura (Pubmed-NCBI) revelam que há poucos estudos sobre genes de reparo de DNA em *T. cruzi*. Um dos genes caracterizados é o *TcMSH2* (Augusto-Pinto *et al*, 2001), gene de cópia única expresso em todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*, que codifica para uma proteína de 962 aminoácidos e apresenta identidade considerável com seus homólogos eucarióticos. Entretanto, uma pesquisa no banco de dados de seqüência do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*, cuja publicação deve ocorrer nos próximos meses, mostra que o parasita possui genes homólogos a todos os componentes de varias vias de reparo.

Estudos de polimorfismos presentes em *TcMSH2* sustentam a existência de três linhagens de *T. cruzi*. Existem três isoformas da proteína TcMsh2, cada uma codificada por um dos três haplogrupos de *Trypanosoma cruzi*: isoforma A (*T. cruzi* I), isoforma B (cepas híbridas) e isoforma C (*T. cruzi* II). Um estudo posterior comparou a eficiência do reparo de erros de pareamento entre cepas codificando as diferentes isoformas de TcMsh2. Esta comparação foi feita através da análise de instabilidade de microssatélites na presença de peróxido de hidrogênio e análise de resistência à cisplatina. O fenótipo de instabilidade de microssatélites está associado a deficiência em MMR. Estas regiões repetitivas (microssatélites) podem causar “derrapagem” da DNA polimerase gerando alças no DNA que, não corrigidas pelo sistema de reparo, geram alelos com mais ou menos repetições que os alelos originais, fenótipo caracterizado como instabilidade. Foi observada instabilidade de microssatélites apenas em linhagens pertencentes aos haplogrupos B e C. Além disso, células dos haplogrupo B e C se mostraram mais resistentes ao tratamento com cisplatina (Augusto-Pinto *et al*, 2003), fenótipo característico de células eucarióticas deficientes em MMR (Fujieda *et al*, 1998). Os dados obtidos sugerem que linhagens pertencentes aos haplogrupos B e C apresentam menor eficiência no reparo de erros de pareamento sob condições de estresse quando comparadas as pertencentes ao haplogrupo A.

O MMR está envolvido em processos de geração de variabilidade em organismos assexuados como mutagênese e recombinação (Peltomaki, 2001; Alani, 1997). A interação complexa entre a manutenção da estabilidade do genoma e a geração de variabilidade parece definir a organização dos sistemas de reparo, prevenindo grandes alterações nas

---

células, mas, ao mesmo tempo permitindo geração de diversidade suficiente para a evolução dos organismos (Aravind et al, 1999). Os dados sobre as diferenças na eficiência de reparo de DNA em *T. cruzi* estão de acordo com a maior variabilidade encontrada no grupo *T. cruzi* II. A proposta do nosso trabalho é investigar se a deficiência no MMR em alguns grupos de *Trypanosoma cruzi* se reflete na taxa de mutação.

## 1.8 O EFEITO DO CÁDMIO COMO INIBIDOR DO MMR

A inativação de funções de proteínas do MMR tem efeitos biológicos conhecidos tais como instabilidade genômica, resistência a agentes que causam danos ao DNA, alterações no processo de recombinação, dentre outros (revisado por Kolodner e Marsischky, 1999; Jiricny e Marra, 2003; Schofield e Hsieh, 2003).

O cádmio é uma substância carcinógena que apresenta um longo período de meia vida, acumulando-se em seres vivos gerando inúmeros efeitos biológicos. Em 2003 foi descrito por Jin e colaboradores que a indução de mutagênese pelo cádmio em leveduras deve-se à inibição específica do sistema de reparo de erros de pareamento. Este estudo demonstrou ainda a inibição *in vitro* da atividade do MMR de extratos de células humanas. Lutzen e cols (2004) mostraram a atuação do cádmio como ativador do ciclo celular em células humanas expostas ao agente alquilante MNNG. Na presença desta substância, o sistema de reparo de mismatch causa uma parada (“arrest”) no ciclo celular.

Não se sabe exatamente a maneira como o cádmio inibe este processo. Hoje já existem evidências de que o cádmio inibe as funções de hidrólise de ATP e ligação específica ao erro de pareamento de complexos eucarióticos como MutSa e MutSβ (Clark e Kunkel, 2004). Estes efeitos seriam suficientes para explicar a inibição do MMR *in vivo*.

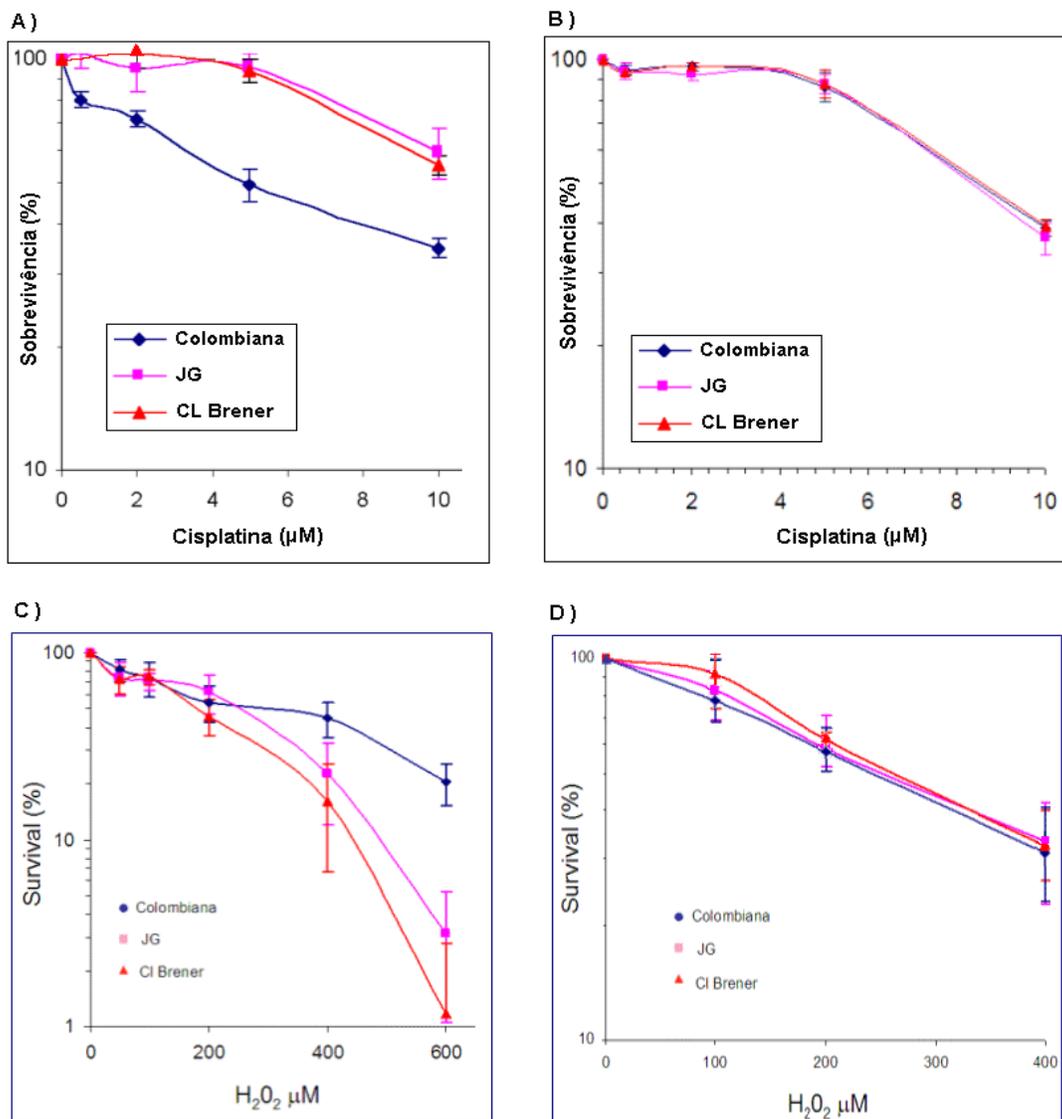
O cultivo de células na presença de cádmio poderia então funcionar como um nocaute fisiológico do sistema de reparo de erros de pareamento. Como Augusto-Pinto e colaboradores (2003) mostraram que o MMR apresenta atividade diferencial entre as cepas de *T. cruzi*, nos questionamos se o cádmio, ao inibir o MMR, seria capaz de alterar o padrão de mutações em cepas de *T. cruzi*.

Foi então verificado, através de ensaios com cisplatina e peróxido de hidrogênio, que o cádmio foi capaz de inibir o MMR em *T. cruzi* (Augusto-Pinto, 2004). A cisplatina é

---

uma droga que forma adutos no DNA que provocam alterações em sua estrutura tridimensional. Estas alterações são reconhecidas pelo sistema de reparo (MMR) e desencadeiam o fenômeno de apoptose celular. Dessa forma, a resistência à cisplatina pode ser associada à deficiência no MMR. Na ausência de cádmio, as cepas JG e CL Brener apresentam uma maior resistência à cisplatina em diferentes concentrações, quando comparadas à cepa Colombiana, o que pode indicar a menor eficiência do sistema de reparo de erros de pareamento (figura 3a). No entanto, na presença de 3  $\mu\text{M}$  de cloreto de cádmio a sobrevivência das três cepas estudadas é semelhante (figura 3b). Pode-se perceber pela figura que a sobrevivência de Colombiana passa a ser maior, igualando-se aos níveis observados em CL Brener e JG, indicando a inibição do MMR.

O peróxido de hidrogênio provoca lesões oxidativas altamente mutagênicas no DNA, como a 8-oxoguanina. A base lesada 8-oxo-G é capaz de se parear à adenina e, caso não seja reparada até o próximo ciclo de replicação, causa a transversão GC  $\rightarrow$  TA. A sensibilidade acentuada ao peróxido de hidrogênio pode ser associada a uma deficiência no reparo de erros de pareamento, já que a lesão 8-oxo-G pode ser reparada por este sistema. Conforme indicado na figura 3c, as cepas JG e CL Brener apresentaram maior porcentagem de morte em altas concentrações da droga (400 $\mu\text{M}$  a 600 $\mu\text{M}$ ), em relação à Colombiana indicando novamente a deficiência do MMR nas duas primeiras cepas. Assim como ocorrido no ensaio com cisplatina, a presença de 3  $\mu\text{M}$  de cádmio igualou as curvas de sobrevivência, possivelmente acentuando a morte em Colombiana, indicando novamente o efeito inibitório do cádmio sobre o MMR (figura 3d).



**Figura 3 – Efeito do cádmio sobre a sobrevivência de *T. cruzi* em cisplatina e peróxido de hidrogênio.** Curvas de sobrevivência das cepas JG (■), CL Brener (▲) e Colombiana (●), tratadas com doses crescentes de cisplatina, na ausência (A) ou presença (B) de 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  ou tratadas com doses crescentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na ausência (C) ou presença de 3  $\mu\text{M}$  de cloreto de cádmio (D). A sobrevivência foi analisada através de contagem de células vivas em câmara de Neubauer. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

## 1.9 JUSTIFICATIVA

A análise de taxa de mutação em *Trypanosoma cruzi* seria de grande importância para o entendimento da geração da alta variabilidade deste parasita. No entanto, até o momento não foi descrito para este organismo um sistema que quantifique a taxa de mutação, uma vez que o *T. cruzi* não cresce em meio sólido. Para essa análise seria necessário, portanto, o desenvolvimento de um novo método para medir a mutação neste protozoário, o que pretendemos realizar neste trabalho. De posse de uma metodologia capaz de quantificar a taxa de mutação, seremos capazes de investigar o efeito da deficiência do MMR em *T. cruzi*, além de estudar o efeito de diversos agentes genotóxicos sobre diferentes cepas que constituem esta espécie.

# **OBJETIVOS**

---

---

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consiste em investigar variações na taxa de mutação em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Para tanto, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolvimento de uma metodologia para avaliar a taxa de mutação em diferentes cepas de *T. cruzi*, baseada na reversão de uma mutação presente no gene *gfp* integrado ao genoma do parasita;
2. Estudo do efeito do cádmio sobre a taxa de mutação em *T. cruzi*, utilizando as cepas transfectadas com *gfp* contendo a mutação;
3. Avaliação do efeito do cádmio sobre a atividade ATPásica da proteína recombinante TcMsh2 de *T. cruzi*;
4. Avaliação do efeito do cádmio e peróxido de hidrogênio sobre a estabilidade genômica na cepa Colombiana, através do seqüenciamento do gene *TcRbp48*;
5. Avaliação do efeito do cádmio e peróxido de hidrogênio sobre a estabilidade genômica nas cepas JG, CL Brener e Colombiana, através da análise de regiões de microssatélites.

# **MATERIAL E MÉTODOS**



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. PARASITAS

Foram utilizadas, no presente estudo, três cepas de *Trypanosoma cruzi*: JG, Colombiana e CL Brener, todas provenientes do laboratório do professor Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. As culturas foram mantidas a 28°C por passagens regulares em meio LIT, pH 7,3, esterilizado por filtração em filtro de 0,2µm, suplementado com 10% de soro bovino fetal e acrescido de Penicilina (100U/mL) e Estreptomicina (100µg/mL), como descrito previamente por Camargo (1964).

##### LIT (Liver Infusion Tryptone)

Liver digested neutralized	5,0 g
Bacto tryptose	5,0 g
Dextrose	2,0 g
NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 g
Hemina	20 µg/mL

#### 3.2 CÉLULAS BACTERIANAS E MEIO DE CULTURA

A cepa de *E.coli* utilizada neste estudo foi a DH5α, que contém o seguinte genótipo: *supE44, lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1* (Hanahan, 1983).

Para o crescimento dessa linhagem foi utilizado o meio de cultura 2xYT, pH 7,0, líquido ou sólido (acrescido de 1,5% de ágar) autoclavado, preparado de acordo com Sambrook e cols. (1987).

##### 2xYT

Bacto triptona	1,6 g
Extrato de levedura	1,0 g
NaCl	0,5 g
Água destilada	qsp 100 mL

### 3.3 INICIADORES

Os iniciadores utilizados, sintetizados pela companhia ALFA DNA, estão representados na tabela abaixo. Todos eles foram diluídos em água deionizada e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em alíquotas na concentração de 200 pmol/ $\mu\text{L}$ .

**Tabela II** - Iniciadores utilizados neste trabalho, seqüências e tampões apropriados.

Iniciador	Seqüência (5'» 3')	Tampão
AMA3'UTR	CGATGAATTTTGATTGTG	Phoneutria
AMA5'UTR	GCTGGGCCCTTCTACGTGAGAGCT	
GFPTAA11	CGCAAAGCATTAACACC	
TcAg48F	CTTCGTACGGGCGGTTTCAG	
TcAg4831	GGCCCCAGTTCTTCACG	
MCLE01 R	CGTGTACATATCGGCAGTG	Cenbiot
MCLE01 F flu	Fluoresceína - CTGCCATGTTTGATCCCT	
MCL03 R	TCAGAAAAAGCACGCCTC	Tampão 3
MCLO3 F flu	Fluoresceína - GGAGCAAGAATGAAGGCA	
MCL05 R	CCTGAGCAAGATACAAGGAC	Tampão 12
MCL05 F flu	Fluoresceína - TTAAACGACCTCTATGTCTCTC	
MCL08 R	TGGGTATGCCAAATGTGAT	Tampão 4
MCLO8 F flu	Fluoresceína - ATGGACAACAAATGGGAG	
SCLE10 R flu	Fluoresceína - GTGCATGTTCCATGGCTT	Tampão 7
SCLE10 F	GATCCCGCAATAGGAAAC	
SCLE11 R	GATGCTAACTGCTCAAGTGA	Cenbiot
SCLE11 F flu	Fluoresceína - ACGACCAAAGCCATCATT	
MCLF10 R	ATCCGCTACCACTATCCAC	Tampão 4
MCLF10 F flu	Fluoresceína - GCGTAGCGATTTCATTCC	
AAT F flu	Fluoresceína ACCTCATCGGTGTGCATGTC	Cenbiot
AAT R	TATTGTCGCCGTGCAATTC	

TAC15 F flu	Fluoresceína GAATTTCCCCATTCCAAGC	Tampão 4
TAC15 R	CGATGAGCAACAATCGCTTC	
TAT F flu	Fluoresceína GATCCTTGAGCAGCCACCAA	Tampão 4
TAT R	CAAATTCCCAACGCAGCAGC	
AAAT R	GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG	Tampão 4
AAAT F flu	Fluoresceína GCCGTGTCCTAAAGAGCAAG	
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	TA cloning PCR buffer
M13 -40 F	GTTTTCCCAGTCACGAC	

### 3.4 TAMPÕES

Os tampões utilizados nas reações de PCR estão listados na tabela abaixo. Os tampões Phoneutria (MG, Brasil) e Cenbiot (RS, Brasil) foram fornecidos juntamente com a enzima Taq DNA polimerase, o tampão TA é um reagente do kit *TA Cloning, versão V* (Invitrogen) e os tampões 3, 4, 7 e 12 pertencem ao kit *Opti-prime PCR Optimization* (Stratagene, CA, USA).

**Tabela III** – Composição dos diferentes tampões utilizados nas reações de PCR.

Tampões (10X)	[Tris – HCl]	pH	[MgCl <sub>2</sub> ]	[KCl]
Phoneutria IB	100 mM	8,8	15 mM	500 mM
Cenbiot	100 mM	8,5	15 mM	500 mM
TA PCR buffer	100 mM	8,3	25 mM	500 mM
3	100 mM	8,3	35 mM	250 mM
4	100 mM	8,3	35 mM	750 mM
7	100 mM	8,8	35 mM	250 mM
12	100 mM	9,2	35 mM	750 mM

### 3.5 CONSTRUÇÃO DO VETOR pROCKGFPstop

O plasmídeo pROCKGFP (figura 4), foi construído por Augusto Pinto (dado não publicado) a partir de modificações do vetor pROCKAmaGFP, gentilmente cedido por

---

Wanderson Duarte da Rocha (UFMG). A partir do pROCKGFP foi construído o seu variante pROCKGFPstop, que contém o gene GFP apresentando uma mutação (C → T) na posição 230. Inicialmente o vetor pROCKGFP foi digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI* para a retirada do gene de GFP, que foi substituído pelo gene mutado, conforme descrito abaixo, subclonado no plasmídeo pGEMT, digerido com as mesmas enzimas.

- **Obtenção de GFP mutado**

O gene GFP contendo a mutação na posição 230 foi obtido através da técnica de Mega Primer, descrita por Sarkar e Sommer (1990). Este método se baseia na amplificação de um fragmento do gene que se deseja modificar utilizando um iniciador que contém em sua seqüência a alteração desejada. O fragmento obtido é então utilizado como iniciador (mega primer) em uma segunda etapa de amplificação, quando o gene é amplificado em toda a sua extensão.

Inicialmente, um fragmento de aproximadamente 250 pb foi amplificado a partir do gene GFP clonado em pUC18 flanqueado pelas seqüências Ama 5'UTR e Ama 3'UTR (figura 5) utilizando-se os iniciadores AMA5'UTR e GFPTAA11. A reação de amplificação foi feita em um volume de 20µL contendo 1,25 pmol de cada iniciador, tampão Phoneutria IB 1X, 500 µM de dNTPs, 1 unidade de *Taq DNA polimerase* (Phoneutria) e 10 ng do vetor pUC18GFPHE. A amplificação foi realizada em um termociclador PT100 (MJ Resarch) e o programa (GFPMEGA) consistiu em 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min), seguidos de 10 minutos de extensão final a 72°C. Parte do produto da amplificação foi corrida em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para confirmação do tamanho do fragmento amplificado. O restante da reação foi utilizado para a purificação do fragmento amplificado, através do kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Promega), segundo instruções do fabricante. O DNA obtido foi dosado através de comparação a padrões de concentração conhecida e utilizado como

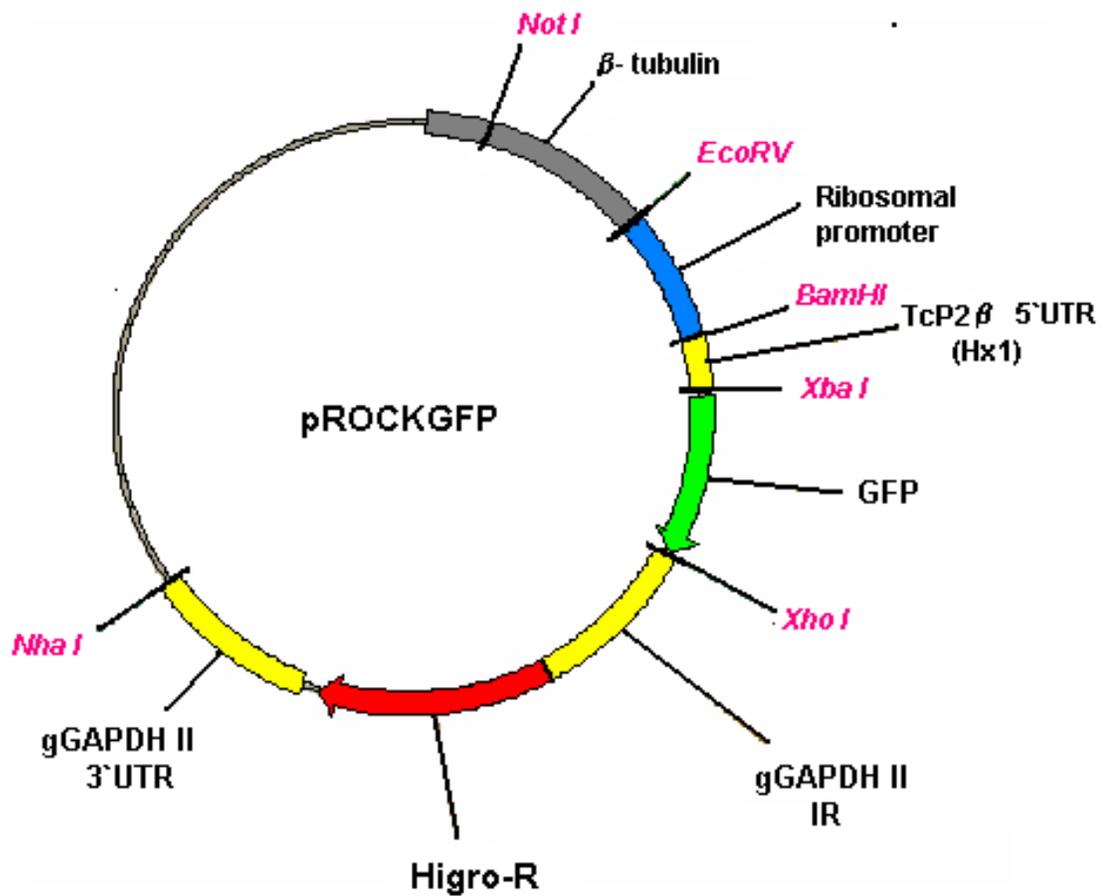
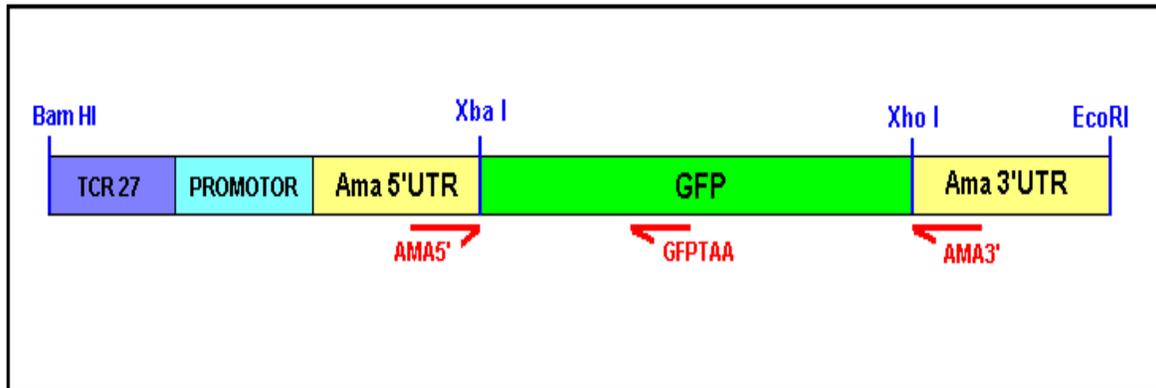


Figura 4 – Esquema representativo do vetor de expressão em *T. cruzi* pROCKGFP.

(Figura adaptada de DaRocha *et al*, 2003)



**Figura 5 – Esquema representativo do vetor linearizado pUC18GFPHE.** O gene GFP está clonado entre as regiões 5'UTR E 3'UTR do gene da amastina. As setas vermelhas representam os iniciadores. Traços azuis representam os sítios das endonucleases de restrição indicadas.

“mega primer” em uma segunda reação de amplificação, juntamente com o iniciador AMA3’UTR. Foram utilizados 2,5 pmol de AMA3’UTR e 50ng de “mega primer” previamente desnaturado (95°C por 5 min e 4°C por 5 min) em 20µL de reação contendo dNTPs, tampão, *Taq* e pUC18GFPHE nas quantidades indicadas acima. A amplificação foi feita através do programa GFPMEGA já descrito. O produto da reação foi resolvido em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

- **Clonagem em vetor pGEMT**

O gene mutado de GFP, produto da segunda amplificação foi clonado no vetor pGEMT (Promega). Em 5 µL de reação de clonagem foram utilizados 0,5µL do produto de PCR, 0,5µL de T4 Ligase, 2,5 µL de tampão da ligase e água. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, 2 µL da reação foram utilizados para transformar bactérias termocompetentes. O DNA plasmidiano obtido das bactérias selecionadas foi purificado e digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI* (figura 5) para a retirada do gene mutado.

### 3.6 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DH5α TERMOCOMPETENTES

Cem microlitros de bactérias *E. coli* tratadas previamente com CaCl<sub>2</sub> (Sambrook e cols, 1987), foram misturadas com o produto de ligação, mantidas em gelo por 30 minutos e transformadas por choque térmico a 42°C por 1h30min seguidos de 2 minutos em gelo. Foram adicionados às células transformadas 400µL de meio 2xYT líquido. Em seguida, as células foram incubadas por 45 minutos a 37°C, sob agitação constante (180 rpm). Após este período de crescimento, 200µL da cultura transformada foram plaqueados em meio 2xYT sólido suplementado com 100µg/mL de ampicilina e 0,004% de X-Gal. As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C.

O plasmídeo pUC18 (Amersham-Pharmacia Biotech) foi utilizado como controle positivo e uma transformação sem plasmídeo como controle negativo.

### 3.7 PCR DE COLÔNIA

As colônias isoladas resultantes da transformação foram testadas para a presença do inserto através de PCR de colônia, utilizando os iniciadores AMA5’UTR e AMA3’UTR.

Pequenas porções de colônias foram transferidas, com a ajuda de um palito estéril, para tubos contendo 20µL de reação de PCR contendo 2,5 pmol de cada iniciador, 1 unidade de Taq, 500 µM de dNTPs e tampão 1X. O programa de amplificação utilizado (GFPMEGA) está descrito no item 3.5. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1,0%.

### 3.8 OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIANO

O DNA plasmidiano dos clones selecionados foi preparado utilizando o kit *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Neste, a purificação é baseada na lise alcalina das bactérias seguida de cromatografia de troca iônica. Através desse sistema, são obtidos cerca de 2 µg de DNA a partir de 3,0 mL de cultura crescida por 16 horas em meio 2xYT. A cultura foi inicialmente centrifugada por 5 minutos a 10 000 rpm, para a sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 250 µL de Solução de Ressuspensão. Em seguida adicionou-se 250 µL de Solução de Lise e 10 µL de Solução de Protease Alcalina e incubou-se por 5 minutos. Após a adição de 350 µL de Solução de Neutralização, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 14 000 x g. Em seguida o lisado foi passado por uma coluna (Spin Column) através de centrifugação por 1 minuto a 14 000 x g. O DNA plasmidiano preso à coluna foi lavado duas vezes com Solução de Lavagem adicionada de etanol e em seguida foi eluído com água Livre de Nucleases morna.

Preparações de DNA plasmidiano em maior quantidade e com alto grau de pureza, para serem utilizados na transfecção dos parasitas, foram obtidas a partir de 200mL de cultura em meio 2xYT, com o uso do *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), segundo instruções do fabricante. Este sistema se baseia no mesmo processo descrito anteriormente.

### 3.9 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As digestões do DNA plasmidiano foram realizadas nas proporções de 1 unidade de cada enzima de restrição para cada 1 µg de DNA, na presença do tampão especificado pelo fabricante a 37°C, por 16 horas.

### 3.10 PRECIPITAÇÃO DE DNA

O DNA foi precipitado na presença de 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2, 2 volumes de etanol 100%, sendo a mistura incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. O precipitado de DNA foi obtido após centrifugação a 14 000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e lavado com etanol 70%. Após nova centrifugação por 5 minutos, o precipitado foi seco e então solubilizado em água.

### 3.11 DOSAGEM DO DNA

As amostras de DNA foram dosadas em espectrofotômetro a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280nm. A concentração em ng/ $\mu\text{L}$  foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Concentração (ng}/\mu\text{L}) = \lambda_{260} \times 50 \times \text{diluição}$$

### 3.12 TRANSFEÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T.cruzi*

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM Hepes, 2 mM EDTA pH 8.0, e 5mM  $\text{MgCl}_2$ ) a  $4^{\circ}\text{C}$  e ressuspensos a uma concentração final de  $10^8$  células/mL no mesmo tampão. Cinquenta microgramas, em um volume máximo de 50  $\mu\text{L}$ , de cada plasmídeo (pROCKGFP e pROCKGFPstop), previamente digeridos com a enzima *NotI* (Promega), foram adicionados diretamente a 400  $\mu\text{L}$  da suspensão de parasitas ( $4 \times 10^7$  parasitas) em cubetas de eletroporação *Gene Pulser* (Bio-Rad) de 0,2 cm. As condições elétricas de eletroporação utilizadas foram de 0,3 KV e 500  $\mu\text{F}$ , tendo sido aplicados 3 pulsos em um eletroporador *Gene Pulser System* (Bio-Rad).

O controle negativo foi feito através de eletroporação de uma suspensão de parasitas ( $4 \times 10^7$  células) com 50  $\mu\text{L}$  de água miliQ estéril, nas mesmas condições elétricas descritas acima.

Após a eletroporação, as cubetas foram transferidas para o gelo por 5 minutos, sendo os parasitas, em seguida, transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$ . Vinte e quatro horas após a eletroporação foi adicionado ao meio 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Higromicina B (Life Technologies, GibcoBRL, USA).

### 3.13 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As formas epimastigotas dos parasitas transfectados com os plasmídeos pROCKGFP e pROCKGFPstop foram avaliadas em microscópio de fluorescência Axioplan 2 da Zeiss, equipado com epi-iluminação e lâmpada de mercúrio HBO 100 W como fonte de luz ultravioleta. Na busca por parasitas verdes fluorescentes foi utilizado um filtro para FITC. Os parasitas foram também observados em microscópio de luz, para verificação da viabilidade. Em ambos os procedimentos foram utilizados parasitas vivos.

### 3.14 FIXAÇÃO DE CÉLULAS DE *T. CRUZI* PARA PASSAGEM NO FACS

Cerca de 1,5 mL de cultura de epimastigotas foram centrifugados a 400 rpm por 10 minutos seguidos de 10 minutos de repouso para separação das células dos “debris” celulares presentes na cultura. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e lavado 3 vezes com PBS. Em seguida, as células foram sedimentadas e ressuspensas em 4 mL de solução PBS/MMF (1:1). As preparações de células fixadas foi mantida a 4°C até o dia seguinte, quando foi submetida à contagem no FACS (A solução de MMF foi preparada no momento do uso e filtrada).

#### MMF

Paraformaldeído	5 mL
Cacodilato de sódio	5 mL
Água deionizada	90 mL

### 3.15 FACScan

Cerca de  $5 \times 10^7$  células de cada cultura fixada foram submetidas a análise pelo aparelho FACScan.

Neste sistema de análise de fluxo, a suspensão de células é passada através de uma região sensível iluminada por raio laser. A dispersão da luz e os sinais de fluorescência coletados de cada célula são analisados e armazenados em um sistema computacional. Esses sinais são usados na identificação de células de interesse.

As condições elétricas de detecção utilizadas na aquisição foram SSC: 437 volts; FL1: 676V; FL2: 647V; FL3: 854V. A aquisição foi analisada através do programa Cell Quest.

### **3.16 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE GFP NAS CÉLULAS TRANSFECTADAS**

- **EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI***

CL Brener e Colombiana transfetadas com pROCKGFP e pROCKGFPstop e selecionadas com Higromicina B tiveram seu DNA total extraído baseando-se nos procedimentos descritos por Andrade e cols. (1999). A extração foi constituída de três etapas principais: lise celular, desproteinização e precipitação.

Inicialmente, cerca de  $10^8$  células foram lavadas três vezes com PBS, sedimentadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C e incubadas com 200 µL de solução de lise (0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 µM EDTA pH 8,0) contendo 20 µg/mL de RNase, por 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se Proteinase K (100 µg/mL) e o lisado foi incubado a 50°C por 3 horas.

A desproteinização ocorreu em três etapas. Na primeira delas, adicionamos 200 µL de fenol ao lisado, homogeneizando vagarosamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, gerando duas fases. A fase aquosa foi coletada e a não aquosa, descartada. Na segunda etapa adicionamos à fase aquosa 200µL de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) e repetimos os procedimentos de homogeneização, centrifugação e coleta da fase aquosa. A terceira etapa consiste na adição de 200 µL de clorofórmio e repetição dos demais procedimentos.

A precipitação foi feita na presença de 400 µL de etanol absoluto e 250 mM de NaCl, a - 20°C, por 16 horas. O DNA foi baixado a 10 000 rpm por 15 minutos a 4°C, lavado duas vezes com etanol 70%, seco, ressuscitado em T.E., dosado e diluído para o uso.

- **AMPLIFICAÇÃO DE GFP**

A partir do DNA extraído, foi feita uma PCR utilizando-se os iniciadores GFP3'e GFP5' para verificar se o gene GFP foi integrado ao genoma dos parasitas.

A reação de PCR foi feita em um volume de 10µL, contendo 5 ng do DNA total de *T. cruzi*, 5 pmol de cada iniciador, 120µM de dNTPs, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), tampão IB Phoneutria 1X.

A amplificação foi realizada em um termociclador PT100 (MJ Resarch) e o programa de amplificação consistiu em:

- i. Desnaturação inicial a 94°C por 1 min;
- ii. 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30seg), anelamento (52°C, 45seg) e extensão (72°C, 1 min);
- iii. Extensão final a 72°C por 10 min.

O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo.

### **3.17 ENSAIO DE ATIVIDADE ATPÁSICA DE TcMSH2**

A atividade ATPásica da proteína TcMsh2 de CL Brener e Colombiana foi testada na presença de 10µM de cloreto de cádmio (Vetec). As proteínas TcMsh2 recombinantes foram gentilmente cedidas pela aluna de doutorado Alice Machado Silva.

Trezentos nanogramas da proteína foram incubados por 2 horas a 37°C com ATP marcado radiativamente no fosfato gama ( $\gamma$ ), na presença de tampão de ATPase (Hepes pH7,6 25mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM) contendo ou não 10 µM CdCl<sub>2</sub>. A reação foi finalizada com 1 volume de Solução de Parada (formamida, EDTA, fuccina) e colocada no gelo.

O produto da reação foi corrido em gel de poliacrilamida 20% sob amperagem constante (20 mA). Após a corrida, o gel foi revestido de filme PVC e exposto a um filme de raio X por 2 horas.

### **3.18 TRATAMENTO DOS PARASITAS COM CLORETO DE CÁDMIO (CdCl<sub>2</sub>) E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Populações das cepas JG, CL Brener e Colombiana foram tratadas com 3µM de cloreto de cádmio (Vetec), 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) ou ambos, por um período variável de

dias. O tratamento consistiu na manutenção das culturas a 28°C, em meio LIT adicionado de solução de CdCl<sub>2</sub> e/ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As células sofreram repiques regulares a cada sete dias.

Foram preparadas alíquotas estéreis de 2mM de CdCl<sub>2</sub> dissolvido em água deionizada. A esterilização foi feita por passagem em um filtro de 0,2 µm. Os estoques foram mantidos a - 20°C e as alíquotas em uso, a 4°C.

O peróxido de hidrogênio em solução foi adquirido na concentração de 8,8 M e mantido à temperatura ambiente, sob abrigo da luz.

### 3.19 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Foi realizado um estudo de sobrevivência da cepa JG de *T. cruzi* em concentrações crescentes de cloreto de cádmio. Foram estudadas duas culturas de JG: uma delas foi previamente tratada com 3µM de CdCl<sub>2</sub> por 60 dias, a outra não teve contato prévio com esta droga.

O ensaio foi realizado em triplicata em placa de 24 poços (Nunclon). As concentrações de cloreto de cádmio estudadas foram 1µM, 3µM, 5µM e 50µM. Em cada poço havia inicialmente 2 mL de cultura contendo 10<sup>6</sup> parasitas/mL, adicionado de CdCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações. Como controle de crescimento, não foi adicionado CdCl<sub>2</sub> em um dos poços. A placa foi mantida em câmara úmida em uma estufa a 28°C por quatro dias. Após este período foi feita a contagem das células vivas de cada poço, através de câmara de Neubauer.

### 3.20 CURVA DE CRESCIMENTO

Culturas de parasitas em fase exponencial de crescimento foram diluídas a concentração de 5x10<sup>6</sup> células/mL em um volume de 3 mL, adicionando CdCl<sub>2</sub> e/ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentrações de 3µM e 50µM, respectivamente.

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo realizadas duas contagens do número de parasitas vivos (corados por corante vital de eritrosina) por mililitro de meio, a cada 2-3 dias, até o décimo dia de cultivo. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer.

### 3.21 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

O DNA genômico dos parasitas submetidos ao tratamento com  $\text{CdCl}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi extraído por fenol e clorofórmio, conforme descrito no item **3.16**.

Após a extração, a qualidade das amostras de DNA (relação ácidos nucleicos/proteína) foi verificada através de análise de absorvância. O DNA total foi dosado por comparação com padrões de concentração conhecida através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Os estoques de DNA foram mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  e as amostras diluídas para uso mantidas a  $4^\circ\text{C}$ , conforme descrito (Sambrook, 1987).

### 3.22 SEQUENCIAMENTO DE *TcRBP48*

#### ▪ Amplificação de *TcRBP48* a partir do DNA total de cepas tratadas

A amplificação de uma região de aproximadamente 250 pb de *TcRBP48* foi realizada a partir de 1 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$  contendo tampão da *Taq* Phoneutria 1X, 25  $\mu\text{M}$  de dNTP, 5 pmol dos iniciadores TcAg48F e TcAg4831, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Phoneutria) e 0,05 unidades de PFU polimerase (Stratagene). A reação de PCR foi realizada no termociclador PT100 (MJ Resarch) e consistiu em:

- i. Desnaturação inicial por 5 minutos a  $95^\circ\text{C}$ ;
- ii. 35 ciclos de desnaturação ( $95^\circ\text{C}$ , 1min), anelamento ( $59^\circ\text{C}$ , 1min e 20seg) e extensão ( $72^\circ\text{C}$ , 45seg);
- iii. Extensão final de 10 minutos

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e teve o tamanho confirmado através de comparação com um padrão de peso molecular conhecido.

#### ▪ Extensão e clonagem dos fragmentos de *TcRBP48* amplificados

Fragmentos amplificados de *TcRBP48* foram clonados no vetor pCR2.1 utilizando o kit *TA Cloning kit*, versão V (Invitrogen), de acordo com as normas do fabricante.

Uma extensão foi feita incubando-se o produto de PCR com 250  $\mu$ M de dNTPs, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria) e tampão IB 1X, por 10 minutos a 72°C.

A reação de ligação foi feita em 10  $\mu$ L contendo 3  $\mu$ L do produto da extensão, T4 Ligase (4 unidades), Tampão de Ligação 1X e 50 ng do vetor pCR2.1, por 16 horas a 14°C. O produto de ligação foi utilizado para transformar células DH5 $\alpha$  eletrocompetentes.

- **Transformação de células DH5 $\alpha$  eletrocompetentes**

Para a transformação, 2  $\mu$ L da reação de ligação foram adicionados a uma alíquota de células competentes – preparadas de acordo com Sambrook e cols. (1987) e incubados no gelo por 5 minutos. A amostra foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (*Gene Pulser*, Bio Rad) e submetida a choque elétrico em um eletroporador Micropulser Bio Rad. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo contendo 250  $\mu$ L de 2XYT. As etapas de crescimento, plaqueamento e incubação a 37°C ocorreram conforme descrito no item 3.7.

- **Minipreparação de plasmídeo em placa**

Colônias positivas para o fragmento de *TcRBP48* obtidas em PCR de colônia (como descrito no item 3.7) utilizando os iniciadores TcAg48F e TcAg4831 foram selecionadas e crescidas por 22 horas a 37°C, sob agitação constante (180 rpm), em 1200  $\mu$ L de meio 2xYT líquido contendo 100 $\mu$ g/mL de ampicilina, em uma placa “deep well” (BioAgency). Para estocagem em longo prazo, alíquotas da cultura foram congeladas a – 80°C na presença de glicerol 15%.

As células foram sedimentadas após o crescimento, por centrifugação a 4000 rpm por 6 minutos. Em seguida, lavadas com GET (glicose 20%; 0,5M EDTA pH 8; 1M Tris-HCl pH 7,4) e lisadas com solução I (NaOH 0,2M; SDS 1%) na presença de RNase. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionamos acetato de potássio (KOAc) 3M. A mistura foi então mantida por 10 minutos em temperatura ambiente, seguidos de 30 minutos de incubação em estufa a 90°C e 10 minutos no gelo. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 9 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma placa filtro Millipore fixada no topo de uma placa de fundo V e centrifugado por 6 minutos a 4000 rpm. A placa Millipore foi removida após a centrifugação. O DNA plasmidiano presente no filtrado na microplaca fundo V foi precipitado com Isopropanol (Merck), por 45 minutos a

4000 rpm, lavado com álcool 70% (Merck) por 10 minutos a 4000 rpm, ressuspendido em água MilliQ e dosado em gel de agarose 1%.

- **Seqüenciamento**

Os fragmentos de *TcRBP48* clonados no vetor pCR2.1 foram seqüenciados em ambas as direções, utilizando o método descrito por Sanger (1977) através do seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech).

As reações de seqüenciamento foram feitas com o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, segundo as normas do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). Nas reações foram utilizados cerca de 400ng de DNA e 5pmol de iniciador M13 forward -40 ou M13 reverse. A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf), através de um programa de 35 ciclos de desnaturação (95°C, 20 seg), anelamento (50°C, 15 seg) e extensão (60°C, 1 min 20 seg).

Após, a amplificação, os produtos fluorescentes foram precipitados com etanol e injetados no seqüenciador, onde foram submetidos à eletroforese e analisados através do programa “Sequence analyzer”.

- **Análise das seqüências**

As seqüências foram alinhadas pelo programa MultAlin – Multiple Sequence Alignment (Corpet, 1988) e analisadas manualmente.

### **3.23 PCR DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES**

A partir do DNA genômico total extraído dos parasitas tratados com cloreto de cádmio e peróxido de hidrogênio, foram realizadas amplificações de regiões de microsatélites.

A amplificação do DNA de microsatélites em *Trypanosoma cruzi* foi, inicialmente, descrita por Oliveira e colaboradores (1998). As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação específica de cada um dos 11 locos de microsatélites (AAAT, TAT, AAT, TAC15, SCLE10, SCLE11, MCLE01, MCL03, MCL05, MCL08, MCLF10), assim como os tampões utilizados nas reações, estão descritos nas tabelas I e II. Em todos os casos, um dos iniciadores do par foi marcado com fluoresceína na sua extremidade 5’.

A mistura de reação (15 $\mu$ L) foi constituída de 1 unidade de *Taq* Polimerase, tampão 1X, 3 $\mu$ mol de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTPs e 2,5 ng de DNA.

Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador PT100 (MJ Resarch) através do seguinte programa:

- i. 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C;
- ii. 34 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (53°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto);
- iii. Nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos.

### **3.24 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CORADO PELA PRATA**

Alíquotas de 5 $\mu$ L do material amplificado foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante, corado por nitrato de prata, segundo o protocolo descrito por Sanguinetti e cols (1994). O gel foi fixado por 10 minutos a temperatura ambiente em solução 10% etanol e 0,5% ácido acético, seguida de uma incubação de 10 minutos em solução 0,15% de nitrato de prata, 5% etanol e 0,25% ácido acético. A revelação foi feita em solução 3% NaOH (p/v) e 0,1% formaldeído a 37% (v/v) durante o tempo necessário para o aparecimento da bandas. A revelação foi interrompida com solução de fixação e o gel foi fotografado.

### **3.25 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALÉLICO DE MICROSSATÉLITES**

Para a determinação do tamanho dos alelos de microssatélites, uma alíquota de 0,25 $\mu$ L a 2 $\mu$ L do produto da PCR foi desnaturada a 90°C por 3 minutos e, depois, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (8M uréia) no seqüenciador automático de DNA (ALF – Pharmacia). A corrida foi feita por 5 horas, a 50°C.

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

Os resultados obtidos em forma de cromatograma foram analisados com o auxílio do programa “Allelink” (versão 1.0, Pharmacia-Biotech). Os fragmentos de tamanho conhecido (padrões internos e externos) foram corretamente alinhados e os tamanhos dos alelos foram calculados.

# **RESULTADOS**

---

---

## 4. RESULTADOS

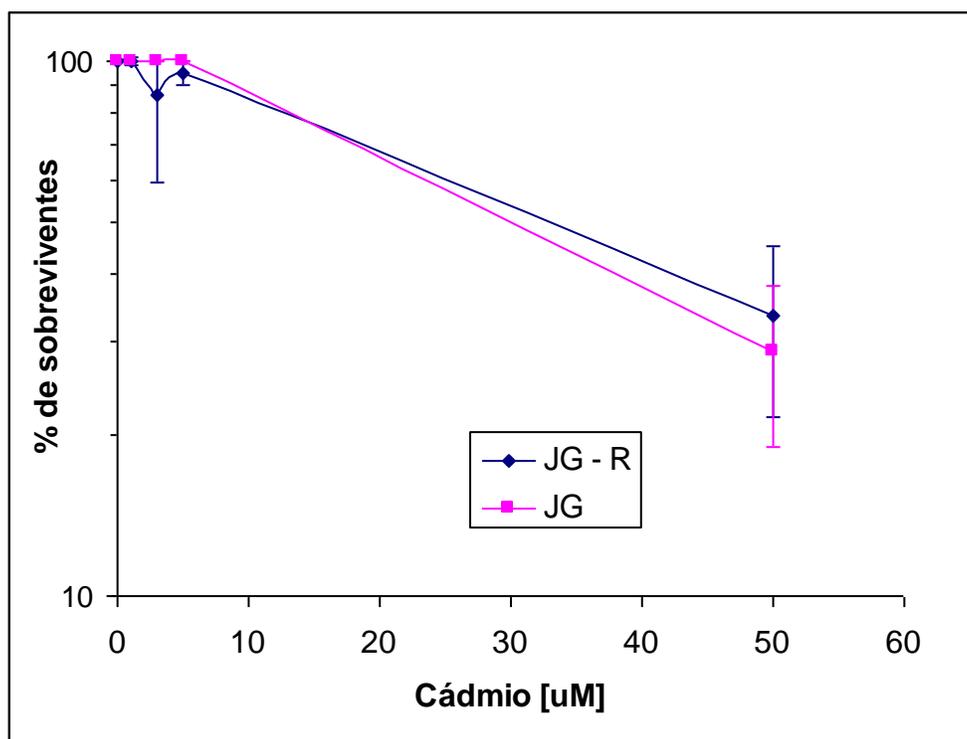
### 4.1. EFEITOS DO CÁDMIO EM *Trypanosoma cruzi*

Sabe-se que o cádmio tem um efeito inibitório específico sobre o reparo de erros de pareamento em leveduras e este efeito foi também observado em um ensaio *in vitro* com proteínas humanas componentes do MMR (Jin *et al*, 2003). Estudos preliminares com cisplatina e água oxigenada indicam que o cádmio inibe o reparo de erros de pareamento também em *T. cruzi* (Augusto-Pinto, 2004). Em uma célula, o sistema de reparo de erros de pareamento está diretamente relacionado ao controle de sua taxa de mutação (revisado por Hsieh, 2001). Resolvemos então investigar o efeito do cádmio sobre a taxa de mutação em *T. cruzi*. Como não existe na literatura qualquer outro trabalho a respeito de cádmio e *T. cruzi*, decidimos inicialmente verificar o comportamento deste parasita quando cultivado na presença de uma dose subletal de cádmio.

### 4.2. TRATAMENTO DE DIFERENTES CEPAS DE *T.cruzi* COM CLORETO DE CÁDMIO

As cepas JG, CL Brener e Colombiana foram cultivadas por 60 dias na presença de 3 $\mu$ M de cloreto de cádmio. Esta dose foi selecionada porque permitia uma sobrevivência média de 80% da cultura, em cinco dias de tratamento, em todas as cepas estudadas, de acordo com dados preliminares de Augusto-Pinto (2004). No entanto, ao longo do tratamento, pudemos observar que as cepas não responderam à presença de CdCl<sub>2</sub> de maneira semelhante, sendo Colombiana e CL Brener as cepas mais sensíveis a esta droga e JG, a cepa mais resistente, em termos de sobrevivência (ver tabela VI)

O fato de a cepa JG apresentar uma resistência maior ao cádmio quando comparada a CL Brener e Colombiana, nos levou a questionar se durante o tratamento desta cepa estaria havendo seleção de células resistentes ao cádmio, gerando assim, uma população resistente de JG. Para testarmos essa hipótese, foi realizado um ensaio de sobrevivência em concentrações crescentes de cloreto de cádmio com a cultura de JG previamente tratada, possivelmente resistente. A sobrevivência foi comparada a de uma cepa JG que não havia entrado em contato prévio com cádmio. Conforme pode ser visto na figura 6, não houve diferença significativa de sobrevivência entre as culturas, indicando que não houve seleção de células resistentes.



**Figura 6 – Investigação sobre a seleção de uma população da cepa JG resistente a cádmio.** Foi analisada, através da contagem de células vivas em câmara de Neubauer, a sobrevivência em concentrações crescentes de cádmio, de epimastigotas da cepa JG possivelmente resistentes ao cádmio, devido a um tratamento prévio com esta droga por 60 dias. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes, as barras representam o desvio padrão. *JG -R* (♦): cultura de JG previamente exposta a 3 µM de CdCl<sub>2</sub> por 60 dias; *JG* (■): cultura de JG sem contato prévio com cádmio.

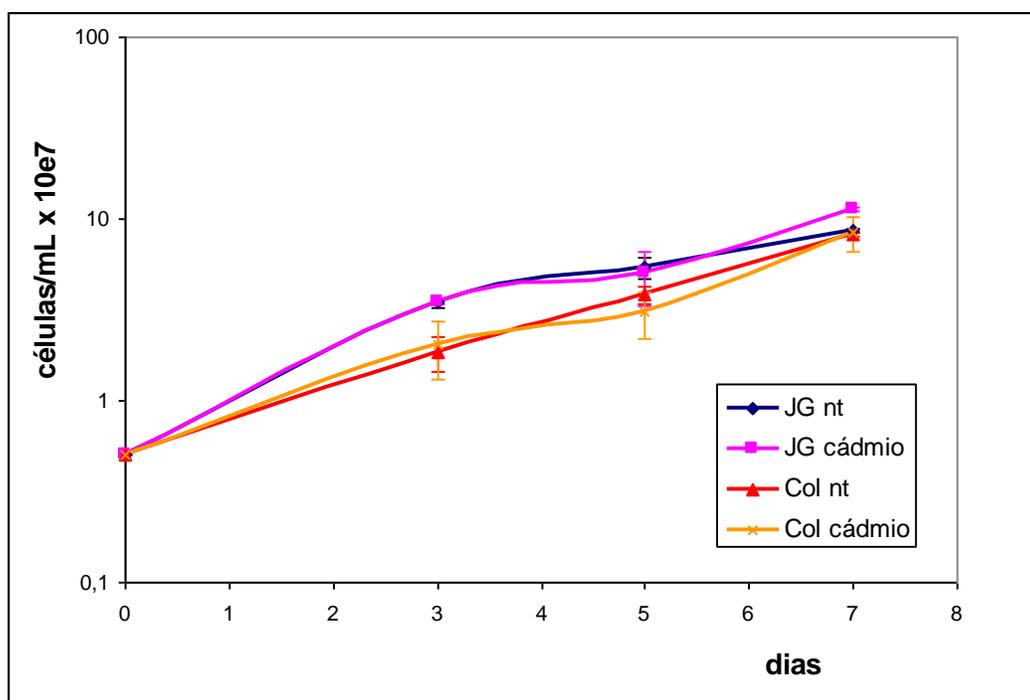
No entanto, como já foi dito, diferenças significativas na sobrevivência entre as cepas tratadas por cinco dias com  $3\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  não foram observadas por Augusto Pinto (2004). Para tentarmos entender a diferença no crescimento que observamos entre as cepas ao longo do tratamento, realizamos curvas de crescimento com JG e Colombiana na presença de  $3\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por sete dias. Conforme pode ser observado na figura 7, em curto prazo não houve diferença de crescimento entre as duas cepas, o que indica que a diferença observada por nós deve-se a um tratamento contínuo das cepas com uma dose subletal de cádmio.

#### 4.3. DESENVOLVENDO UMA METODOLOGIA PARA ANALISAR A TAXA DE MUTAÇÃO EM *Trypanosoma cruzi*

Até o momento, não existe na literatura qualquer descrição sobre uma metodologia capaz de determinar diretamente a taxa de mutação em *T. cruzi*. A dificuldade no desenvolvimento de tal metodologia deve-se ao fato de que este parasita não cresce adequadamente em meio de cultura sólido. Dessa forma, para investigarmos o efeito do cádmio sobre a taxa de mutação em *T. cruzi*, deveríamos elaborar uma estratégia que nos permitisse analisar diretamente a taxa de mutação em diferentes cepas deste parasita.

Além disso, o desenvolvimento desta metodologia seria interessante, pois nos permitiria observar se existe diferença na taxa de mutação entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Foi demonstrado por Augusto-Pinto *et al* (2003) que a eficiência do MMR em condições de estresse é diferente entre cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes grupos. Como este sistema de reparo está diretamente associado à taxa de mutação em vários organismos (revisado por Schofield e Hsieh, 2003), nos perguntamos se a diferença no MMR entre as cepas seria refletida em sua taxa de mutação.

Grande parte dos ensaios de mutação descritos na literatura baseiam-se em mutantes reversíveis capazes de crescer em um meio de cultura seletivo (Hampsey, 1991; Gee *et al*, 1994; Josephy, 2000). O ensaio desenvolvido por nós se baseia na reversão de uma mutação no gene *gfp* inserido no genoma de *T. cruzi* através de transfecção com um vetor apropriado. O gene *gfp* foi escolhido porque codifica para uma proteína que emite fluorescência facilmente detectável em laboratório. A mutação inserida resulta na produção de uma proteína truncada que não emite fluorescência. A reversão da mutação pode ser observada através da análise de fluorescência de uma cultura em estudo.



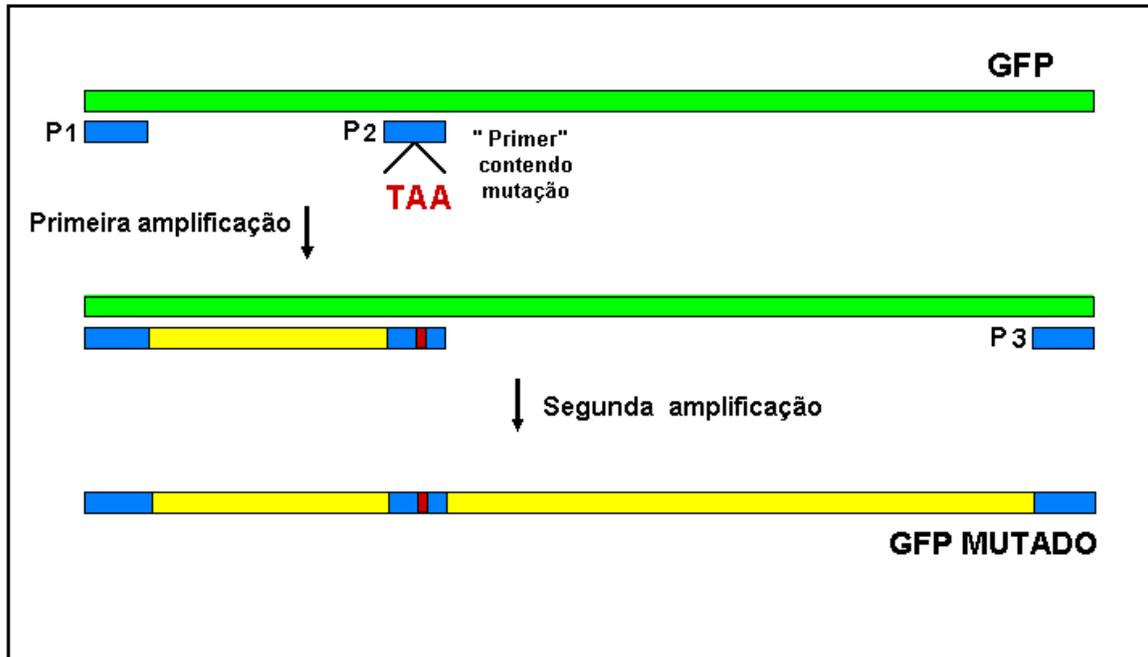
**Figura 7 – Crescimento de JG e Colombiana na presença de cloreto de cádmio.** O crescimento de epimastigotas das cepas JG e Colombiana de *T. cruzi* na presença de 3µM de CdCl<sub>2</sub> foi acompanhado por sete dias. A análise do crescimento foi feita através da contagem de células vivas em câmara de Neubauer. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão. (◆): JG não tratada; (■): JG cultivada na presença de 3µM de CdCl<sub>2</sub>; (▲): Colombiana não tratada; (×) Colombiana cultivada na presença de 3µM de CdCl<sub>2</sub>.

- **Construção dos vetores pROCKGFP E pROCKGFPstop**

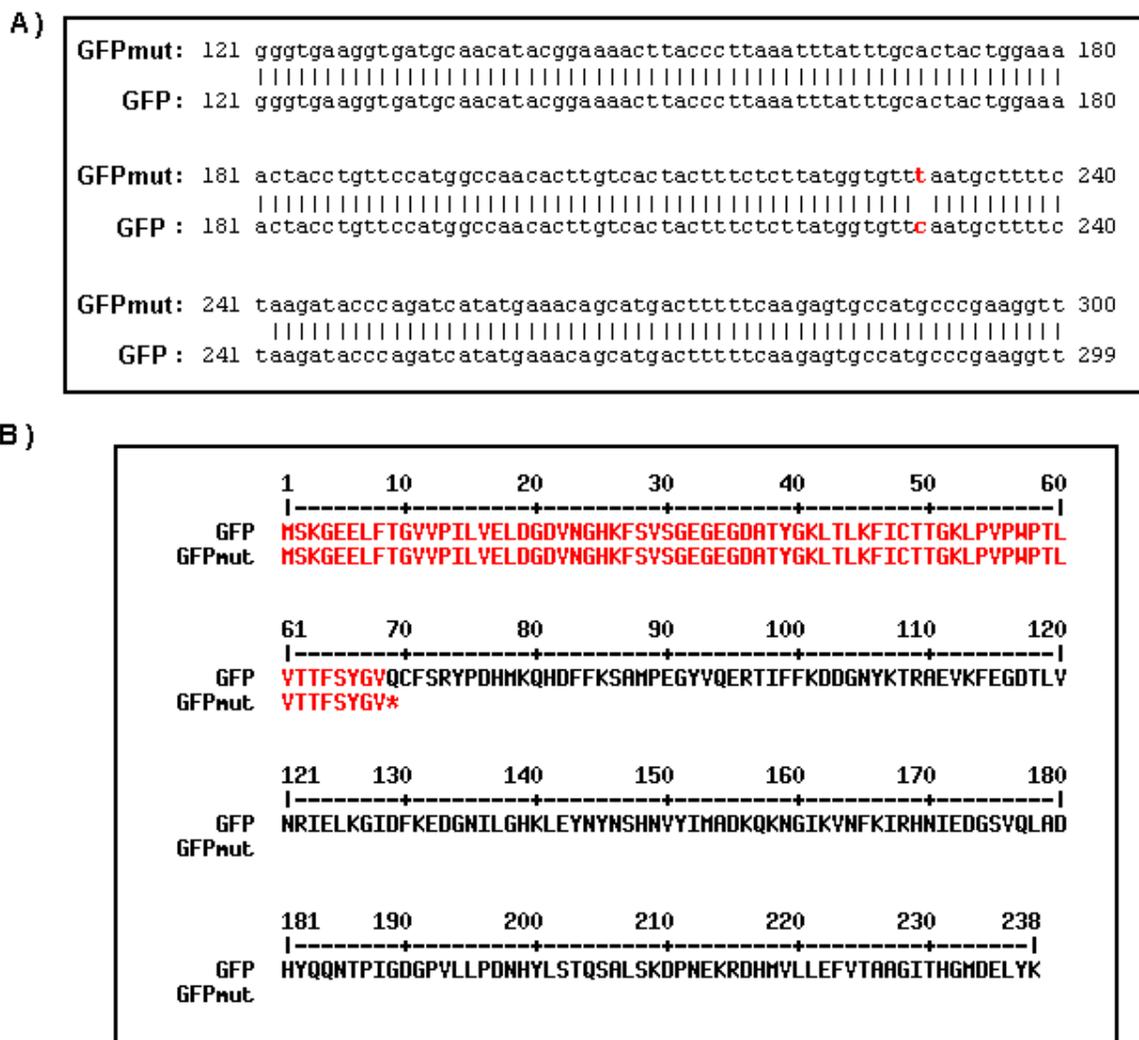
O vetor de expressão de *T. cruzi* pROCKGFP foi obtido por Augusto-Pinto (não publicado) a partir de modificações no plasmídeo pROCKAmaGFP (Da Rocha et al., 2003), gentilmente cedido por Wanderson da Rocha. O vetor pROCKGFP (figura 4) contém em sua seqüência um fragmento do gene de  $\beta$ -tubulina que apresenta um sítio interno para a enzima de restrição *Not I*. O vetor linearizado com esta enzima e utilizado para transfectar células de *T. cruzi* é capaz de se integrar ao genoma do parasita, em um dos vários locos de  $\beta$ -tubulina, através de recombinação homóloga. Para permitir a seleção de células transfectadas, o vetor pROCKGFP contém o gene  $HIG^R$ , que codifica para higromicina fosfotransferase, que inativa o antibiótico Higromicina B. Além disso, o vetor apresenta uma região promotora do gene de rRNA e as regiões intergênicas e 3'UTR do gene GAPDH, regiões estas necessárias ao correto processamento do transcrito de *gfp*.

Uma mutação foi inserida no gene *gfp* para a construção do vetor pROCKGFPstop. A mutação C  $\rightarrow$  T na posição 230 do gene resultou na geração de um códon de terminação precoce, em fase com o códon de iniciação da seqüência de mRNA. A mutação foi obtida através da técnica de Mega Primer (Sarkar e Sommer, 1990), esquematizada na figura 8. Inicialmente foi realizada a amplificação de um fragmento do gene *gfp* utilizando o iniciador GFPTAA11, que se anela à região que será modificada e contém, em sua seqüência, a alteração que se deseja produzir. O fragmento de aproximadamente 250 pb, amplificado pelos iniciadores AMA5'UTR e GFPTAA11 foi utilizado como iniciador, juntamente a AMA3'UTR, em uma segunda PCR, que amplificou o gene *gfp* em toda a sua extensão. O gene *gfp* mutado foi subclonado no vetor pGEMT, retirado por digestão com as endonucleases de restrição *XbaI* e *XhoI* e então clonado em pROCK digerido pelas mesmas enzimas.

A mutação no gene *gfp* do plasmídeo pROCKGFPstop foi confirmada através de seqüenciamento utilizando os iniciadores GFP5' e GFP3' específicos para o gene. A figura 9 mostra a seqüência parcial de *gfp*, contendo a alteração C  $\rightarrow$  T na posição 230. Graças ao códon de terminação precoce, em fase com o códon de iniciação, o gene mutado codifica para um peptídeo de 68 aminoácidos, como mostrado na figura 9b.



**Figura 8 – Esquema representativo da técnica de “Mega Primer” para obtenção da mutação em ponto no gene *gfp*.** Inicialmente, um fragmento do gene GFP foi amplificado utilizando-se um iniciador contendo a mutação desejada, que se anela a uma região interna do gene (P2) e um iniciador que se anela a uma extremidade do gene (P1). O fragmento produzido nesta PCR, o qual contém a mutação, foi utilizado como iniciador (“mega primer”) em uma segunda etapa de amplificação, juntamente com o iniciador P3. Nessa etapa, o gene *gfp* é amplificado em toda sua extensão. As seqüências dos iniciadores estão representadas por retângulos azuis. A mutação está representada em vermelho; o gene *gfp*, em verde e os produtos de amplificação, em amarelo.



**Figura 9 – Inserção de um códon de terminação precoce no gene de *gfp*.** (A) Comparação da seqüência do gene *gfp* mutado (*GFPmut*) à seqüência do gene original, obtida pelo programa BLASTN. Em vermelho, destaca-se a mutação de C para T na posição 230. (B): Comparação da seqüência de aminoácidos das proteínas GFP selvagem e GFP mutada. O alinhamento foi feito pelo programa MultAlin (Corpet, 1988).

#### 4.4. TRANSFEÇÃO DE PARASITAS DAS CEPAS CL BRENER E COLOMBIANA COM OS VETORES DE GFP

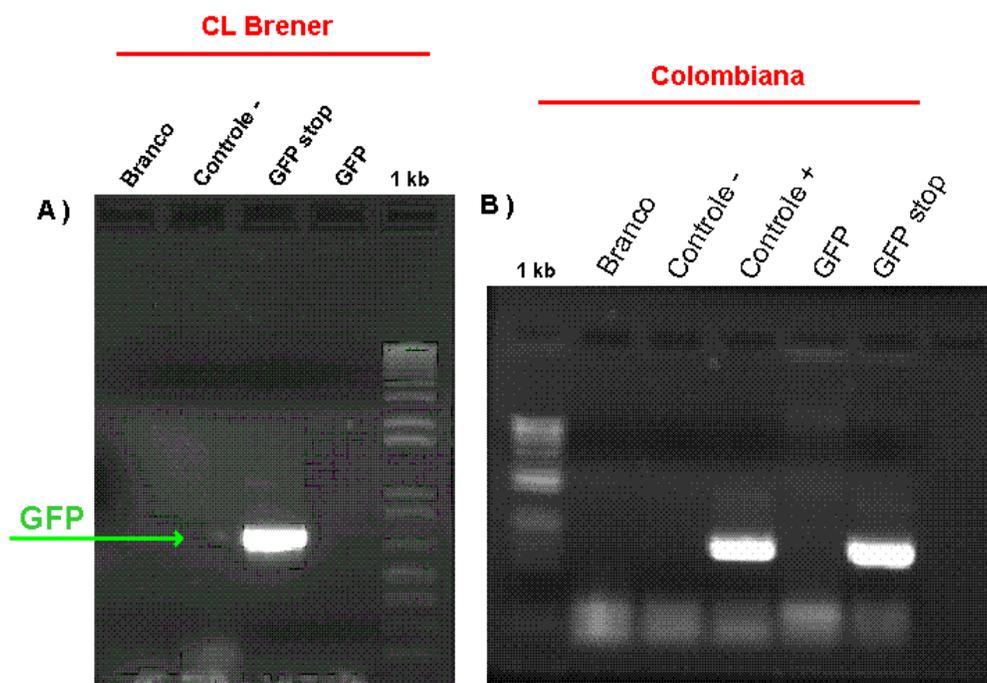
Culturas de epimastigotas das cepas CL Brener e Colombiana foram transfectadas com 30 µg dos plasmídeos pROCKGFP e pROCKGFPstop linearizados por *Not I*. As células transfectadas foram selecionadas através de cultivo em meio LIT contendo 200µg/mL do antibiótico Higromicina B. A seleção ocorreu entre quatro e oito semanas, quando as células do controle negativo (eletroporadas com água, apenas) morreram na presença do antibiótico.

As linhagens transfectadas das cepas CL Brener e Colombiana apresentavam morfologia, mobilidade e crescimento normais, conforme observado ao longo do seu cultivo.

Após o período de seleção, os parasitas transfectados foram analisados em microscópio de fluorescência, com filtro para FITC, para visualização de GFP. Conforme esperado, nas culturas de CL Brener e Colombiana transfectadas com pROCKGFPstop não havia células apresentando fluorescência verde. De maneira surpreendente, porém, nas culturas transfectadas com pROCKGFP e selecionadas em higromicina não foram detectados parasitas emitindo fluorescência verde.

As culturas transfectadas foram também fixadas e submetidas à contagem e análise pelo citômetro de fluxo (FACScan), que é capaz de dividir uma população de células em sub-populações com diferentes níveis de fluorescência. De acordo com nossa observação prévia em microscópio de fluorescência, não foram detectadas subpopulações verdes em nenhuma das culturas transfectadas.

Uma das possíveis explicações para o fato de não termos detectado fluorescência verde nas culturas transfectadas com o gene *gfp* selvagem seria a ausência de integração deste gene no genoma das células. Para verificarmos essa hipótese, realizamos uma extração do DNA total dessas células e uma PCR com iniciadores específicos para *gfp* a partir do DNA extraído. Conforme pode ser visto na figura 10, o gene *gfp* não foi amplificado a partir do DNA de CL Brener e Colombiana transfectadas com pROCKGFP, indicando que não houve a integração genômica esperada. Por outro lado, houve amplificação a partir do DNA das células transfectadas com pROCKGFPstop, indicando que a integração ocorreu. Novos experimentos de transfecção com o plasmídeo contendo *gfp* selvagem estão sendo conduzidos.



**Figura 10 – Verificação da presença de *gfp* no DNA de culturas de CL Brener e Colombiana transfectadas.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produto de PCR a partir do DNA genômico de epimastigotas de CL Brener (A) e Colombiana (B) transfectadas com pROCKGFP e pROCKGFPstop, utilizando iniciadores específicos para o gene *gfp*. A seta indica o fragmento amplificado de tamanho correspondente ao esperado. *GFPstop*: DNA de células transfectadas com pROCKGFPstop; *GFP*: DNA de células transfectadas com pROCKGFP; *1kb*: padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder).

#### 4.5. ANÁLISE DA TAXA DE MUTAÇÃO

De posse de células modificadas de *Trypanosoma cruzi* possivelmente expressando o gene *gfp* contendo uma mutação, iniciamos experimentos de análise de fluorescência para determinarmos a taxa de reversão desta mutação específica nas cepas CL Brener e Colombiana. A detecção de possíveis mutantes revertentes emitindo fluorescência verde foi feita em aparelho FACScan. Uma vez que é conhecido que estes parasitas emitem autofluorescência, foi estabelecido um limite no sinal em FL1, de tal forma que as células que emitiram fluorescência maior de  $10^2$  em FL1 foram consideradas verdes. Este limite foi determinado após a aquisição e análise em FACScan do padrão de fluorescência de uma cultura de *T. cruzi* contendo células com fluorescência verde, expressando *gfp*, gentilmente cedida por Simone Pires. Inicialmente, foi analisada uma cultura de CL Brener selvagem, sem o gene *gfp*. Conforme já observado anteriormente (DaRocha *et al*, 2003), mesmo na ausência de *gfp* foi possível detectar em média 300 células apresentando sinal dentro da faixa que foi estabelecida como limite para células verdes, em um total de 1 000 000 células, o que foi considerado ruído do experimento.

As mutações do tipo substituição de bases, que são nosso alvo de estudo, são geradas durante eventos de replicação (Kornberg e Barker, 1991). Dessa forma, espera-se um aumento do número de mutantes em uma cultura, na medida em que as células vão sofrendo duplicações, ou seja, uma cultura mais “antiga” deve apresentar mais mutantes que uma cultura “nova”. Para verificarmos nossa proposição, linhagens da cepa CL Brener transfectadas com pROCKGFPstop e selecionadas em higromicina foram mantidas em cultivo e após 15 e 60 dias o número de possíveis mutantes foi determinado através da análise das culturas no FACS. Conforme pode ser visto na tabela IV, o número de células que possivelmente sofreram mutações que reverteram a parada prematura na tradução de GFP foi proporcional ao tempo de cultivo, ou seja, quanto mais tempo em cultura, mais eventos celulares emitindo fluorescência na faixa “verde” foram detectados pelo FACS.

Embora os dados sejam preliminares, utilizamos os mesmos para realizar uma estimativa da taxa de mutação em CL Brener. Utilizando o modelo de distribuição de Lea e Coulson (1949), a partir do número de mutantes observado, determinamos o número provável de eventos de mutação ocorridos. A taxa de mutação foi calculada considerando-se o período de cultivo, o tempo de duplicação da cepa e o número provável de eventos de mutação.

**Tabela IV** – Estimativa da taxa de mutação em linhagens de CL Brener transfectadas com *gfp* mutado

<i>Cepa</i>	<i>Período de cultivo na presença de higromicina*</i>	<i>Nº de células em 1000 000 emitindo fluorescência FL1 &gt; 10<sup>2+</sup></i>	<i>Taxa de mutação***</i>
CL Brener	–	300 ± 100 (2)**	–
CL Brener pROCKGFPstop	15 dias	500 ± 0 (2)	5,44 x 10 <sup>-6</sup>
	60 dias	1400 ± 0 (3)	5,73 x 10 <sup>-6</sup>

A fluorescência de linhagens de CL Brener transfectadas com pROCKGFPstop cultivadas em meio LIT contendo higromicina foi analisada em FACScan. \*O período de quatro semanas de seleção em higromicina não foi considerado. \*\* O valor representa a média de eventos, seguido do desvio padrão. O número entre parênteses indica a quantidade de repetições realizadas. \*\*\* A taxa de mutação foi calculada a partir do número provável de mutações, através do modelo descrito por Lea e Coulson (1949).

Dessa forma, obtivemos uma taxa média de mutação em CL Brener igual a  $5,6 \times 10^{-6}$ . É interessante notar que as taxas de mutação estimadas a partir das culturas de 15 e 60 dias foram muito semelhantes entre si.

#### 4.6. TRATAMENTO DAS CULTURAS TRANSFECTADAS COM $\text{CdCl}_2$ E $\text{H}_2\text{O}_2$

De posse de uma metodologia capaz de determinar diretamente a taxa de mutação em linhagens transfectadas, partimos para a investigação sobre os efeitos do cádmio na taxa de mutação em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Para tanto, tratamos as culturas de CL Brener transfectadas com o pROCKGFPstop e selecionadas em higromicina com  $3\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 15 e 60 dias. Além do cádmio, as células foram simultaneamente tratadas com  $50\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A água oxigenada causa lesões oxidativas no DNA, que são reparadas pelo MMR (Colussi *et al*, 2002; Mazurek *et al*, 2002). Dessa forma, a presença desta droga acentuaria os possíveis efeitos causados pelo cádmio de inibição do sistema de reparo de erros de pareamento. A concentração de  $50\mu\text{M}$  de água oxigenada foi escolhida por resultar em uma baixa taxa de mortalidade nas culturas (cerca de 20% de morte), independente da cepa, de acordo com estudo de sensibilidade realizado por Augusto-Pinto (2004).

Após o tratamento com cádmio e a água oxigenada, as culturas foram observadas em microscópio de fluorescência com filtro para FITC. Não foram observadas células emitindo fluorescência verde em nenhum dos tratamentos. As células foram então fixadas e submetidas à análise pelo aparelho FACS. O resultado da análise está esquematizado na tabela V. O número de células verdes nas populações transfectadas com *gfp* mutado, expostas a cádmio e peróxido de hidrogênio aumentou significativamente, tanto em CL Brener, quanto em Colombiana. O número de mutações foi estimado a partir do número de mutantes, segundo Lea e Coulson (1949), e utilizado para o cálculo da taxa de mutação.

A taxa de mutação em CL Brener na presença dos agentes mutagênicos foi estimada em  $8,3 \times 10^{-6}$ . Este valor consiste na média das taxas calculadas para os tratamentos de 15 e 60 dias. O tratamento com as drogas aumentou a taxa de mutação em cerca de 1,5 vezes em relação às células cultivadas na ausência das agentes mutagênicos.

Foi realizado o mesmo tratamento ( $3\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  e  $50\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em linhagens da cepa Colombiana transfectadas com o vetor contendo *gfp* mutado e selecionadas em higromicina. As células foram tratadas com as drogas por um período de 15 dias e

**Tabela V** – Mutação em células transfectadas tratadas com agentes genotóxicos.

<i>Cepa</i>	<i>Cultivo</i>	<i>Células verdes** em 1000 000</i>	<i>Taxa de mutação***</i>
CL Brener	Sem tratamento (2)*	300 ± 100	-
CL Brener pROCKGFPstop	3µM CdCl <sub>2</sub> + 50µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 dias (2)	650 ± 500	8,64 x 10 <sup>-6</sup>
	Sem tratamento 15 dias (2)	500 ± 0	5,44 x 10 <sup>-6</sup>
	3µM CdCl <sub>2</sub> + 50µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 60 dias (3)	1900 ± 300	7,96 x 10 <sup>-6</sup>
	Sem tratamento 60 dias (3)	1400 ± 0	5,73 x 10 <sup>-6</sup>
Colombiana pROCKGFPstop	3µM CdCl <sub>2</sub> + 50µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 dias (3)	3700 ± 700	5,0 x 10 <sup>-5</sup>
	Sem tratamento 15 dias (2)	1600 ± 420	1,89 x 10 <sup>-5</sup>

Análise em aparelho FACScan da fluorescência de células transfectadas com *gfp<sup>-</sup>* e tratadas com cádmio e peróxido de hidrogênio. \*O número entre parênteses indica a quantidade de repetições. \*\*Foram consideradas verdes as células que apresentaram fluorescência FL1 maior que 10<sup>2</sup>. O número de mutantes verdes representa a média de experimentos independentes, seguido do desvio padrão. \* A taxa de mutação foi calculada a partir do número médio de mutantes de acordo com o modelo descrito por Lea e Coulson (1949).

submetidas aos mesmos procedimentos de análise de fluorescência realizados com CL Brener. De maneira semelhante, não foram visualizadas células fluorescentes verdes nas culturas de Colombiana tratadas através da observação em microscópio de fluorescência. Em relação à análise feita através do FACS da emissão de fluorescência pelas células fixadas, foram detectadas várias células emitindo luz na faixa determinada como verde ( $FL1 > 10^2$ ). Apesar de não possuímos o padrão de fluorescência da cepa Colombiana selvagem, não transfectada, calculamos as taxas de mutação a partir dos dados iniciais de aquisição de células transfectadas. Observamos um aumento de cerca de 2,6 vezes na taxa de mutação das células tratadas com cádmio e água oxigenada, em relação às culturas não tratadas.

Assim, de acordo com nossos dados, o tratamento com os agentes mutagênicos aumentou a taxa de mutação nas linhagens transfectadas em uma proporção detectável através da metodologia desenvolvida neste trabalho. Não sabemos, no entanto, se este aumento é devido ao efeito do cádmio sobre o MMR ou do efeito da água oxigenada sobre a estabilidade genômica, ou um conjunto dos dois efeitos.

#### **4.7. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA DE TcMSH2 POR CÁDMIO**

Através da análise de reversão de uma mutação presente no gene *gfp*, verificamos que o cádmio, na presença de água oxigenada, foi capaz de aumentar a taxa de mutação em linhagens transfectadas das cepas CL Brener e Colombiana. Este resultado, juntamente com os dados preliminares obtidos por Augusto-Pinto (2004) apresentados anteriormente, sugere que o cádmio realmente atue como inibidor do sistema de reparo de erros de pareamento em *T. cruzi*. Para investigarmos de maneira mais direta o efeito do cádmio sobre o MMR em *T. cruzi*, estudamos o efeito do cádmio sobre a atividade ATPásica das proteínas recombinantes TcMSH2 de CL Brener e Colombiana. Conforme discutido anteriormente, a proteína MSH2 é um dos principais componentes do MMR em eucariotos (revisado por Nakagawa *et al*, 1999). As proteínas TcMSH2 recombinantes obtidas em fusão com a proteína de ligação à maltose (MBP) eram derivadas das cepas CL Brener e Colombiana. Essas proteínas (gentilmente cedidas por Alice Machado Silva) foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. A atividade ATPásica

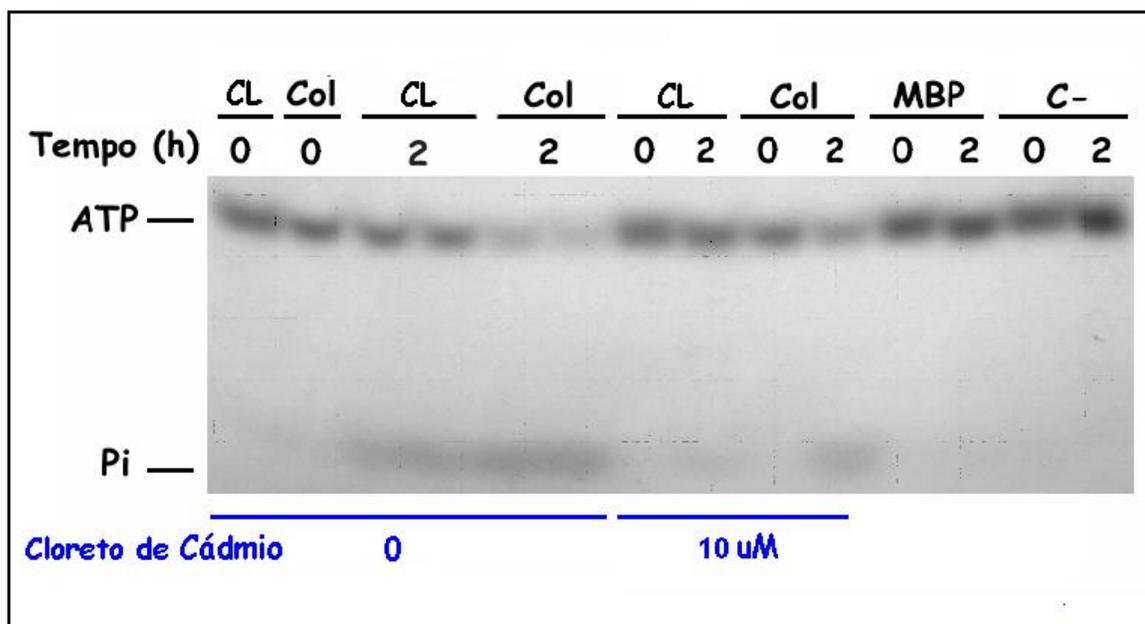
das proteínas foi testada na presença de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . O ensaio de atividade consistiu na incubação das proteínas purificadas com ATP marcado radiativamente em seu fosfato gama, por duas horas a 37°C, na presença de tampão de ATPase e 10  $\mu\text{M}$  de cádmio. O produto da reação foi corrido em gel de poliacrilamida e exposto a um filme radiológico. Na figura 11, a clivagem do ATP pode ser observada pela diminuição da intensidade da banda correspondente ao ATP no gel e aumento da intensidade da banda correspondente ao fosfato gama. O resultado foi comparado à atividade de TcMSH2 na ausência de  $\text{CdCl}_2$ . Conforme pode ser observado na figura, a presença de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  diminuiu a atividade ATPásica da proteínas recombinantes TcMSH2 de CL Brener e Colombiana. Como controle, o ATP foi incubado com a proteína MBP para certificarmos que a clivagem não era devido a MBP. O ATP também foi incubado na ausência de proteínas, para excluirmos a possibilidade de degradação.

Este resultando indica que o cádmio inibe diretamente o MMR de *T. cruzi*, através da inibição parcial da atividade ATPásica de TcMSH2.

#### **4.8. EFEITOS DO CÁDMIO E ÁGUA OXIGENADA SOBRE SEQUÊNCIAS NO GENOMA DE *T. cruzi***

Foi observado que o tratamento com cádmio e água oxigenada foi capaz de aumentar a taxa de mutação em células transfectadas de *T. cruzi*. Além disso, verificamos que o cádmio diminui a atividade ATPásica da proteína recombinante TcMSH2, o que sugere que este metal atue como inibidor específico do MMR em *T. cruzi*, assim como em leveduras. Decidimos então investigar se marcadores de variabilidade em *T. cruzi* descritos na literatura seriam capazes de detectar a instabilidade genômica gerada em *T. cruzi* pela exposição a estes agentes mutagênicos. Os marcadores genéticos de instabilidade utilizados neste trabalho foram: (i) o gene multicópia *TcRbp48* e (ii) regiões de microssatélites.

O gene *TcRbp48* codifica para uma proteína antigênica de ligação a RNA (DaRocha *et al*, 2002), altamente variável em cepas de *T. cruzi*, especialmente em cepas do grupo II e cepas híbridas (Cerqueira, 2004). A alta variabilidade de antígenos de parasitas é um dos mecanismos de escape ao sistema imunológico do hospedeiro (DiNoia *et al*, 1998; Zambrano-Villa *et al*, 2002)). Os microssatélites são regiões repetitivas no DNA presentes no genoma de eucariotos. Regiões de microssatélites em *Trypanosoma cruzi* foram descritas



**Figura 11 – Atividade ATPásica de TcMsh2 recombinante na presença de cádmio.** Autoradiografia do gel de poliacrilamida 20% mostrando ATP antes (0h) e depois (2h) da incubação com proteínas recombinantes TcMsh2 de Colombiana ou CL Brener em fusão com MBP, na presença ou ausência de 10 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. A proteína MBP foi utilizada como controle. *Col*: TcMsh2 de Colombiana; *CL*: TcMsh2 de CL Brener; *C -*: controle sem proteína; *Pi*: fosfato gama.

por Oliveira et al, (1998) e Pimenta, (2002). As taxas de mutação nesses locos são bastante altas porque as repetições de nucleotídeos provocam derrapagem da DNA polimerase sobre a região, durante a replicação (Schlotterer e Tautz, 1992), formando alças de DNA não pareado que, se não corrigidas pelo sistema de reparo de DNA (Kunkel, 1993), resultam no ganho ou perda de uma unidade repetitiva, fenômeno denominado instabilidade de microssatélites (ver figura 12).

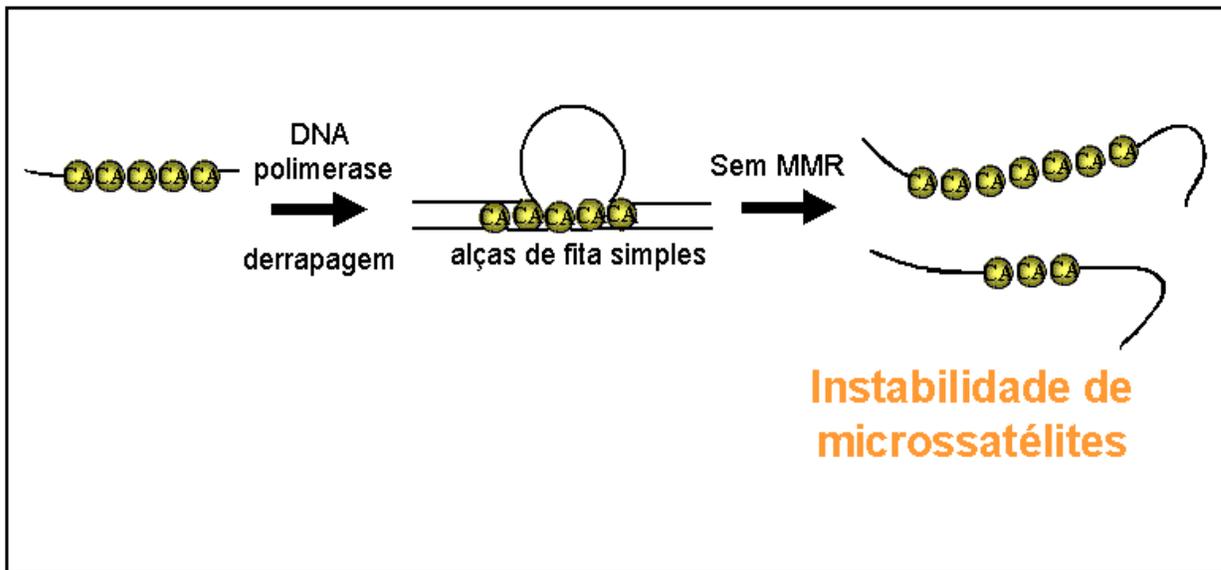
Para o estudo destes marcadores, culturas de epimastigotas de *T. cruzi* das cepas CL Brener, Colombiana e JG foram inicialmente tratadas com 3 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> e 50 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo. Os tratamentos realizados, assim como as respostas das diferentes cepas aos tratamentos, estão esquematizados na tabela VI. Pode-se observar a maior resistência da cepa JG ao tratamento com cádmio, conforme discutido anteriormente. Por outro lado, todas as cepas se mostraram igualmente sensíveis ao tratamento com 50 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após o tratamento, o DNA das culturas foi extraído para a realização das análises de instabilidade genômica.

#### **4.8.1 BUSCA POR INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES**

Foram amplificados onze locos de regiões de microssatélites descritas em *Trypanosoma cruzi* (locos AAT, TAC15, TAT, AAAT, MCLE01, MCL03, MCL05, MCL08, MCLF10, SCLE10 e SCLE11) (Oliveira *et al*, 1998, Pimenta, 2002) para análise de instabilidade, a partir do DNA genômico extraído de culturas de epimastigotas das cepas JG, CL Brener e Colombiana, submetidas aos vários tratamentos com cádmio e/ou água oxigenada já descritos.

Os onze locos foram amplificados com iniciadores fluorescentes e os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante no seqüenciador automático de DNA (A.L.F.). Os cromatogramas gerados foram analisados através do programa “Allelink”. Não foi detectada instabilidade de microssatélites em nenhum dos locos analisados, em nenhuma das três cepas, submetidas aos tratamentos com os agentes mutagênicos cádmio e água oxigenada.

Augusto-Pinto *et al* (2003) verificaram instabilidade no loco MCLE01 em linhagens das cepas JG e CL Brener (*T. cruzi* II) tratadas com 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cinco dias. Não verificamos, no entanto, instabilidade neste loco, como pode ser observado nas figuras 13,

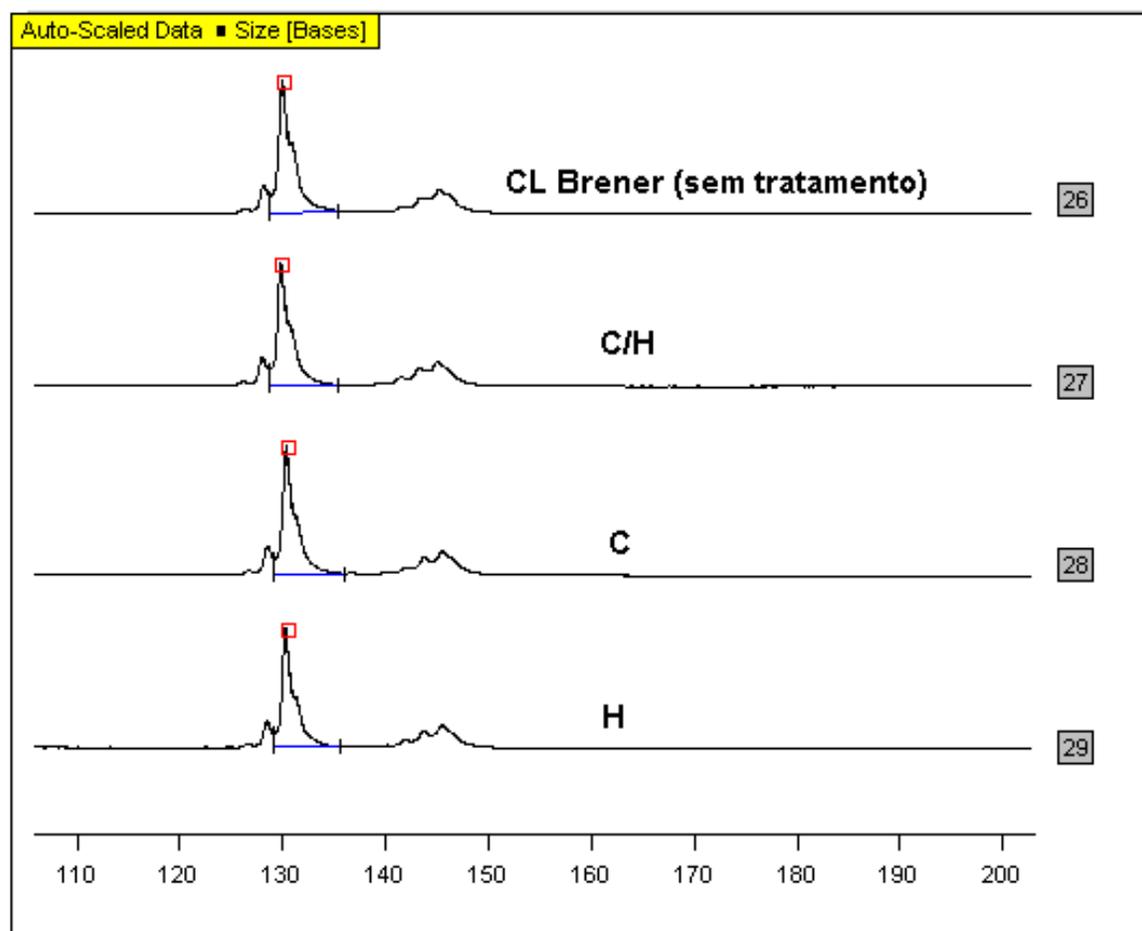


**Figura 12 – Instabilidade de regiões de microssatélites.** As repetições de pequenas seqüências de nucleotídeos podem provocar a formação de alças de fita simples durante a replicação, devido à derrapagem da DNA polimerase em regiões repetitivas. Estas alças são geralmente reparadas pelo sistema de reparo de erros de pareamento. Caso contrário, resultam na geração de alelos de tamanho maior ou menor que o alelo original, fenômeno conhecido como instabilidade de microssatélites.

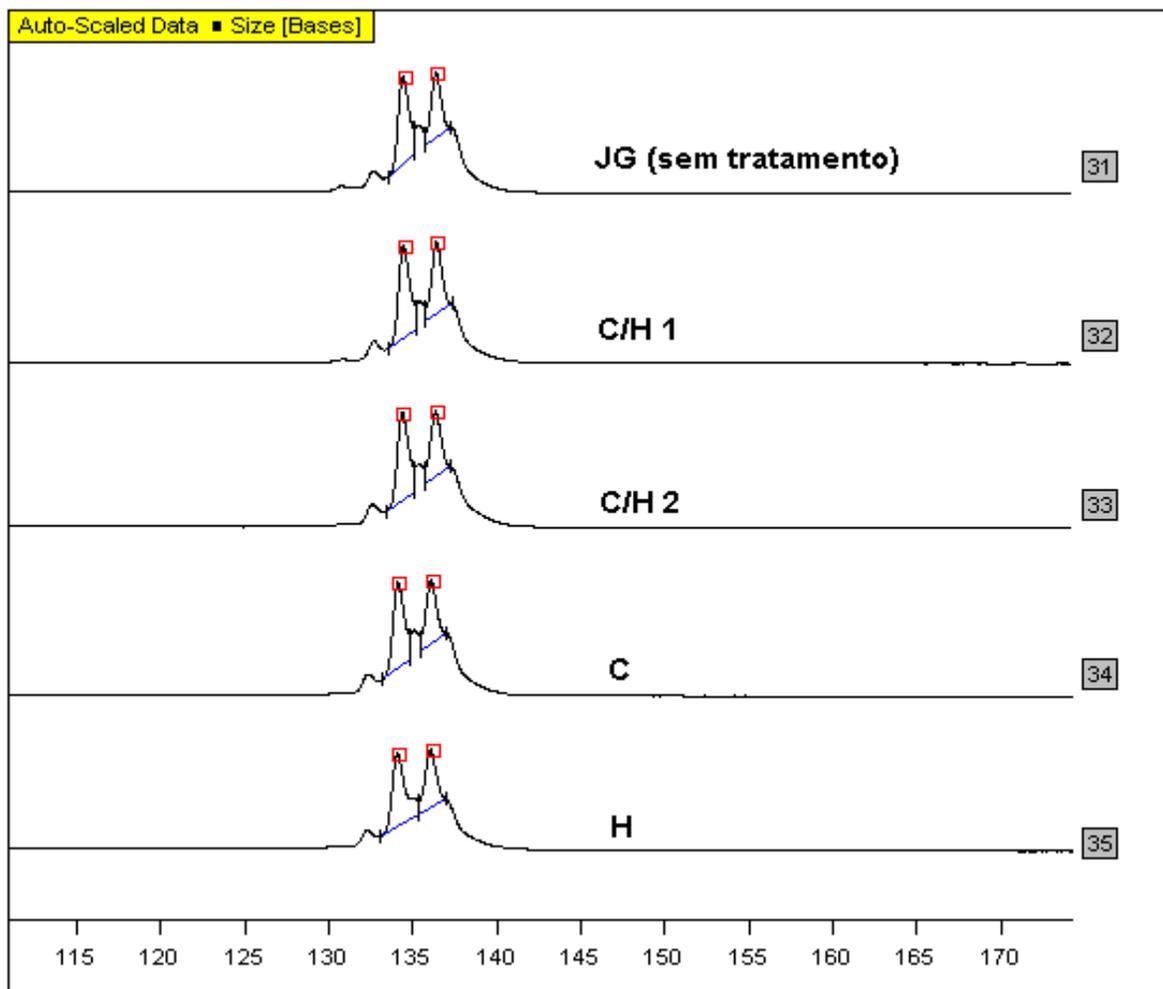
**Tabela VI** – Resposta relativa, em termos de sobrevivência, das cepas JG, Colombiana e CL Brener aos tratamentos a que foram submetidas.

<i>Tratamento</i>	<i>JG</i>	<i>Colombiana</i>	<i>CL Brener</i>
3 $\mu\text{M}$ de $\text{CdCl}_2$ (60 dias)	++++	++	++
50 $\mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ (60 dias)	++	++	++
3 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ + 50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ (30 dias, tratamento simultâneo)	+++	+	+
3 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ (30 dias) + 50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ (5dias)	++++	++	-

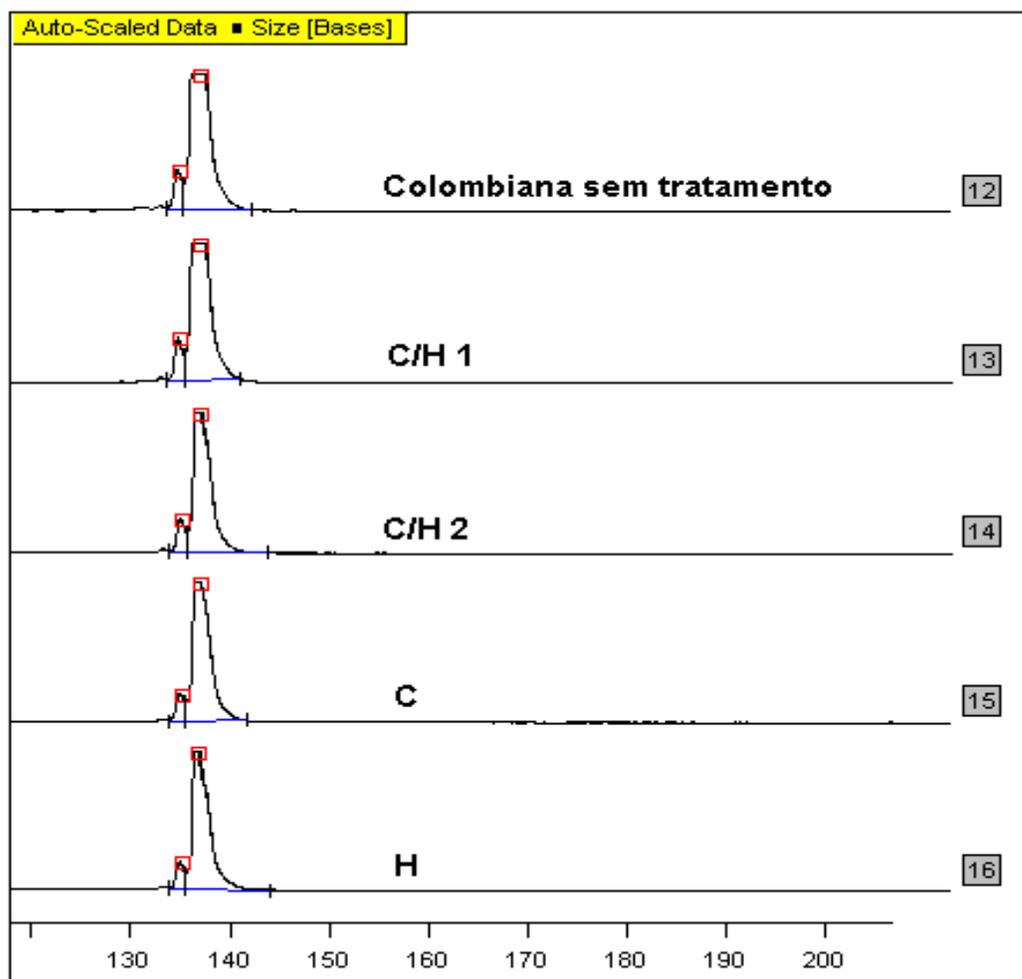
As cepas foram tratadas com 3  $\mu\text{M}$  de cádmio e 50  $\mu\text{M}$  de água oxigenada por diferentes períodos de tempo. O símbolo (+) representa crescimento relativo e o símbolo (-) representa morte celular.



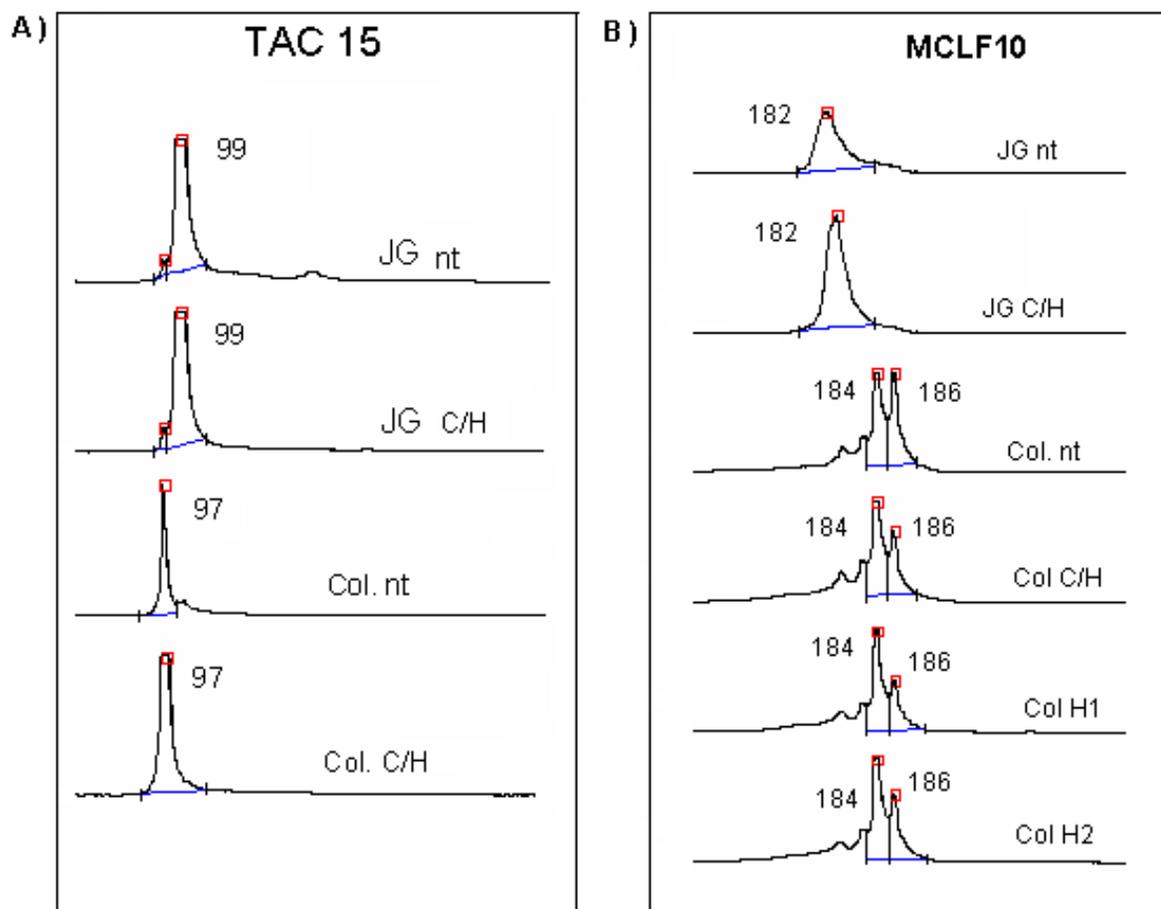
**Figura 13 – MCLE01 em CL Brener.** Eletrofluorograma obtidos através do seqüenciador automático de DNA (ALF) mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do loco de microsatélite MCLE01, a partir do genoma de CL Brener submetida ou não a tratamento. A escala numerada corresponde ao tamanho dos picos em pares de bases. (C/H): CL Brener tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 dias; (C): CL Brener tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 60 dias; (H): CL Brener tratada com  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 60 dias.



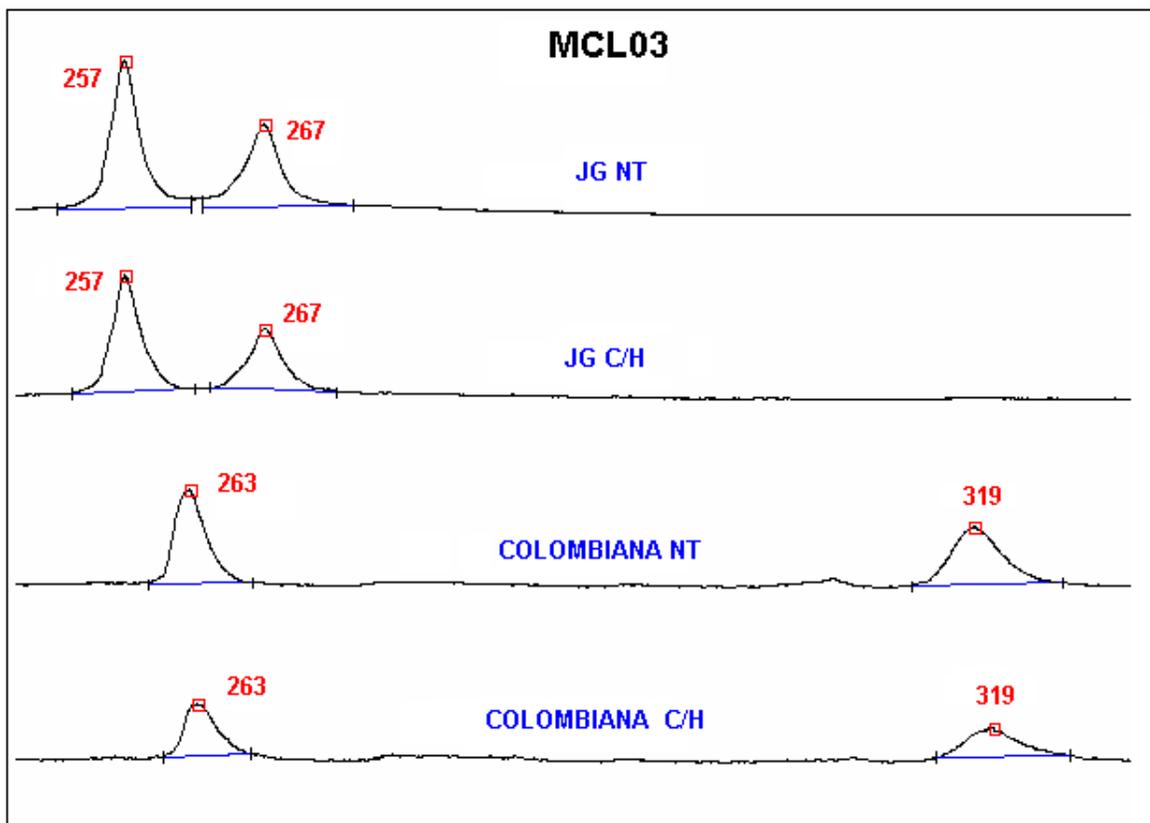
**Figura 14 – MCLE01 em JG.** Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do loco de microsatélite MCLE01, a partir do genoma de JG submetida ou não a tratamento. A escala numerada corresponde ao tamanho dos fragmentos em pares de bases. (C/H 1): JG tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 30 dias e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 dias; (C/H 2): CL Brener tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 dias; (C): JG tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 60 dias; (H): JG tratada com  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 60 dias.



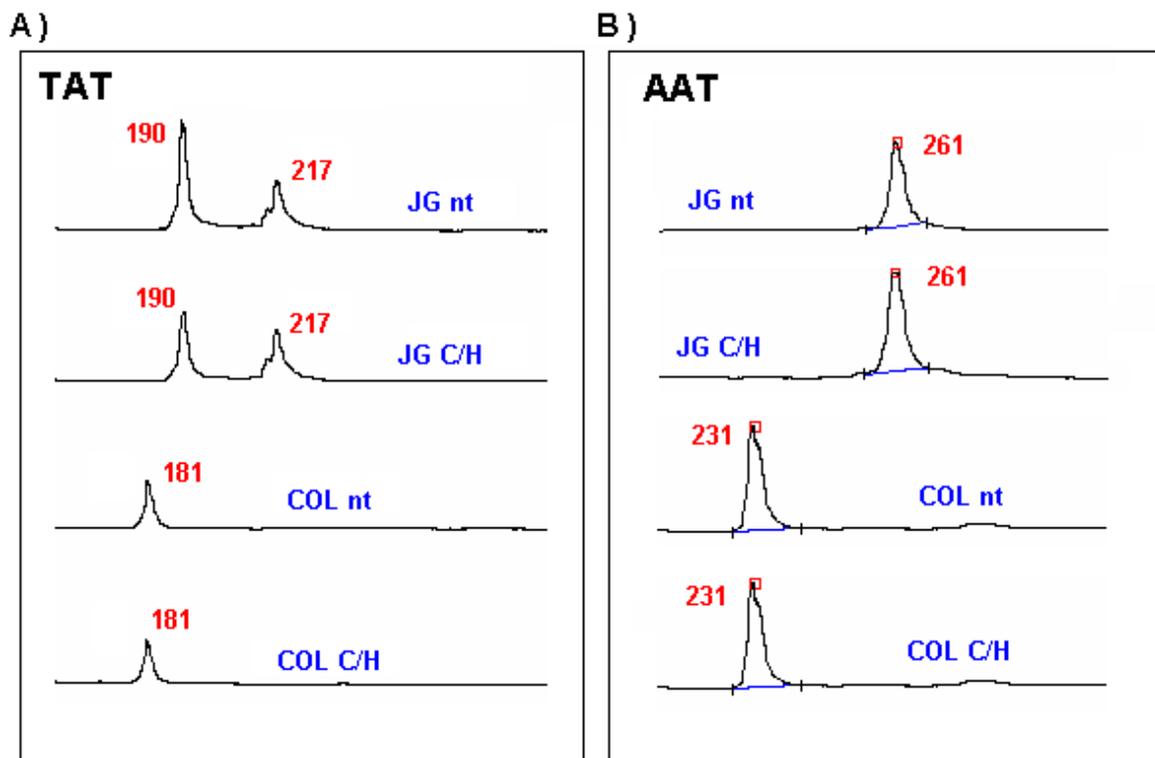
**Figura 15 – MCLE01 em Colombiana.** Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do loco de microsatélite MCLE01, a partir do genoma de Colombiana submetida ou não a tratamento. A escala numerada corresponde ao tamanho dos fragmentos em pares de bases. (C/H 1): Colombiana tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 30 dias e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 dias; (C/H 2): Colombiana tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 dias; (C): Colombiana tratada com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 60 dias; (H): Colombiana tratada com  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 60 dias.



**Figura 16 – TAC15 e MCLF10 em JG e Colombiana.** Eletrofluorogramas contendo os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos locos de microssatélite TAC 15 (A) e MCLF10 (B), a partir do genoma de Colombiana e JG, submetidas ou não a tratamento. Os números correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). *Col*: Colombiana, *NT*: sem tratamento, *C/H*: tratamento com 3 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> por 30 dias e 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 dias; *H1*: tratamento com 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 dias; *H2*: tratamento com 60 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 dias.



**Figura 17 – MCL03 em Colombiana e JG.** Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR do loco de microssatélite MCL03, a partir do genoma de Colombiana e JG submetidas ou não a tratamento. Os números em vermelho correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases. *NT*: sem tratamento, *C/H*: tratamento com  $3\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 30 dias e  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 dias;



**Figura 18 – TAT e AAT em Colombiana e JG.** Eletrofluorograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos fluorescentes amplificados por PCR dos locos de microssatélite TAT (A) e AAT (B), a partir do genoma de Colombiana e JG submetidas ou não a tratamento. Os números em vermelho correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases. *COL*: Colombiana; *NT*: sem tratamento, *C/H*: tratamento com 3  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  por 30 dias e 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 dias;

14 e 15, que mostram o perfil alélico deste loco em CL Brener, JG e Colombiana, respectivamente. As figuras seguintes (16, 17 e 18) mostram o perfil de alguns dos outros locos estudados.

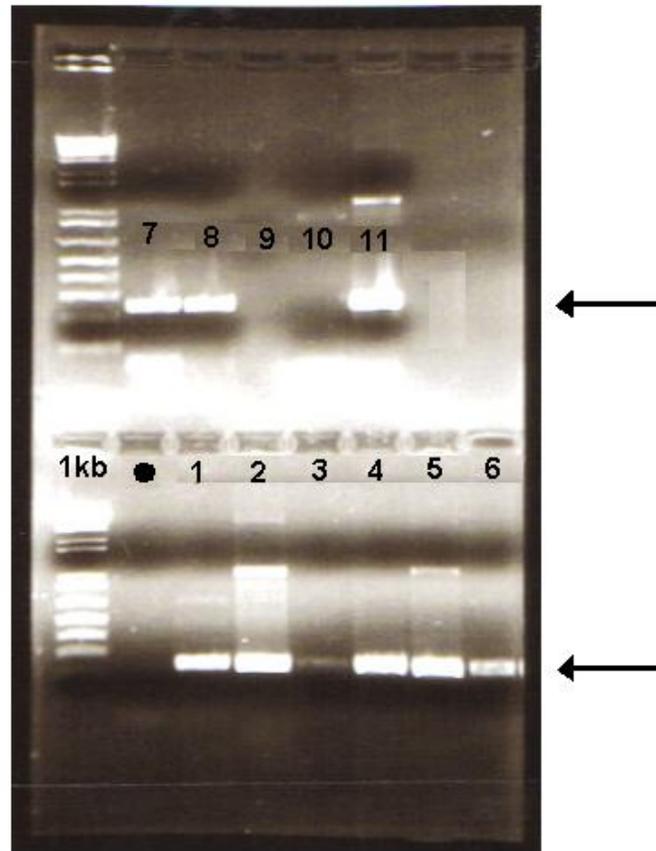
O resultado obtido através da análise de regiões de microssatélites indica que as concentrações de agentes mutagênicos utilizadas não foram capazes de gerar instabilidade genômica em níveis detectáveis por este marcador.

#### **4.8.2 ANÁLISE DO GENE RBP48 DA CEPA COLOMBIANA**

Para o estudo de variabilidade no antígeno TcRBP48, escolhemos a cepa Colombiana (*T. cruzi* I) porque estudos anteriores mostraram que esta cepa, assim como outras cepas do grupo I analisadas, apresentam uma baixa variabilidade na seqüência deste antígeno (Cerqueira *et al.*, 2004). Pretendíamos investigar, portanto, se o cádmio, na presença de água oxigenada, seria capaz de aumentar a variabilidade de TcRBP48 em Colombiana em níveis detectáveis pelo seqüenciamento de algumas dezenas de clones.

A partir do DNA genômico de uma cultura da Colombiana exposta a 3µM de CdCl<sub>2</sub> por 30 dias e 50µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cinco dias, foi amplificada uma região de aproximadamente 250pb do gene que codifica para o antígeno TcRBP48. O produto amplificado foi clonado no vetor pCR2.1 (Invitrogen), utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes. A eficiência de clonagem foi em torno de 80%, de acordo com análise feita por PCR de colônia (figura 19).

Noventa e seis colônias isoladas resultantes da transformação foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos purificados e seqüenciados automaticamente em ambas as direções. Foram obtidas as seqüências “forward” e “reverse” de 42 dos 96 clones seqüenciados. Estas foram alinhadas entre si e com a seqüência “consenso” de *TcRbp48* de Colombiana, obtida por Gustavo Cerqueira (2004) e analisadas quanto à presença de mutações em ponto. Foi encontrada apenas uma mutação de ponto dentre todos os clones analisados, indicando que a presença dos agentes mutagênicos cádmio e água oxigenada, não gerou instabilidade suficiente para ser detectada por este marcador. A figura 20 mostra o alinhamento e a mutação do tipo transição encontrada no clone B6 na posição 184.



**Figura 19 – PCR de colônia para *TcRBP48*.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando o produto de PCR de colônia com os iniciadores TcAg48F e TcAg4831. Os números de 1 a 11 correspondem a onze colônias isoladas escolhidas aleatoriamente e testadas. As setas indicam os fragmentos de tamanho esperado (250 pb). *1kb*: padrão de peso molecular (1kb plus DNA Ladder); ●: branco da reação.





# **DISCUSSÃO**



A variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* foi bastante estudada até o momento, sendo hoje bem reconhecida a sua alta variabilidade intra-específica (revisado por Macedo *et al*, 2004). Isolados de *T. cruzi* apresentam alta heterogeneidade de parâmetros biológicos como morfologia, tropismo tecidual, curso da infecção, susceptibilidade a quimioterápicos, dentre outros (revisado por Macedo e Pena, 1998; Macedo *et al*, 2001; Devera *et al*, 2003). Essa variabilidade representa o acúmulo de mutações ao longo de toda a evolução da espécie. Não sabemos, entretanto, a maneira como essa variabilidade é gerada. Acredita-se que o reparo de DNA, associado a altas taxas de mutação, esteja envolvido na geração dessa variabilidade (Augusto-Pinto, 2004). Augusto-Pinto *et al* (2003) obtiveram evidências indicando que cepas de *T. cruzi* pertencentes ao grupo II e cepas híbridas apresentam uma menor eficiência no sistema de reparo de erros de pareamento, em condições de estresse, em relação a cepas pertencentes ao grupo I. Essa diferença poderia estar correlacionada com diferenças na variabilidade genômica encontrada entre cepas pertencentes aos grupo *T. cruzi* I e II, o que, por sua vez poderia ser um dos fatores que contribuíram para a associação preferencial de cepas do grupo II com a doença de Chagas (Fernandes *et al*, 1998, 1999, Zingales *et al*, 1998). Como forma de investigar se a diferença na eficiência do MMR entre as diversas cepas de *T. cruzi* seria refletida nas taxas de mutação, iniciamos este projeto, tentando desenvolver uma metodologia que nos permitisse determinar diretamente a taxa de mutação em *T. cruzi*. Além disso, essa metodologia nos permitiria verificar o efeito de possíveis agentes mutagênicos sobre a taxa de mutação nas diferentes cepas deste parasita.

O cádmio foi o agente mutagênico selecionado para o estudo de mutação em *T. cruzi*, devido à descoberta recente de que este metal inibe especificamente o reparo de erros de pareamento em leveduras (Jin *et al*, 2003). Apesar de possuímos evidências indiretas indicando que esta inibição também acontece em *T. cruzi*, através dos estudos preliminares realizados por Augusto-Pinto (2004), a investigação acerca do efeito direto do cádmio sobre a taxa de mutação em *T. cruzi* não havia sido ainda descrita na literatura.

Não encontramos também, na literatura, qualquer metodologia descrita para análise de taxa de mutação em *T. cruzi*. Isso se deve ao fato de que esta espécie não cresce

adequadamente em meio de cultura sólido, o que dificulta o processo de seleção de mutantes. Técnicas de análise da taxa de mutação já foram descritas para vários organismos (revisado por Gatehouse, 1987; Gee *et al*, 1994; Josephy, 2000; Gollapudi e Krishna, 2000; Heddle *et al*, 2003). Em *Escherichia coli*, o ensaio de mutagênese “LacZ” (Cupples, 1989), baseia-se na reversão de mutações específicas no gene que codifica para a  $\beta$ -galactosidase, enzima que catalisa a hidrólise de lactose gerando glicose e galactose. As várias linhagens de *E. coli* LacZ<sup>-</sup> do sistema de Miller contém diferentes mutações que se revertem por um evento específico de transição, transversão ou “frameshift”. Portanto, este sistema pode ser utilizado para testar diretamente a especificidade da mutação. Os revertentes LacZ<sup>+</sup> são capazes de crescer em meio mínimo contendo lactose como fonte de carbono e assim podem ser selecionados e quantificados em meio sólido. Em *Salmonella typhimurium*, o ensaio de Ames (Gee, 1994) também é capaz de detectar e classificar mutações do tipo substituição simples de um par de bases. Cada linhagem de *S. typhimurium* apresenta uma única mutação no operon da histidina, sendo, portanto incapaz de crescer em um meio sem este aminoácido. Mutações específicas restauram o fenótipo selvagem e os mutantes crescem em meio seletivo formando colônias de fácil detecção. O mesmo princípio se aplica ao ensaio de mutagênese em *Saccharomyces cerevisiae* descrito por Hampsey (1991). As linhagens de leveduras descritas contêm mutações no gene *CYCI*, que codifica para uma unidade do citocromo C. As leveduras *CYCI*<sup>-</sup> não são capazes de crescer em meio contendo apenas fontes de carbono não fermentáveis. As mutações são revertidas por substituições específicas e os mutantes são selecionados em meio sólido seletivo.

Planejamos então uma metodologia para análise da taxa de mutação em *T. cruzi* baseada na reversão de uma mutação presente no gene *gfp* inserido no genoma do parasita. A proteína GFP de *Aequorea victoria* vem sendo amplamente utilizada como marcador no estudo de fenômenos celulares em vários eucariotos (Gerdes, 1996), incluindo *T. brucei* (Vaidya, 1997), *Leishmania* (Beverley, 1996) e *Plasmodium* (VanWye, 1997), graças à sua relativa facilidade de detecção visual e à sua natureza não invasiva. Esta proteína de 238 aminoácidos emite fluorescência verde após receber energia de uma fosfoproteína ativada por cálcio. Sua estrutura secundária é caracterizada por um cromóforo central, cercado por uma estrutura de  $\beta$ -barril. O cromóforo, formado pelos aminoácidos Ser<sup>65</sup>, Tyr<sup>66</sup> e Gly<sup>67</sup>, se

---

forma espontaneamente, através de modificações dos aminoácidos envolvidos (Cody, 1993).

A expressão de genes exógenos em *Trypanosoma cruzi* já é bem caracterizada (Teixeira, 1998; DaRocha, 2003). Esta espécie faz parte de um grupo que divergiu cedo na evolução dos eucariotos e apresenta características peculiares no mecanismo de controle da expressão gênica. A transcrição dos genes nos tripanosomatídeos, assim como nos procariotos, é policistrônica, na qual são gerados pré-mRNAs que serão processados no núcleo para formar mRNAs maduros monocistrônicos. São necessários dois eventos pós-transcricionais para a produção dos mRNA maduros: 1) a adição da cauda de poli-A à extremidade 3' do mRNA, 2) a adição de uma seqüência conservada de RNA denominada splice leader (SL) na extremidade 5' do mRNA, através de uma reação conhecida como trans-splicing. Esta reação é garantida por uma curta seqüência consenso de polipirimidinas presente na região intergênica que precede o sítio de adição de SL (Matthews *et al*, 1994). Um dinucleotídeo AG situado abaixo das polipirimidinas é utilizado como sítio acceptor da SL. A seqüência de splice leader é encontrada somente em tripanosomatídeos e em nematódeos, é idêntica em todos os mRNA de um mesmo organismo, porém difere para cada espécie (Zeng e Donelson, 1990). Os tripanosomatídeos, assim como procariotos, não possuem íntrons na grande maioria dos seus genes. O *T. cruzi* é capaz de expressar genes exógenos inseridos em seu genoma através de transfecção com vetores de expressão contendo uma região promotora, para assegurar o alto nível da transcrição, e regiões contendo sinais necessários ao processamento adequado do RNA mensageiro, como os sítios de poliadenilação e acceptor da seqüência SL.

O vetor de expressão em *T. cruzi* pROCKGFP, derivado do vetor pROCKAmaGFP, produzido e gentilmente cedido por Wanderson da Rocha (Da Rocha *et al.*, 2003), contém todos os componentes necessários a expressão de um gene exógeno em *T. cruzi*. A idéia de se utilizar o gene *gfp* deveu-se à facilidade de detecção de células expressando a proteína, que emitem uma fluorescência verde e podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência com o filtro adequado ou detectadas por um citômetro de fluxo (FACS). A proteína GFP clonada neste vetor apresenta uma modificação na seqüência de aminoácidos

de modo a otimizar a detecção de sua fluorescência pelo aparelho FACS e seu enovelamento (Cormack, 1996). No vetor linearizado com a enzima de restrição *Not I*, o gene *gfp*, assim como os elementos regulatórios, são flanqueados pelo gene da  $\beta$ -tubulina. Dessa forma, após a eletroporação das células com o vetor linearizado, espera-se que ocorra a integração do cassete no genoma do parasita, através de recombinação homóloga, em um loco do gene da  $\beta$ -tubulina. O fato de este gene apresentar mais de uma cópia no genoma de *T. cruzi* aumenta ainda mais as chances de integração.

O gene *gfp* foi mutado pela presença de um códon de terminação precoce em sua seqüência e a mutação confirmada por seqüenciamento. O gene mutado expressa uma proteína truncada, de 68 aminoácidos. Apesar de a proteína truncada conter os aminoácidos que formam o cromóforo, ela não emite fluorescência, pois o enovelamento correto e a emissão de fluorescência pelo cromóforo só ocorrem quando a proteína apresenta sua forma nativa (Ormo, 1996). Já foi demonstrado também que a perda de mais de sete aminoácidos do C-terminal de GFP leva à perda total de fluorescência (Dopf, 1996). A mutação consistiu na substituição de C por T na posição 230 da seqüência do gene. O códon CAA, que codificava para o aminoácido glutamina, foi então substituído pelo códon TAA, de terminação. A glutamina faz parte de uma hélice 310, que se forma após o cromóforo. Não sabemos se as possíveis mutações T $\rightarrow$  A ou T $\rightarrow$  G, que gerarão os códons AAA e GAA, que codificam para lisina e glutamato, respectivamente, serão capazes de gerar uma proteína funcional, ou seja, que emita fluorescência no comprimento de onda esperado, já que foi visto que alterações de aminoácidos que flanqueiam o cromóforo podem resultar em perda ou ganho de fluorescência (Cormack, 1996). Para analisarmos esta questão, a população de possíveis células mutantes revertentes detectada pelo FACS deve ser enriquecida, através da seleção (ou “cell sorting”) das células que emitem fluorescência dentro da faixa estipulada. De posse dessa população enriquecida de células que sofreram mutação em *gfp*, realizaremos reações de PCR para amplificar e sequenciar o gene de *gfp* para verificar quais foram as mutações.

As células foram transfectadas com os vetores pROCKGFP e pROCKGFPstop e selecionadas após um período de cultivo na presença do antibiótico Higromicina B. O

---

período de seleção das células de Colombiana transfectadas foi o dobro do verificado em CL Brener. Acreditamos que essa seleção lenta possa ser devida a uma baixa eficiência de transfecção aliada a uma maior resistência de Colombiana ao antibiótico Higromicina. A ausência de células verdes nas culturas selecionadas transfectadas com pROCKGFP nos levou a verificar se o gene *gfp* estava presente no genoma das células transfectadas com este vetor. A reação de PCR, feita a partir do DNA total dos parasitas, mostrou que não houve a integração esperada do gene de *gfp*. É importante que tenhamos células expressando o gene *gfp* selvagem, que sirva de controle aos nossos experimentos com a proteína GFP mutada. Portanto, novos experimentos de transfecção com o gene *gfp* selvagem estão sendo conduzidos.

Os resultados da amplificação com iniciadores específicos sugerem que o gene *gfp* mutado foi integrado ao genoma das células transfectadas. No entanto, existe a possibilidade de o plasmídeo estar sendo mantido no parasita na forma episomal. Caso tenha ocorrido a integração, não podemos ainda afirmar se esta ocorreu no local esperado, isto é, no loco de  $\beta$  tubulina. Para verificar se o local de integração corresponde ao loco de tubulina pretendemos fazer uma hibridização com sondas específicas para *gfp* e tubulina do DNA dos transfectantes separado em bandas cromossômicas por eletroforese em campo pulsátil (PFGE). A realização deste experimento já está em andamento. Obtivemos a separação das bandas cromossômicas das células transfectadas e transferimos o material para uma membrana filtro de nylon, no entanto, ainda não realizamos a hibridação com as sondas radioativas. Além disso, experimentos de Northern blot para verificar a expressão do mRNA de *gfp* nos parasitas transfectados deverão ser também realizados.

Foram realizados experimentos com as cepas transfectadas com o gene *gfp* mutado visando determinar diretamente a taxa de mutação nestas linhagens. A análise no FACS de linhagens transfectadas da cepa CL Brener, indicou que o número de células que emitem fluorescência verde aumenta com o tempo de cultivo. A partir de número de possíveis mutantes detectados pelo FACS, calculamos a taxa de mutação, baseando-se no modelo de Lea e Coulson (1949). Vale destacar que o número de células emitindo fluorescência verde detectadas pelo FACS representa o número de mutantes na cultura, e não necessariamente o

---

número de mutações. O conjunto de células mutantes inclui aquelas que originalmente sofreram mutação e as células resultantes da divisão de outras que sofreram mutação anteriormente. Lea e Coulson descreveram uma maneira de se estimar a quantidade de mutações ocorridas em uma cultura a partir do número de mutantes observado. Dessa forma, determinamos a taxa de mutação em CL Brener como sendo de 5,6 mutações a cada  $10^6$  nucleotídeos. Essa taxa de mutação não apresentou variações significativas nas linhagens transfectadas de CL Brener cultivadas por períodos de tempo diferentes, o que reforça a credibilidade dos nossos dados. Mesmo nas culturas de CL Brener selvagem analisadas, foram detectadas células emitindo fluorescência dentro da faixa definida como “verde”, o que já era esperado, visto que epimastigotas de *T. cruzi* apresentam auto-fluorescência. Outros pesquisadores já haviam relatado a existência do fenômeno de auto-fluorescência (DaRocha et al, 2003). No entanto, tentaremos diminuir este ruído, através de otimização das condições elétricas utilizadas na aquisição das células. Os dados preliminares da análise no FACS de linhagens transfectadas da cepa Colombiana cultivadas por 15 dias em meio LIT contendo higromicina B, também nos permitiu estimar a taxa de mutação desta cepa em 1,9 mutações a cada  $10^5$  nucleotídeos. O valor estimado da taxa de mutação em Colombiana foi maior do que o valor obtido para a cepa CL Brener, o que é um resultado inesperado, visto que Augusto-Pinto e cols. (2003) obtiveram evidências que indicam que a cepa Colombiana apresenta um MMR mais eficiente que CL Brener. Entretanto, vale ressaltar que não foi analisada no FACS uma população de Colombiana selvagem, de modo que ainda não sabemos o quanto de ruído (ou auto-fluorescência) está sendo erroneamente considerado como “mutação” em nossos cálculos, o que poderia estar tornando a taxa calculada por nós maior que a taxa real. Agora que temos as duas linhagens (derivadas das cepas Colombiana e CL Brener) com as transfecções estáveis do gene *gfp* mutado, pretendemos também realizar os experimentos de taxa de mutação com um número maior de réplicas. Somente após esses experimentos poderemos determinar com maior segurança os valores da taxa de mutação em cada uma das cepas. É interessante observar que os valores por nós obtidos estão bem acima dos valores de taxa de mutação descritos para outros organismos que variam desde 1 mutação a cada  $10^7$  nucleotídeos a 1 mutação a cada  $10^9$  nucleotídeos (revisado por Ellegren *et al*, 2003).

O sistema de análise de taxas de mutação desenvolvido neste trabalho nos permitiu ainda verificar, em diferentes cepas de *T. cruzi*, o efeito na taxa de mutação, da exposição de epimastigotas a agentes mutagênicos. Observamos que o tratamento simultâneo de linhagens transfectadas das cepas CL Brener e Colombiana com cádmio e água oxigenada aumentou a taxa de mutação em ambas as cepas. Não sabemos se este aumento deve-se a presença de apenas uma das drogas ou se ambas são necessárias para o aumento da mutagênese. Para esclarecer esta questão pretendemos realizar no futuro tratamentos com as drogas separadamente. Entretanto, independente de qual droga tenha causado o aumento da taxa de mutação, fica evidenciado o grande potencial da metodologia por nós elaborada, pois ela apresenta alta sensibilidade, além de fornecer dados consistentes com o tempo de cultivo e exposição a agentes mutagênicos.

Após a observação dos resultados que indicam que o cádmio, na presença de água oxigenada, pode gerar um aumento nas taxas de mutação de CL Brener e Colombiana, foi realizado um ensaio na presença de cádmio com a proteína recombinante purificada TcMSH2. Duas isoformas de TcMSH2 foram obtidas através da clonagem dos genes TcMSH2 derivado do genoma das cepas CL Brener e Colombiana, em fusão com MBP (Machado-Silva, dados não publicados), as quais foram gentilmente cedidas por Alice Machado Silva, para investigarmos o efeito desse metal sobre a atividade de TcMSH2. A proteína MSH2 é a principal componente do MMR em eucariotos, formando heterocomplexos com outras proteínas do MMR, apresentando propriedades funcionais específicas (revisado por Nakagawa *et al*, 1999). A proteína MSH2 apresenta atividade ATPásica, possivelmente envolvida no processo de reconhecimento de erros de pareamento (Selmane *et al*, 2003). Testamos a atividade ATPásica de TcMSH2 na presença de 10  $\mu\text{M}$  de cloreto de cádmio e verificamos que o cádmio foi capaz de inibir parcialmente essa atividade. Clark e Kunkel (2004) relataram recentemente a inibição por cádmio (na concentração de 50 $\mu\text{M}$ ) da atividade ATPásica do complexo MutS $\alpha$ , formado pelas proteínas MSH2 e MSH6 de levedura. Por meio de estudos cinéticos os autores verificaram que o cádmio aumenta o  $K_m$  da enzima e diminui o  $K_{cat}$ , o provoca uma redução de seis vezes na eficiência catalítica. Esta inibição poderia estar ocorrendo por competição do íon  $\text{Cd}^{+2}$  com o íon  $\text{Mg}^{+2}$  pela ligação ao sítio ativo da enzima, ligação essa necessária à

hidrólise do ATP. Através de mutações que impediam a ligação de cada uma das proteínas (MSH2 ou MSH6) ao ATP, estes autores verificaram que somente a mutação em Msh6 impediu o efeito inibitório do cádmio, indicando que esta proteína estaria sendo inibida por cádmio, e não MSH2, o que difere do nosso resultado. Com base nesses dados, Clark e Kunkel (2004) sugerem uma interação seletiva do cádmio com MSH6. Vale ressaltar entretanto que resíduos da proteína MSH2 contribuem para a formação do sítio de ligação a ATP de MSH6. Dessa forma, a atividade ATPásica de MSH6 poderia estar sendo inibida também por interações do cádmio com MSH2.

Os nossos dados, obtidos através do estudo de taxas de mutação, utilizando sistema de reversão em *gfp*, e do ensaio de atividade ATPásica da proteína recombinante TcMSH2, apesar de ainda preliminares, indicam que o cádmio inibe o MMR em *T. cruzi*, promovendo instabilidade genética. Decidimos então investigar a instabilidade genômica gerada pelo cádmio nas cepas de JG, CL Brener e Colombiana, através do estudo de marcadores genéticos utilizados no estudo de variabilidade em *Trypanosoma*: o gene *TcRBP48* e regiões de microssatélites. Para isso, as cepas foram tratadas com cloreto de cádmio na presença ou ausência de água oxigenada por diferentes períodos de tempo. A água oxigenada provoca no DNA uma lesão oxidativa altamente mutagênica, a 8-oxoguanina (8-oxo-dG). Essa guanina modificada é capaz de se parear a adenina (A) e, caso não seja reparada antes de uma etapa de replicação, gera a mutação GC → TA, do tipo transversão.

O tratamento de linhagens das cepas JG, CL Brener e Colombiana de *Trypanosoma cruzi* com 3μM de cádmio mostrou um comportamento diferente das cepas em resposta a presença de cádmio no meio de cultura por um longo período de tempo (algumas semanas). A cepa JG apresentou maior resistência ao tratamento, enquanto as cepas CL Brener e Colombiana tiveram uma morte mais acentuada na presença deste agente mutagênico. Essa diferença na sobrevivência não foi observada em tratamentos em curto prazo realizados por nós e não foi devido a uma seleção de células JG naturalmente resistentes ao cádmio presentes na cultura. Ainda não sabemos como explicar a maior resistência de JG à exposição prolongada ao cádmio. Uma das hipóteses possíveis seria devido a um menor acúmulo de cádmio, ao longo do tratamento, em células JG, quando comparado ao acúmulo

em CL Brener e Colombiana. Isso poderia ser explicado por um maior bombardeamento de cádmio para fora da célula por parte de JG. O mecanismo de entrada de cádmio nas células varia de acordo com o organismo. Em geral, os principais mecanismos de entrada desse metal são difusão facilitada e transporte ativo. O raio iônico do íon  $\text{Cd}^{+2}$  é bastante semelhante ao raio de  $\text{Ca}^{+2}$ , e já foi descrita a entrada de cádmio por canais de cálcio em vários tipos de células (Braeckman et al, 1999). Dentre os sistemas de defesa das células contra o cádmio destaca-se a síntese de proteínas como metalotioneínas (Hamer, 1986), que se ligam a metais pesados e proteínas de choque térmico (Beyersmann e Hechtenberg, 1997). Não sabemos se a entrada de cádmio é menos eficiente em JG. Talvez estas células apresentem, por exemplo, um número menor de canais de cálcio. Também é possível que a expressão de proteínas como resposta ao cádmio seja mais eficiente nesta cepa. É interessante notar que não houve diferença entre as cepas na sensibilidade à água oxigenada, durante o período estudado, o que demonstra que as drogas são metabolizadas de forma diferente dentro da célula.

O estudo de estabilidade genômica de JG, CL Brener e Colombiana após o tratamento com agentes mutagênicos, através da análise de microssatélites, mostrou que a exposição das cepas, por 30 ou 60 dias, a cloreto de cádmio e água oxigenada, nas doses selecionadas, não foi suficiente para gerar instabilidade nos microssatélites analisados. Regiões de microssatélites de *Trypanosoma cruzi* foram inicialmente descritas por Oliveira et al (1998). Os microssatélites são uma classe de DNA repetitivo disperso no genoma de todos os eucariotos. São caracterizados por repetições curtas (1 a 6 pares de bases), uma após a outra. As taxas de mutação nesses locos são significativamente maiores que a taxa de substituição de nucleotídeos, o que justifica sua utilização como marcadores genéticos no estudo de variabilidade. Esta alta taxa de mutação deve-se à derrapagem da polimerase sobre a região, durante a síntese de DNA, formando alças de DNA não pareado (Schlotterer e Tautz, 1992). A presença de alças não corrigidas pelo sistema de reparo resulta no ganho ou na perda de uma unidade repetitiva. Além disso, na maioria das vezes, os microssatélites encontram-se em regiões não expressas do genoma, o que os torna livres de pressão seletiva. Os microssatélites utilizados neste trabalho, contém repetições de 2, 3 ou 4 nucleotídeos. Procuramos variar o tamanho e o tipo das repetições, já que alguns autores

sugerem que a taxa de mutação de microssatélites pode variar dependendo do tamanho (Xu et al, 2000) e até mesmo do motivo da repetição (Bachtrog et al, 2000). Não foi observada instabilidade de microssatélites em nenhum dos onze locos aqui estudados. Para todos os locos a reação de amplificação e a corrida dos fragmentos fluorescentes no ALF foram repetidas uma ou duas vezes, para a confirmação do resultado. No loco MCLF10, cujo perfil está mostrado na figura 16, podemos perceber uma diminuição na intensidade do pico 186 pares de bases em Colombiana submetida a tratamentos com agentes mutagênicos. Essa diminuição poderia estar refletindo uma perda de heteroziguidade. No entanto, a diminuição também ocorreu em Colombiana não tratada, em uma das repetições do experimento (dado não mostrado). Isso se deve provavelmente à amplificação preferencial de um dos alelos pela DNA polimerase.

O gene *TcRPB48*, que codifica para uma proteína antigênica de ligação a RNA expressa em todas as formas do parasita, está presente em várias cópias no genoma de *T. cruzi*, (DaRocha et al, 2002). A variabilidade de antígenos vem sendo muito estudada em parasitas pois ela representa um mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro (DiNoia et al, 1998; Zambrano-Villa et al, 2002). Foi verificado em trabalhos anteriores (Da Rocha, 2003b; Cerqueira, 2004) que a variabilidade no antígeno TcRBP48 é maior em cepas do grupo II e cepas híbridas de *T. cruzi*, (representadas neste trabalho pelas cepas JG e CL Brener) respectivamente, quando comparadas com cepas do grupo *T. cruzi* I (representadas neste trabalho pela cepa Colombiana). As seqüências de *TcRBP48* em cepas do grupo II, quando analisadas, apresentaram um alto número de transições e transversões. No entanto, as 41 seqüências analisadas de *TcRbp48* derivadas do genoma da cepa Colombiana, além de outras duas cepas pertencentes ao *T.cruzi* I codificavam para uma mesma seqüência de aminoácidos, indicando uma baixa variabilidade deste antígenos nessas cepas (Cerqueira, 2004).

O tratamento de uma cultura da cepa Colombiana (*T. cruzi* I) com 3µM CdCl<sub>2</sub> e 50µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 dias não foi capaz de gerar instabilidade na seqüência de *TcRbp48*, conforme observado através do seqüenciamento de cerca de 40 clones de um fragmento do gene *TcRBP48*, amplificados a partir do genoma das células tratadas. Foi encontrada apenas

---

uma transição (T → C) nas seqüências obtidas por nós, na posição 184. Podemos concluir então que as doses de cádmio e água oxigenada utilizadas, assim como o período de tratamento, não foram suficientes para aumentar a variabilidade no gene *TcRBP48* de Colombiana, a um nível detectável através da técnica utilizada. O aumento do tempo de tratamento com as duas drogas simultaneamente, nos parece inviável, já que ocorre uma morte bastante acentuada das culturas de parasitas a partir da terceira semana de tratamento. O aumento da concentração de cloreto de cádmio também se mostrou ineficiente, já que a cultura da cepa Colombiana não resistiu a doses de 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> (dado não mostrado).

Neste trabalho, fomos capazes de estabelecer uma metodologia baseada em reversão de uma mutação em *gfp* que nos permitiu avaliar, de forma preliminar, a taxa de mutação em diferentes cepas de *T. cruzi*. Além disso, observamos que a exposição das cepas a agentes mutagênicos é capaz de alterar essa taxa de mutação. A sensibilidade da metodologia desenvolvida foi evidenciada pelo fato de que o mesmo tratamento não foi capaz de gerar alterações quando analisamos marcadores clássicos da variabilidade desse parasita. Para determinarmos com maior segurança o valor da taxa de mutação em cada uma das cepas, pretendemos realizar um número maior de aquisições no FACS de linhagens de CL Brener e Colombiana transfectadas com *gfp* mutado, além de ajustar as condições elétricas do aparelho durante as aquisições, de forma a reduzir o ruído do experimento. Além disso, é importante que tenhamos linhagens transfectadas com um vetor contendo o gene *gfp* selvagem para servirem de controle de expressão de GFP em nossos experimentos. A partir de então, estudos sobre mutação com diferentes agentes mutagênicos poderão ser realizados. Por fim, pretendemos transfectar outras cepas de *T. cruzi*, disponíveis em nossos laboratórios, como JG, Sílvia X-10 e Esmeraldo com o vetor contendo *gfp* mutado e realizar as análises de reversão da mutação, como forma de se estimar a taxa de mutação também nessas cepas.

# **PERSPECTIVAS**



## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar a análise em FACS de células transfectadas revertentes cultivadas em meio LIT, por períodos maiores de tempo, com um número maior de replicatas, capaz de validar o cálculo da taxa de mutação;
- Tratar células de JG, Colombiana e CL Brener com outros agentes genotóxicos e efetuar estudos de mutação.
- Verificar o local de inserção do gene *gfp* mutado nas células transfectadas de CL Brener e Colombiana, através de Southern blot de DNA separado em PFGE;
- Verificar a expressão do gene *gfp* mutado nas células transfectadas de CL Brener e Colombiana, através de Northern blot ou RT-PCR;
- Realizar o “sorting” das células que aparentemente apresentarem reversão do fenótipo mutante para a confirmação da reversão da mutação, através do seqüenciamento de *gfp*;
- Transfectar a cepa JG com o vetor pROCKGFPstop;
- Construir um novo vetor pROCKGFP;
- Transfectar JG, CL Brener e Colombiana com um vetor pROCKGFP;

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- ALANI E., LEE S., KANE M.F., GRIFFITH J., KOLODNER R.D. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes holliday junctions in DNA. *J Mol Biol* **265**: 289-301.
- ANDRADE L.O., MACHADO C.R., CHIARI, E. *et al.* (1999) Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* **100**:163-172
- ARAVIND L., WALKER D.R., KOONIN E.V. (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* **27**(23):4658-70
- AUGUSTO-PINTO A., BARTHOLOMEU D.C., TEIXEIRA S.M.R., PENA S.D.J., MACHADO C.R. (2001) Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from *Trypanosoma cruzi*. *Gene* **272**:323-33.
- AUGUSTO-PINTO A., TEIXEIRA S.M.R., PENA S.D.J., MACHADO C.R. (2003) Single-nucleotide polymorphisms of *TcMsh2* gene are associated with variation of mismatch repair efficiency in *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* **164**(1): 117-26.
- AUGUSTO-PINTO A. (2004) Geração de variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas: um modelo baseado no estudo do reparo de erros de pareamento do DNA. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- AYALA (1993) *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol Res.* **26**(1-2):47-63.
- BACHTROG D., AGIS M., IMHOF M., SCHLOTTERER C. (2000) Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs: evidence from *Drosophyla melanogaster*. *Mol Biol Evol* **17**(9):1277-85
- BEVERLEY, S.M. (1996) Hijacking the cell: parasites in the driver's seat. *Cell* **87**(5):787-789.
- BEYERSMANN D., HECHTENBERG S. (1997) Cadmium, gene regulation and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **21**:15-22.
- BOWERS J., TRAN P.T., JOSHI A., LISKAY R.M., ALANI E. (2001) MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp. *J Mol Biol* **306**(5):957-68.
- BRAECKMAN B., SMAGGHE G., BRUTSAERT N., CORNELIS R., RAES H. (1999). Cadmium uptake and defense mechanism in insect cells. *Env Res Sec* **80**:231-243
- BRISSE S., VERHOEF J., TIBAYRENC M. (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* **31**(11):1218-26.

- 
- BUSCAGLIA C.A., DiNOIA J.M. (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes and Infection* **5**:419-27.
- CAMARGO, P. A. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **6**: 93–100.
- CERQUEIRA G.; DaROCHA W. D.; TEIXEIRA S. M. R. (2004) Analysis of expressed sequence tags and antigenic sequences from *Trypanosoma cruzi* amastigotes. (Artigo completo submetido).
- CLARK A.B., KUNKEL T.A. (2004) Cadmium inhibits the functions of eukaryotic MutS complexes. *J Biol Chem.* 2004 **279**(52):53903-6.
- CODY. C.W., PRASHER D.C., WESTLER W.M., PRENDERGAST F.G., WARD W.W.(1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Biochemistry* **32**:1212-1218
- COLUSSI C., PARLANTI E., DEGAN P., AQUILINA G., BARNES D. *et al.* (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* **12**:912-918
- CORMACK B.P., VALDIVIA R.H., FALKOW S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein(GFP). *Gene* **173**:33-38
- CORPET F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16** (22):10881-90
- CUPPLES C.G., MILLER J.H. (1989) A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5345-5349.
- DaROCHA W.D., BARTHOLOMEU D.C., MACEDO C.D., HORTA M.F., CUNHANEITO E., DONELSON J.E., TEIXEIRA S.M. (2002) Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res* **88**(4): 292-300.
- DaROCHA W.D., SILVA R.A., BARTHOLOMEU D.C., PIRES S.F., FREITAS J.M., MACEDO C.D., VAZQUEZ M.P., LEVIN M.J., TEIXEIRA S.M. (2003) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* **92**:113-120
- DaROCHA W. D., CERQUEIRA G., TEIXEIRA S. M. R. (2003) Comparative studies of amastin gene sequence in different *Trypanosoma cruzi* strains. In: XXX ANUAL

- MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE, 2003, Caxambu. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **45**:160
- DEVERA R., FERNANDES O., COURA J.R.. (2003) Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**:1-12.
- DiNOIA J.M., I. D'ORSO L., ASLUND D.O., SANCHEZ, FRASCH A.C.C. (1998). The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J. Biol. Chem.* **273**: 10843-10850
- DOPF J., HORIAGAN T. (1996) Deletion mapping of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Gene* **173**:39-44
- ELLEGREN H., SMITH N.G., WEBSTER M.T. (2003) Mutation rate variation in the mammalian genome. *Curr Opin Genet Dev* **13**(6):562-568.
- FERNANDES O., STURM N.R., DERRE R., CAMPBELL D.A. (1998) The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **95**(1):129-33.
- FERNANDES O., MANGIA R.H., LISBOA C.V., PINHO A.P., MOREL C.M., ZINGALES B., CAMPBELL D.A., JANSEN A.M.. (1999) The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* **118**:161-6.
- FUJIEDA S., TANAKA N., SUNAGA H., NODA I., SUGIMOTO C., TSUZUKI H., SAITO H. (1998) Expression of hMSH2 correlates with in vitro chemosensitivity to CDDP cytotoxicity in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* **132**:37-44.
- GATEHOUSE D. (1987) Critical features of bacterial mutation assays. *Mutagenesis*. **2**:397-409.
- GEE P., MARON D.M., AMES B.N. (1994) Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:11606-11610
- GERDES H.H., KAETHR C. (1996) Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* **389**: 44-47.
- GOLLAPUDI B.B., KRISHNA G. (2000) Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutat Res* **455**:21-28.
- HAMER, D.H. (1986) Metallothionein. *Ann Rev Biochem* **55**:913-951

- HAMPSEY M. (1991) A tester system for detecting each of the six base-pair substitutions in *Saccharomyces cerevisiae* by selecting for an essential cysteine in iso-1-cytochrome- c. *Genetics*. **128**(1):59-67.
- HANAHAHAN D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4):557-80.
- HEDDLE J.A., MARTUS H.J., DOUGLAS G.R. (2003) Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen*. **41**:1-6.
- HSIEH P. (2001) Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res* **486**:71-87
- JIN Y.H., CLARK A.B., SLEBOS R.J., AL-REFAI H., TAYLOR J.A., KUNKEL T.A., RESNICK M.A., GORDENIN D.A. (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* **34**(3):326-329
- JIRICNY J, MARRA G. (2003) DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* **13**:61-69.
- JOSEPHY P. D. (2000) The *Escherichia coli* lacZ reversion mutagenicity assay. *Mutat Res* **455**:71-80.
- KOLODNER R.D., MARSISCHKY G.T. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9**:89-96.
- KORNBERG A., BARKER T. (1991) DNA replication. *W. H. Freeman i Co.*, New York.
- KUNKEL TA. (1993) Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature* **365**:207-8.
- LAMBRECHT F.L. (1965) Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **7**:346-352,
- LEA D.E., COULSON C.A. (1949) The distribution of numbers of mutants in bacterial population. *J Genet* **49**:264-285
- LeCLERC J.E., LI B., PAYNE W.L., CEBULA T.A. (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella pathogens*. *Science* **274**:1208-1211
- LÜTZEN A., LIBERTI S.E., RASMUSSEN L.J. (2004) Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo. *Biochem Biophys Res*. **321**:21-25.
- MACEDO A.M., PENA S.D.J. (1998) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implication for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today*; **14**: 119-123.

- 
- MACEDO A.M., ZINGALES B., PENA S.D., OLIVEIRA R.P. *et al.* (2001) Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**:407-413.
- MACEDO A.M., MACADO C.R., OLIVEIRA R.P., PENA S.D. (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* In press.
- MACHADO C.A., AYALA F.J. (2002) Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **121**:33-47.
- MACHADO-SILVA A., Reparo de erros de pareamento e variabilidade genética em *Trypanosoma cruzi*. (2003) Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- MARRA G., SCHAR P. (1999) Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J*. **338**:1-13
- MATTHEWS K.R., TSCHUDI C., ULLU E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*. **8**:491-501.
- MAZUREK A., BERARDINI M., FISHEL R. (2002) Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J Biol Chem* **277**:8260-8266.
- MILES M.A., TOYE P.J., OSWALD S.C., GODFREY D.G. (1977) The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **71**:217-225
- MOREL C., CHIARI E., CAMARGO E.P., MATTEI D.M., ROMANHA A.J., SIMPSON L. (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:6810-6814
- NAKAGAWA T., ABHIJIT D., KOLODNER R.D. (1999) Multiple functions of MutS and MutL related heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci* **96**:14186-88.
- OLIVEIRA R.P., BROUDE N., PENA S.D.J. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3376-80.
- ORMO M., CUBBIT A., KALLIO K., GROSS L., TSIEN R., REMIGTON S. (1996) Crystal structure of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Science* In press.

- 
- PELTOMAKI P. (2003) Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human câncer. *J Clin Oncol* **21**:1174-1179
- PELTOMAKI P. (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet.* **10**:735-40.
- PICARD B., DURIEZ P., GOURIOU S., MATIC I., DENAMUR E., TADDEI, F. (2001) Mutator natural *Escherichia coli* isolates have an unusual virulence phenotype. *Infect Immun* **69**(1):9-14
- PIMENTA J.R. (2002) Análises filogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas de Gerais.
- PRATA A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* **1**:92-100
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATS T. (1987) Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. *Cold Spring Harbor Laboratory press*
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA*.**74**:5463-7
- SANGUINETTI C.J., DIAS NETO E., SIMPSON A.J.(1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**:914-21
- SARKAR G., SOMMER S.S. (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*.**8**(4):404-407.
- SATELLITE MEETING (1999). Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**:429-432.
- SCHOFIELD M.J., HSIEH P. (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol.* **57**:579-608.
- SCHLOTTERER C., TAUTZ D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**(2):211-215
- SELMANE T., SCHOFIELD M.J., NAYAK S., DU C., HSIEH P.J. (2003) Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. *Mol Biol* **344**:949-965.
- SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL, ZINGALES B. (1996) DNA markers defining two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **83**:141-152

- TEIXEIRA S.M.R. (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Méd Biol Res* **31**:1503-1516
- TIBAYRENC M., NEUBAUER K., BARNABE C., GUERRINE F., SKARECKY D., AYALA F. (1993) Genetic characterization of six parasite protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1335-1339.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., ADAD C.J., REIS D.A. CORRÊA-OLIVEIRA R. (1996) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas disease. *Lancet* **348**:891-892
- VAIDYA T., BAKHIET M., HILL K.L., OLSSON T., KRISTENSSON K., DONELSON J.E. (1997) The gene for a T lymphocyte triggering factor from African trypanosomes. *J Exp Med* **186**(3):433-8.
- VANWYE J.D., HALDAR K. (1997) Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **87**:225-229.
- WHO (World Health Organization) (2002) Technical Report Series, Control of Chagas' disease, ed. W.H.O. Publications, Geneva.
- WU X., KHALPEY Z., CASCALHO M. (2004) Cellular physiology of mismatch repair. *Curr Pharm Des* **10**(32):4121-6.
- XU X., PENG M., FANG Z. (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics* **24**:396-99
- ZAMBRANO-VILLA S., ROSALES-BORJAS D., CARRERO J.C., ORTIZ-ORTIZ L. (2002) How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology* **18**: 272-278.
- ZENG W.L., ALARCON C.M., DONELSON J.E. (1990) Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol.* **10**(6):2765-73
- ZINGALES B., SOUTO R.P., MANGIA R.H., LISBOA C.V., CAMPBELL D.A., COURA J.R., JANSEN A., FERNANDES O. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* **28**(1):105-12.