

**Carolina Furtado Torres da Silva**

Reparo de DNA em dois patógenos humanos:  
Caracterização do gene IMP4 de *Schistosoma mansoni* e  
Estudos acerca do MMR, Sistema GO e Taxa de Mutação  
em *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Carlos Renato Machado

Coorientadora: Santuza M R Teixeira

Belo Horizonte

Julho 2009

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**REPARO DE DNA EM DOIS PATÓGENOS HUMANOS:  
CARACTERIZAÇÃO DO GENE IMP4 DE *SCHISTOSOMA MANSONI* E  
ESTUDOS ACERCA DO MMR, SISTEMA GO E TAXA DE MUTAÇÃO  
EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

Carolina Furtado Torres da Silva

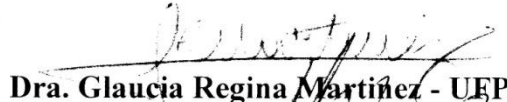
Orientador: Carlos Renato Machado  
Coorientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira

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

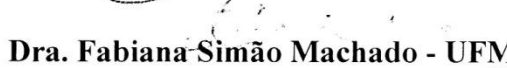
Belo Horizonte  
Julho 2009



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CAROLINA FURTADO TORRES DA SILVA.** Aos trinta dias do mês de julho de 2009 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Reparo de DNA em dois patógenos humanos: caracterização do gene IMP4 de *Schistosoma mansoni* e estudos acerca do MMR, sistema GO e taxa de mutação em *Trypanosoma cruzi*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Glaucia Regina Martinez da Universidade Federal do Paraná, aprovada; Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão da Universidade Federal do Rio de Janeiro, aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Élide Mara Leite Rabelo da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Carlos Renato Machado, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de julho de 2009.

  
Dra. Glaucia Regina Martinez - UFPR

  
Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão - UFRJ

  
Dra. Fabiana Simão Machado - UFMG

  
Dra. Élide Mara Leite Rabelo - UFMG

  
Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira – co-orientadora - UFMG

  
Dr. Carlos Renato Machado – orientador - UFMG

**À pequena Catarina, que nasceu junto com essa tese;**

**À minha mãe, que sempre quis um filho doutor...**

## **Agradecimentos**

Muitas foram as pessoas que contribuíram, de modo especial (e único), para a conclusão deste trabalho. Com ensinamentos, sugestões, críticas, puxões de orelha, ajudas na bancada... Com a convivência agradável e divertida ao longo dessa caminhada... Com a amizade, carinho e presença confortante nos momentos difíceis...

Ao professor Carlos Renato, agradeço pela orientação, atenção, disponibilidade, pelos ensinamentos e conselhos, pelo interesse e entusiasmo com que lida com nosso trabalho, pelo cuidado com que lida com seus alunos. Pela sensibilidade em perceber quando as coisas não vão bem e por estar sempre disposto a escutar e a ajudar. Obrigada pela paciência, compreensão e incentivo nos diversos momentos em que precisei.

À minha coorientadora Santuza, que desperta em mim uma enorme vontade de estudar (!!!) e que motivou minha escolha pela Bioquímica, agradeço pela disponibilidade, pelas conversas, conselhos, olhar crítico, sugestões e ensinamentos. Obrigada por me abrir as portas de seu laboratório!

Aos pesquisadores Andréa Macedo, Glória Franco e Sérgio Pena, agradeço pelas discussões durante o desenvolvimento desse projeto e pelas críticas e sugestões a este trabalho. Em especial, agradeço à Glória pela convivência tão agradável... Obrigada pelas conversas, conselhos e caronas, todos sempre muito bem vindos!!!!

À Neuza, Kátia, Camila e Rúbia, que estão (ou estiveram) por trás de todo esse processo, permitindo que nosso trabalho aconteça, agradeço pelo apoio técnico, pelas inúmeras ajudas e pelo trabalho incansável.

À Priscila Carneiro Campos, do Laboratório de Biologia Celular e Imunologia de Doenças Parasitárias, com quem divido o trabalho das quatro cepas, agradeço pela dedicação, seriedade, ética e bom humor com que realiza essa colaboração. Obrigada por sua amizade e pela boa vontade em todas as vezes que precisei de sua ajuda!

Agradeço imensamente às minhas pupilas Marianna Kunrath e Joana Santos, com quem divido os trabalhos com Ogg1, MutT e Nudix, e formam comigo a panelinha da mutação. À doce e ativa Mari, agradeço pela amizade, pelo carinho e pela

paciência e compreensão nos momentos em que não fui tão presente. Fico orgulhosa por você trabalhar tão direitinho, com seriedade, responsabilidade e organização!!!! À doce pivetinha Jojô, agradeço pela gigantesca ajuda no laboratório (com clonagens, dosagens, digestões, precipitações, transformações, PCRs, placas de ágar sangue...) e fora do laboratório também. Teria sido muito mais difícil e menos divertido sem você! Muito obrigada por sua amizade, por esse carinho enorme e por cuidar tão bem de mim!!!!

Ao Higgor, Érica e Jane, que realizaram as reações de sequenciamento, agradeço pela boa vontade, disponibilidade em ajudar e eficiência. Obrigada pelos momentos agradáveis e pelo carinho!!!

Aos demais colegas e amigos do grupo de reparo, que tornaram o dia a dia mais divertido, obrigada pelas ajudas, pelas risadas e brincadeiras. Em especial, gostaria de agradecer à Dani pelos incontáveis auxílios e conselhos na bancada, pelo exemplo de dedicação e seriedade, pelas discussões que muito contribuíram para meu trabalho, pela disponibilidade, pelas conversas, pela confiança, amizade e carinho; ao Bruno, exemplo de organização e disciplina, agradeço pela amizade, carinho, confiança e pelas conversas no divã; ao Matheus, que me mostrou que as primeiras impressões nem sempre ficam... obrigada por sua amizade sincera, pela lealdade, cumplicidade, pelo carinho e cuidado comigo, pela disponibilidade em me ajudar (sempre!!), pelas inúmeras ajudas na bancada, com os resumos em inglês, pelas conversas, pelas caronas, pela companhia sempre agradável; ao João, agradeço pela amizade e carinho, pelos momentos agradáveis, pelas risadas... Obrigada pelos sábios conselhos na bancada!!! E por aprontar as maiores confusões!!! Ao Davi, que finalmente aceitou ser meu amigo; ao Pedro, pela amizade e carinho; à Selma e à Paula, pela convivência amigável. À Alice e Michelle, que já completaram essa etapa, obrigada pelas ajudas, conselhos, discussões, conversas e pelos diversos momentos agradáveis que vivemos!

Gostaria de agradecer à Ferdi, por uma porção de coisas... Por ter me ajudado tanto na escrita dessa tese! Obrigada pelas diversas vezes em que deixou de fazer suas coisas para me ajudar! Por sua amizade, lealdade e carinho... Obrigada por cuidar tão bem de mim e me proteger de todos os males!!!! Por dividir comigo momentos tão importantes da minha vida! Obrigada pela cumplicidade, pelas conversas, pelos conselhos, por me escutar, me confortar... Obrigada pelos momentos tão

agradáveis, pelas risadas escandalosas... E por ter me arrumado um espaçinho na sua cobiçada lista de amigos!!!!

Aos demais colegas e amigos do LGB, obrigada pela convivência agradável, pelas ajudas na bancada, pelas conversas, pelo carinho enorme que muitos têm por mim!!! Agradeço especialmente à Vanessa, Marina, Marcela, Alessandra, Daiane, Denise e Mika, Heron, Helder e Chico, sempre tão afetuosos e atenciosos comigo!

Aos amigos e ex-alunos Carlos Gustavo e Charles, que foram tão importantes nos meus primeiros anos no laboratório! Obrigada pelas ajudas e ensinamentos, pelo carinho e confiança, pelas conversas e risadas...

Agradeço aos demais laboratórios do Departamento de Bioquímica e Imunologia, por terem sempre aberto as portas pra mim, quando precisei de conselhos, ajuda com experimentos e reagentes.

Aos meus amigos da graduação e aos meus amigos de Bases, obrigada pelo carinho e pelos momentos agradáveis.

Finalmente, gostaria de agradecer àquelas pessoas que estão sempre ao meu lado, dando apoio, incentivo, colo e muito amor... Mãe, obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, pelo carinho, conversas e conselhos, por me entender (mesmo quando não me entende), por ser quem você é, pelas oportunidades, pelo incentivo, pelas massagens, presentes e mimos, pela companhia e pela presença amiga, afetuosa e confortante nesses últimos e turbulentos meses. Kim, obrigada por ser um irmão tão amigo! Pelas conversas, pela cumplicidade, pela sensibilidade, pelo carinho e paciência, pelas ajudas no computador, pelos momentos agradáveis em casa. Gré, obrigada pelo carinho e amizade, pelas conversas e conselhos, pela alegria que você traz... Queria tanto que você estivesse aqui!!! Bugu, obrigada por esse amor tão grande. Por seu carinho e cuidado... Por ser tão companheiro e uma ótima companhia!!! Por me arrancar risadas e deixar minha vida mais feliz! Por me ajudar tanto... Pela segurança e conforto que sua presença me traz. Por seu apoio, paciência e colo nas horas difíceis. E por me fazer querer ser uma pessoa melhor e estar sempre ao seu lado.

## Sumário

Lista de siglas e abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Mecanismos moleculares de reparo de DNA e tolerância a estresse genotóxico .....	2
1.2. Danos endógenos no DNA e vias de reparo .....	5
1.2.1. Reparo por excisão de bases (BER).....	6
1.2.2. Danos causados por agentes alquilantes .....	9
1.2.3. Resposta celular a agentes alquilantes .....	11
1.2.4. Danos causados por estresse oxidativo .....	12
1.2.5. 8-oxoG e Sistema GO.....	14
1.3. O reparo de erros de pareamento (MMR).....	19
1.3.1. O MMR em procariotos.....	19
1.3.2. O MMR em eucariotos .....	20
1.3.3. O papel do MMR do reparo de 8-oxoG .....	23
1.4. Taxa de Mutação .....	25
1.5. Reparo de DNA em organismos patogênicos .....	27
1.5.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas.....	28
1.5.2. Variabilidade intra-específica em <i>T. cruzi</i> .....	29
1.5.3. Mecanismos envolvidos na geração de variabilidade em <i>T. cruzi</i> .....	31
1.5.4. Metabolismo de DNA em <i>T. cruzi</i> .....	32
1.5.5. O <i>Schistosoma mansoni</i> e a esquistossomose .....	42
1.5.6. Pós-genômica do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	45
1.5.7. Reparo de DNA em <i>S. mansoni</i> .....	46
2. Objetivos.....	48



3. Metodologia.....	50
3.1. Células e meios de cultura.....	51
3.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
3.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	51
3.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
3.2. Amplificação de DNA por PCR.....	53
3.3. Sequenciamento de DNA .....	58
3.4. Análises <i>In Silico</i> .....	59
3.5. Vetores plasmídicos e clonagem de fragmentos de DNA.....	59
3.6. Transformação de bactérias eletrocompetentes.....	61
3.7. Obtenção de DNA plasmídico .....	64
3.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição .....	64
3.9. Purificação de DNA .....	64
3.9.1. Purificação de bandas de gel de agarose.....	64
3.9.2. Precipitação de DNA com etanol .....	65
3.9.3. Precipitação de DNA com PEG.....	65
3.10. Dosagem de ácidos nucléicos em solução.....	65
3.11. Extração de RNA e RT-PCR .....	65
3.12. Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	67
3.13. Transfecção de <i>T. cruzi</i> .....	68
3.14. Curvas de sobrevivência com <i>T. cruzi</i> .....	69
3.15. Curvas de crescimento com <i>T. cruzi</i> .....	70
3.16. Clonagem de parasitos em meio ágar sangue .....	70
3.17. Marcação de 8-oxoG por FITC-Avidina .....	71
3.18. Ensaio com MTT .....	72
3.19. Transformação de leveduras.....	72
3.20. Ensaio <i>in vivo</i> com leveduras .....	73
3.20.1. Crescimento em placa .....	73

3.20.2. Curva de crescimento .....	73
3.20.3. Tratamento com Hidroxiuréia (HU).....	74
3.20.4. Tratamento com UV .....	74
3.20.5. Tratamento com MMS.....	75
3.21. Ensaio <i>in vivo</i> com bactérias.....	75
3.21.1. Ensaio de toxicidade .....	75
3.21.2. Ensaio de resistência à kanamicina.....	75
3.21.3. Curvas de crescimento.....	76
3.21.4. Ensaio de complementação funcional heteróloga.....	76
4. Resultados .....	79
4.1. Reparo de DNA em <i>S. mansoni</i> : estudos com o gene IMP4 .....	80
4.1.1. O clone SGC3, de uma biblioteca de <i>S. mansoni</i> em estágio adulto, complementa bactérias sensíveis a MMS .....	80
4.1.2. O clone SGC3 complementa linhagens bacterianas deficientes em proteínas do BER.....	81
4.1.3. O clone SGC3 não complementa uma linhagem bacteriana deficiente em proteínas do NER.....	83
4.1.4. O sequenciamento de SGC3 indicou homologia com IMP4 .....	83
4.1.5. Obtenção de leveduras deficientes em IMP4 .....	85
4.1.6. Um fragmento híbrido contendo a porção C-terminal de IMP4 é expresso na linhagem CRIMP4 .....	90
4.1.7. A levedura CRIMP4 apresenta crescimento lento em relação à linhagem selvagem.....	92
4.1.8. O gene IMP4 de <i>S. mansoni</i> restaura o crescimento da levedura CRIMP4 na presença de galactose. ....	94
4.1.9. Leveduras CRIMP4 não apresentam sensibilidade acentuada à hidroxiuréia ....	94
4.1.10. Leveduras CRIMP4 apresentam sensibilidade acentuada a MMS, a qual é reduzida na presença do gene IMP4 de <i>S. mansoni</i> .....	97
4.2. Análise da resposta de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> a agentes genotóxicos.....	100
4.2.1. O cádmio modifica a resposta dos clones ao tratamento com cisplatina e MNNG .....	101

4.2.2. As cepas Silvio e Colombiana apresentam maior sobrevivência em condições de estresse oxidativo .....	104
4.2.3. O cádmio não modifica a resposta dos clones ao tratamento com peróxido de hidrogênio.....	105
4.2.4. Análise da capacidade redutora das cepas JG, Silvio, Colombiana e Esmeraldo .....	107
4.3. Estudos da resposta ao estresse oxidativo em <i>T. cruzi</i> .....	111
4.3.1. <i>T. cruzi</i> apresenta um ortólogo de OGG1 .....	111
4.3.2. A expressão de TcOgg1A é tóxica em bactérias .....	116
4.3.3. A expressão de TcOgg1A também é tóxica em bactérias deficientes em Fpg... ..	118
4.3.4. A suposta superexpressão de TcOgg1A sensibiliza o clone CL Brener ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	121
4.3.5. A existência de um ortólogo de MutY em <i>T. cruzi</i> pressupõe a presença de um ortólogo de MutT no parasito .....	122
4.3.6. Ndx1 e Ndx4 não complementam bactérias deficientes em MutT .....	124
4.3.7. Um possível ortólogo de MTH foi amplificado a partir do DNA genômico do clone CL Brener .....	130
4.3.8. A expressão heteróloga de MutT em <i>T. cruzi</i> aumenta a sobrevivência em resposta ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	132
4.3.9. A expressão heteróloga de mutt em <i>T. cruzi</i> diminui os níveis celulares de 8-oxoG após tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	136
4.4. Estudos da taxa de mutação em <i>T. cruzi</i> .....	138
4.4.1. O gene <i>neo</i> e seu variante <i>neostop</i> .....	138
4.4.2. O gene <i>neostop</i> não confere resistência à kanamicina a bactérias .....	141
4.4.3. A mutação revertente em <i>neostop</i> deve estar situada nos primeiros 90 pb do gene .....	145
4.4.4. Populações do clone CL Brener transfectadas com <i>neostop</i> são sensíveis à neomicina.....	147
4.4.5. A mutação na quarta base de <i>neostop</i> está presente em clones transfectados de CL Brener.....	148
4.4.6. Os clones selecionados para o ensaio de mutação apresentam crescimento semelhante e são sensíveis à neomicina .....	151
4.4.7. A frequência de mutantes resistentes à neomicina aumenta em condições de estresse oxidativo e conforme o tempo de cultivo.....	154

4.4.8. Mutações revertentes no gene <i>neostop</i> estão presentes em cerca de 10% dos clones selecionados em neomicina.....	155
4.4.9. Alguns clones que não apresentam mutação em <i>neostop</i> são resistentes à neomicina.....	159
5. Discussão.....	163
6. Referências Bibliográficas.....	204
7. Anexos .....	226

## Lista de siglas e abreviaturas

8-oxodGTP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
AP	Apurínico/apirimidínico
APH	Aminoglicosídeo 3` fosfotransferase
BER	Reparo por excisão de bases
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ddNTPs	Didesoxirribonucleotídeo
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade óptica
dRP	Desoxirribose fosfato
DSB	Quebra de dupla fita de DNA
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GO	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
GTP	Guanosina trifosfato
HU	Hidroxiuréia
INALa	2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) propionamida
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver infusion tryptone</i>
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanina DNA metiltransferase
MLH	Homólogo de MutL
MMR	Reparo de Erros de Pareamento
MMS	<b>Metilmetano sulfonato</b>
MNNG	N- <b>Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina</b>
MSH	Homólogo de MutS
MTH	Homólogo de MutT
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazole brometo
MYH	Homólogo de MutY
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	<i>Non homologue end joining</i>

OGG	8-oxoguanina DNA glicosilase
ORF	Janela aberta de leitura
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
snRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
snRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoprotein</i>
SOD	Superóxido dismutase
SSB	Quebra de fita simples de DNA
TCR	Reparo de DNA acoplado à transcrição
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta B (320-280 nm)
UVC	Radiacao ultravioleta C (280-100 nm)
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Lista de Figuras

Figura 1 – Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências.....	3
Figura 2 – Via de Reparo por Excisão de Bases .....	8
Figura 3 – Possíveis sítios de alquilação de bases no DNA.....	10
Figura 4 – A lesão 8-oxoguanina.....	15
Figura 5 – Sistema GO: Fpg e MutY .....	16
Figura 6 – Sistema GO: Fpg, MutY e MutT.....	17
Figura 7 – MMR em procariotos.....	21
Figura 8 – Representação esquemática do MMR eucariótico.....	22
Figura 9 – MMR em eucariotos.....	24
Figura 10 – Isoformas de TcMSH2 nas diferentes linhagens de <i>T. cruzi</i> e possíveis correlações com a eficiência do MMR, diversidade genética e taxa de mutação .....	34
Figura 11 – Atividade ATPásica de TcMSH2 .....	35
Figura 12 – Resposta de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com cisplatina, MNNG e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
Figura 13 – Distribuição global da esquistossomose .....	43
Figura 14 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	44
Figura 15 – Estratégias de clonagem em pMAL-c2G e pROCK-HIGRO .....	62
Figura 16 – Estratégia de clonagem em pYEDP.....	63
Figura 17 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com MMS.....	82
Figura 18 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com luz UV.....	84
Figura 19 – Comparação entre a sequência de aminoácidos de proteínas IMP4 de diferentes organismos e o produto predito do gene clonado de <i>S. mansoni</i> .....	86
Figura 20 – Estratégia de construção da linhagem CRIMP4. ....	87
Figura 21 – Disruptura de ScIMP4 na levedura mutante CRIMP4.....	89
Figura 22 – Estrutura de ScImp4 na linhagem mutante CRIMP4 .....	91

Figura 23 – Detecção de mRNA corresponde à porção C-terminal de ScIMP4 em leveduras mutantes CRIMP4 .....	93
Figura 24 – RNA total e crescimento de leveduras CRIMP4.....	95
Figura 25 – Crescimento, em glicose ou galactose, de leveduras CRIMP4 carregando diferentes construções plasmídicas .....	96
Figura 26 – Sobrevivência de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em resposta ao tratamento com HU .....	98
Figura 27 – Crescimento de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em meio sólido contendo MMS .....	99
Figura 28 – Efeito do cádmio na resposta de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com cisplatina e MNNG.....	103
Figura 29 – Sobrevivência de diferentes culturas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com INALa ativada por luz.....	106
Figura 30 – Efeito do cádmio na resposta de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	108
Figura 31 – Capacidade de diferentes cepas e clones de <i>T. cruzi</i> em reduzir o composto MTT.....	110
Figura 32 – Ortólogo de Ogg1 em <i>T. cruzi</i> .....	112
Figura 33 –8-oxoG DNA glicosilases putativas em <i>T. cruzi</i> .....	113
Figura 34 – Amplificação e clonagem de TcOgg1A.....	115
Figura 35 – Toxicidade de TcOgg1A em células DH5α .....	117
Figura 36 – Toxicidade de TcOgg1A em bactérias BH20 ( <i>fpg</i> -).....	119
Figura 37 – Toxicidade de TcOgg1A em bactérias AB1157 ( <i>fpg</i> +)......	120
Figura 38 – Curva de sobrevivência do clone CL Brener transfectado com pROCK_Ogg1A em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio .....	123
Figura 39 – Alinhamento das regiões conservadas entre Ndx1, Ndx 4 e MutT .....	125
Figura 40 – Amplificação e clonagem de Ndx1 .....	126
Figura 41 – Amplificação e clonagem de Ndx4 .....	127
Figura 42 – Possível ortólogo de MTH em <i>T. cruzi</i> .....	131
Figura 43 – Amplificação do ortólogo de MTH em <i>T. cruzi</i> .....	133



Figura 44 – Expressão heteróloga de <i>mutT</i> em CL Brener.....	134
Figura 45 – Aumento da sobrevivência em resposta ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> promovido pela expressão de <i>mutT</i> em CL Brener .....	135
Figura 46 – Redução dos níveis de 8-oxoG após estresse oxidativo em células expressando o gene <i>mutT</i> exógeno .....	137
Figura 47 – O gene <i>neo</i> .....	139
Figura 48 – Variantes do gene <i>neo</i> utilizados neste trabalho .....	140
Figura 49 – Amplificação e clonagem de <i>neo</i> e <i>neostop</i> .....	142
Figura 50 – Teste de resistência à kanamicina em linhagens de bactérias expressando variantes do gene <i>neo</i> .....	144
Figura 51 – Eventos mutacionais simples (substituição ou inserção) supostamente capazes de restabelecer a funcionalidade do gene <i>neo</i> .....	146
Figura 52 – PCR de colônia de clones CL_ <i>neostop</i> .....	150
Figura 53 – Sequenciamento da porção inicial do gene <i>neostop</i> em diferentes clones CL_ <i>neostop</i> .....	152
Figura 54 – Crescimento de clones CL_ <i>neostop</i> e sensibilidade a G418 .....	153
Figura 55 – Frequência de mutantes resistentes a G418 em diferentes populações celulares de CL_ <i>neostop</i> .....	157
Figura 56 – Sequenciamento da porção inicial do gene <i>neostop</i> em clones CL_ <i>neostop</i> revertentes.....	160
Figura 57 - Resistência de clones revertentes a G418 em meio líquido.....	161

## Lista de siglas e abreviaturas

8-oxodGTP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
AP	Apurínico/apirimidínico
APH	Aminoglicosídeo 3` fosfotransferase
BER	Reparo por excisão de bases
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ddNTPs	Didesoxirribonucleotídeo
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade óptica
dRP	Desoxirribose fosfato
DSB	Quebra de dupla fita de DNA
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GO	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
GTP	Guanosina trifosfato
HU	Hidroxiuréia
INALa	2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) propionamida
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver infusion tryptone</i>
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanina DNA metiltransferase
MLH	Homólogo de MutL
MMR	Reparo de Erros de Pareamento
MMS	<b>Metilmetano sulfonato</b>
MNNG	N- <b>Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina</b>
MSH	Homólogo de MutS
MTH	Homólogo de MutT
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazole brometo
MYH	Homólogo de MutY
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	<i>Non homologue end joining</i>

OGG	8-oxoguanina DNA glicosilase
ORF	Janela aberta de leitura
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
snRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
snRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoprotein</i>
SOD	Superóxido dismutase
SSB	Quebra de fita simples de DNA
TCR	Reparo de DNA acoplado à transcrição
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta B (320-280 nm)
UVC	Radiacao ultravioleta C (280-100 nm)
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Lista de Figuras

Figura 1 – Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências.....	3
Figura 2 – Via de Reparo por Excisão de Bases .....	8
Figura 3 – Possíveis sítios de alquilação de bases no DNA.....	10
Figura 4 – A lesão 8-oxoguanina.....	15
Figura 5 – Sistema GO: Fpg e MutY .....	16
Figura 6 – Sistema GO: Fpg, MutY e MutT.....	17
Figura 7 – MMR em procariotos.....	21
Figura 8 – Representação esquemática do MMR eucariótico.....	22
Figura 9 – MMR em eucariotos.....	24
Figura 10 – Isoformas de TcMSH2 nas diferentes linhagens de <i>T. cruzi</i> e possíveis correlações com a eficiência do MMR, diversidade genética e taxa de mutação .....	34
Figura 11 – Atividade ATPásica de TcMSH2 .....	35
Figura 12 – Resposta de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com cisplatina, MNNG e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
Figura 13 – Distribuição global da esquistossomose .....	43
Figura 14 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	44
Figura 15 – Estratégias de clonagem em pMAL-c2G e pROCK-HIGRO .....	62
Figura 16 – Estratégia de clonagem em pYEDP.....	63
Figura 17 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com MMS.....	82
Figura 18 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com luz UV.....	84
Figura 19 – Comparação entre a sequência de aminoácidos de proteínas IMP4 de diferentes organismos e o produto predito do gene clonado de <i>S. mansoni</i> .....	86
Figura 20 – Estratégia de construção da linhagem CRIMP4. ....	87
Figura 21 – Disruptura de ScIMP4 na levedura mutante CRIMP4.....	89
Figura 22 – Estrutura de ScImp4 na linhagem mutante CRIMP4 .....	91

Figura 23 – Detecção de mRNA corresponde à porção C-terminal de ScIMP4 em leveduras mutantes CRIMP4 .....	93
Figura 24 – RNA total e crescimento de leveduras CRIMP4.....	95
Figura 25 – Crescimento, em glicose ou galactose, de leveduras CRIMP4 carregando diferentes construções plasmídicas .....	96
Figura 26 – Sobrevivência de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em resposta ao tratamento com HU .....	98
Figura 27 – Crescimento de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em meio sólido contendo MMS .....	99
Figura 28 – Efeito do cádmio na resposta de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com cisplatina e MNNG.....	103
Figura 29 – Sobrevivência de diferentes culturas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com INALa ativada por luz.....	106
Figura 30 – Efeito do cádmio na resposta de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	108
Figura 31 – Capacidade de diferentes cepas e clones de <i>T. cruzi</i> em reduzir o composto MTT.....	110
Figura 32 – Ortólogo de Ogg1 em <i>T. cruzi</i> .....	112
Figura 33 –8-oxoG DNA glicosilases putativas em <i>T. cruzi</i> .....	113
Figura 34 – Amplificação e clonagem de TcOgg1A.....	115
Figura 35 – Toxicidade de TcOgg1A em células DH5α .....	117
Figura 36 – Toxicidade de TcOgg1A em bactérias BH20 ( <i>fpg</i> -).....	119
Figura 37 – Toxicidade de TcOgg1A em bactérias AB1157 ( <i>fpg</i> +)......	120
Figura 38 – Curva de sobrevivência do clone CL Brener transfectado com pROCK_Ogg1A em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio .....	123
Figura 39 – Alinhamento das regiões conservadas entre Ndx1, Ndx 4 e MutT .....	125
Figura 40 – Amplificação e clonagem de Ndx1 .....	126
Figura 41 – Amplificação e clonagem de Ndx4 .....	127
Figura 42 – Possível ortólogo de MTH em <i>T. cruzi</i> .....	131
Figura 43 – Amplificação do ortólogo de MTH em <i>T. cruzi</i> .....	133

Figura 44 – Expressão heteróloga de <i>mutT</i> em CL Brener.....	134
Figura 45 – Aumento da sobrevivência em resposta ao tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> promovido pela expressão de <i>mutT</i> em CL Brener .....	135
Figura 46 – Redução dos níveis de 8-oxoG após estresse oxidativo em células expressando o gene <i>mutT</i> exógeno .....	137
Figura 47 – O gene <i>neo</i> .....	139
Figura 48 – Variantes do gene <i>neo</i> utilizados neste trabalho .....	140
Figura 49 – Amplificação e clonagem de <i>neo</i> e <i>neostop</i> .....	142
Figura 50 – Teste de resistência à kanamicina em linhagens de bactérias expressando variantes do gene <i>neo</i> .....	144
Figura 51 – Eventos mutacionais simples (substituição ou inserção) supostamente capazes de restabelecer a funcionalidade do gene <i>neo</i> .....	146
Figura 52 – PCR de colônia de clones CL_ <i>neostop</i> .....	150
Figura 53 – Sequenciamento da porção inicial do gene <i>neostop</i> em diferentes clones CL_ <i>neostop</i> .....	152
Figura 54 – Crescimento de clones CL_ <i>neostop</i> e sensibilidade a G418 .....	153
Figura 55 – Frequência de mutantes resistentes a G418 em diferentes populações celulares de CL_ <i>neostop</i> .....	157
Figura 56 – Sequenciamento da porção inicial do gene <i>neostop</i> em clones CL_ <i>neostop</i> revertentes.....	160
Figura 57 - Resistência de clones revertentes a G418 em meio líquido.....	161

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho .....	54
Tabela 2 – Fragmentos amplificados pelos diferentes pares de iniciadores utilizados ..	56
Tabela 3 – Média da frequência de mutantes Rif <sup>R</sup> em populações de bactérias BH600 e AB1157 carregando diferentes construções plasmídicas .....	129
Tabela 4 – Clonagem de CL_neostop em ágar sangue .....	149
Tabela 5 – Frequência de mutantes resistentes a G418 em diferentes populações celulares, expandidas por seis semanas de crescimento em meio líquido .....	156

## Resumo

O conteúdo genético de um organismo está continuamente exposto a agentes que danificam a molécula de DNA, causando mutações ou comprometendo suas funções. Complexos mecanismos de reparo ou tolerância a danos no DNA ajudam a manter baixas as taxas de mutação em uma célula e a garantir a integridade do seu genoma. Neste trabalho, estudamos o reparo de DNA em dois parasitos humanos, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, causadores da esquistossomose e da Doença de Chagas no Brasil. Esses parasitas são expostos a diferentes agentes genotóxicos ao longo do ciclo de vida e necessitam, portanto, apresentar diversos mecanismos de adaptação. Através da estratégia de complementação funcional heteróloga, isolamos um cDNA de *S. mansoni* capaz de complementar bactérias deficientes na via de reparo por excisão de bases (BER). O sequenciamento do cDNA indicou homologia ao gene ScIMP4 de *Saccharomyces cerevisiae*, que está envolvido no metabolismo de RNA. Construímos uma linhagem mutante de *S. cerevisiae*, que codifica a proteína IMP4 truncada e verificamos que esta apresenta sensibilidade acentuada a MMS. Observamos ainda que o gene IMP4 de *S. mansoni* foi capaz de complementar parcialmente a levedura mutante, indicando homologia funcional entre os genes IMP4 do verme e da levedura. Na segunda etapa deste trabalho, estudamos mecanismos de reparo de DNA possivelmente associados à geração de variabilidade genética em *T. cruzi*. Nosso grupo demonstrou previamente a existência de três isoformas (A, B e C) da proteína TcMSH2 em *T. cruzi*. Esta proteína é o principal componente da via de reparo de erros de pareamento (MMR) em eucariotos. Através de ensaios *in vivo* com cisplatina, MNNG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na presença de cloreto de cádmio (em concentrações que inibem especificamente o MMR), obtivemos novos indícios de que as cepas que codificam a isoforma A de TcMSH2 apresentam MMR mais eficiente, quando comparadas a cepas que codificam a



isoforma C desta proteína, e isto pode estar relacionado com a maior variabilidade genética vista nas últimas. Para estudar mecanismos de resposta a danos oxidativos em *T. cruzi*, caracterizamos o possível ortólogo de OGG1 no parasito. Vimos que a expressão do alelo TcOgg1A é tóxica em bactérias e que a superexpressão deste no clone CL Brener aumenta sua sensibilidade ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainda, realizamos uma busca por homólogos funcionais de MutT em *T. cruzi*. Nossos resultados indicam que os alelos Ndx1 e Ndx4, que apresentam o domínio Nudix, não complementam bactérias deficientes em MutT. Também observamos que a superexpressão de EcMutT em *T. cruzi* aumenta a sobrevivência dos parasitos em resposta ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reduz os níveis de 8-oxoG após estresse oxidativo. Finalmente, desenvolvemos um sistema repórter capaz de avaliar a taxa de mutação em *T. cruzi*. O ensaio, realizado em meio semi-sólido, baseia-se na seleção de mutantes resistentes a neomicina, que revertem uma mutação inserida no gene *neo* introduzido no genoma do parasito. Os resultados obtidos em um ensaio preliminar indicam a viabilidade da metodologia, através da qual seremos capazes de determinar a taxa de mutação em diferentes cepas de *T. cruzi*, assim como avaliar o efeito de diferentes agentes mutagênicos no parasita.

## Abstract

Cells have evolved a complex set of mechanisms to appropriately respond to genotoxic damage, ensuring genomic stability. Such responses retain mutation rates in an acceptable level, through a fine-tuning balance between genome maintenance and generation of genetic variability. In this work, we studied some features of the DNA repair machinery of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*, the causative agents of schistosomiasis and Chagas disease in Brazil. Both parasites need to adapt to distinct environments, and are consequently exposed to various DNA damaging agents. Using a functional heterologue complementation strategy, we have isolated a *S. mansoni* cDNA that complements *Escherichia coli* mutants defective in the DNA base excision repair (BER) pathway. This cDNA has sequence homology to a gene involved in the RNA metabolism pathway, the *ScIMP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. To establish whether the *S. mansoni* cDNA could complement yeast mutants *ScIMP4*-defective, we constructed a yeast haploid strain containing a truncated Imp4p gene which shows MMS sensitivity. The functional homology between the *ScIMP4* gene and the cDNA from *S. mansoni* was verified by partial complementation of the mutant yeast with the worm's gene. As a second goal, we studied *T. cruzi* DNA repair mechanisms possibly involved in the generation of genetic variability in this protozoan parasite. We have previously demonstrated that polymorphisms in the TcMSH2 locus, which encodes a key component of the mismatch repair (MMR), result in three different protein isoforms present in the *T. cruzi* population. Using cisplatin, MNNG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* assays performed with cadmium, which in sub lethal concentrations inhibits specifically the MMR, we provided evidences that TcMSH2A-expressing parasites have increased MMR activity when compared to parasite strains expressing TcMSH2C isoforms. To better understand the mechanisms involved in the oxidative DNA damage response in

*T. cruzi* we characterized the putative OGG1 orthologue in the parasite and showed that (i) TcOgg1A expression is toxic in bacteria and (ii) stably TcOgg1A transfected parasites have increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity. Additionally, a search for candidates for a functional homologue of *E. coli* MutT in *T. cruzi* using the Nudix Box was attempted. We've found that expression of Ndx1 or Ndx4 was unable to suppress the high spontaneous mutagenesis of *E. coli* mutT-deficient strain and that EcMutT overexpressing parasites showed increased survival and decreased 8oxoG levels after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Finally, we developed a methodology to determine the mutation rate in *T. cruzi*. The assay is performed in semisolid medium plates and is based on the selection of clones that spontaneously reverts the neomycin-sensitive phenotype caused by a single base substitution in the neomycin resistance gene (*neo*) inserted into the parasite genome. Our preliminary results indicate that this experimental approach is functional since (i) clones that grew in neomycin containing plates have the mutation repaired as shown by-DNA sequence, (ii) a proportionally higher number of clones able to grow in the presence of neomycin was observed after long-time culture in liquid medium and in cultures that were treated with a mutagenic agent. This methodology is now in place in our laboratory to be used to determine the mutation rate in distinct *T. cruzi* strains, as well as analyzing the effect of different mutagens in this parasite.

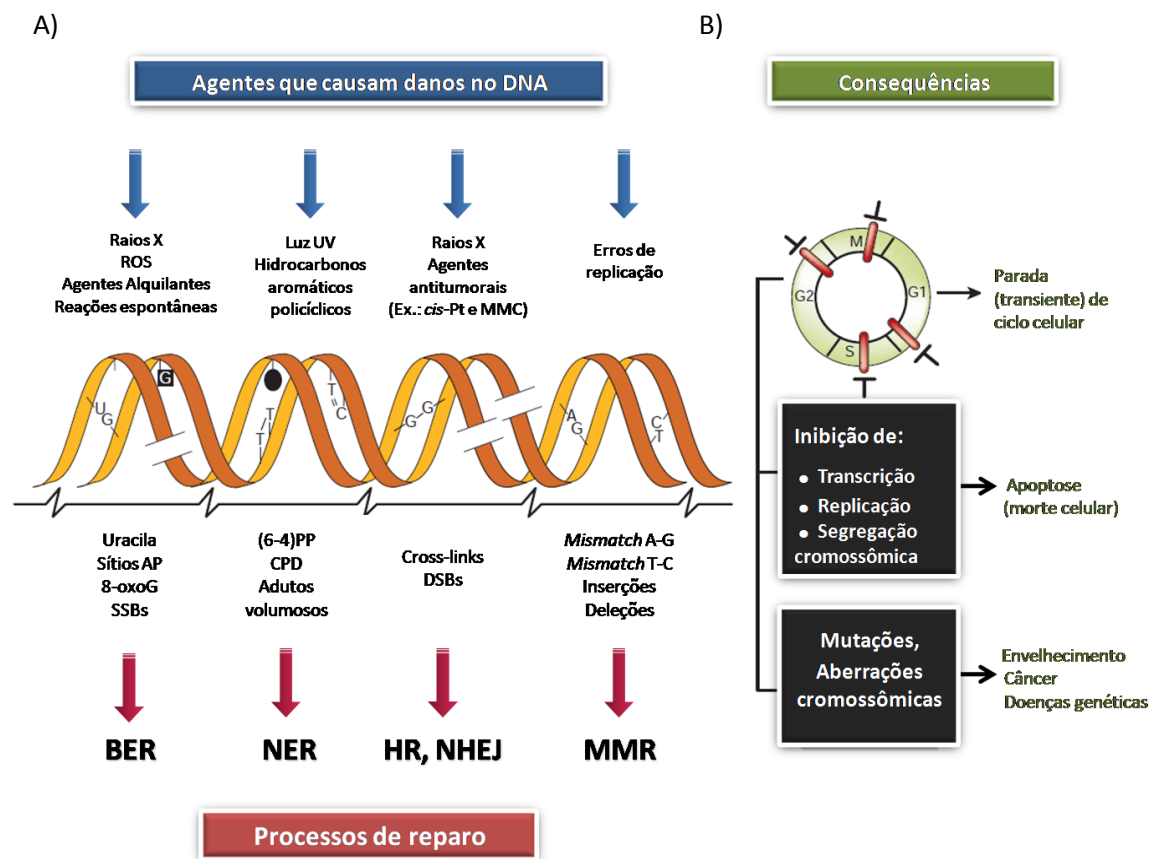
Qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwerty  
uiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasd  
fghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzx  
cvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxc  
vbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxc  
vbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbn  
mqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwert  
yuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopas

# 1. Introdução

## 1.1. MECANISMOS MOLECULARES DE REPARO DE DNA E TOLERÂNCIA A ESTRESSE GENOTÓXICO

A manutenção da integridade genômica e a adaptação a estresses genotóxicos são elementos fundamentais para garantir tanto a sobrevivência quanto a evolução de um organismo ou uma espécie. Ao longo da vida, os organismos são continuamente expostos a uma ampla variedade de agentes, provindos do ambiente ou de processos metabólicos endógenos, que causam danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos. Os eventos que provocam modificações no DNA incluem radiação, hidrólise (espontânea ou induzida), exposição a espécies reativas de oxigênio (ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), de nitrogênio (RNS), além do contato com outras substâncias reativas, como agentes alquilantes e produtos da peroxidação de lipídeos (Lindahl, 1993; Tudek *et al.*, 2006; Olinski *et al.*, 2007). Para conter essas ameaças e preservar a integridade genômica, os organismos dispõem de múltiplos mecanismos de reparo e prevenção de danos, os quais promovem a estabilidade do DNA, protegem o genoma de modificações potencialmente mutagênicas ou citotóxicas e garantem a transmissão acurada da informação genética (Lindahl e Wood, 1999; Hoeijmakers, 2001) (Figura 1).

O conhecimento acerca dos mecanismos de reparo de DNA é essencial ao entendimento sobre como e por que o genoma de um indivíduo é afetado ao longo do seu tempo de vida e sobre como processos de reparo de DNA, RNA e nucleotídeos são eficientemente conduzidos, através de diferentes caminhos. Algumas proteínas de reparo são responsáveis pela sanitização do pool de nucleotídeos (revisto por Arczewska e Kusmierek, 2007). Outras proteínas, como metiltransferases e fotolases, realizam a reversão direta de danos específicos no DNA: as primeiras atuam na desmetilação de



**FIGURA 1 – Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências.** (A): Exemplos de agentes que causam danos no DNA (porção superior), algumas lesões geradas por estes agentes (porção média) e mecanismos de reparo mais relevantes responsáveis por sua remoção ou correção (porção inferior). (B) Porção superior: efeitos agudos de danos no DNA na progressão do ciclo celular, que resultam em atraso em G1, S, G2 e M. Porção média: efeitos agudos no metabolismo de DNA, que resultam em morte celular. Porção inferior: consequências em longo prazo de injúrias no DNA, que incluem modificações permanentes na sequência de DNA (mutações de ponto, que afetam genes individuais, ou aberrações cromossômicas, que envolvem largas porções do cromossomo e podem afetar múltiplos genes) e seus efeitos biológicos. Abreviações: *cis*-Pt e MMC, cisplatina e mitomicina C, respectivamente (ambos fazem *crosslinking* com DNA); (6-4)PP e CPD, fotoproducto 6-4 e dímero de ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). Figura adaptada de Hoeijmakers, 2001.

alguns tipos de bases modificadas (revisto por Nieminuszczy e Grzesiuk, 2007) e as últimas realizam, na presença de luz visível, a quebra de ligações incorretas entre bases consecutivas, causadas por luz UV (Kim *et al.*, 1994; Sancar, 1994). Além disso, três grandes vias de reparo realizam a excisão de diferentes porções de DNA danificado (Figura 1): a via de reparo de erros de pareamento (ou MMR, do inglês *Mismatch Repair*) é responsável pela excisão de fragmentos de fita recém-sintetizada contendo bases incorretamente incorporadas (revisto por Hsieh e Yamane, 2008); a via de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER, do inglês *Nucleotide-Excision Repair*) realiza a excisão de regiões de DNA contendo lesões volumosas, que causam distorção na hélice de DNA, como aquelas causadas por luz UV (revisto por Nospikel, 2009) e, finalmente, a via de reparo por excisão de bases (ou BER, do inglês *Base-Excision Repair*) atua na excisão de bases oxidadas, metiladas ou mal incorporadas presentes no DNA (revisto por Robertson *et al.*, 2009). Bases lesionadas são também fontes de quebras no DNA, em uma das fitas (quebras de fita simples ou SSBs, do inglês *Single-Strand Breaks*) ou em ambas as fitas (quebras de fita dupla ou DSBs, do inglês *Double-Strand Breaks*) (Krokan *et al.*, 1997; Caldecott, 2001). SSBs e DSBs também podem ser geradas por radiação ionizante, estresse oxidativo e colapso da forquilha de replicação, dentre outros (Mahaney *et al.*, 2009). Essas lesões são principalmente reparadas por processos de recombinação. Estes podem ser acurados, quando utilizam DNA homólogo não danificado como molde para o reparo (recombinação homóloga ou HR, do inglês *Homologous Recombination*) (revisto por Nowosielska, 2007), ou imprecisos, quando realizam a junção de duas extremidades, usualmente sem homologia de sequência (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) (revisto por Mahaney *et al.*, 2009) (Figura 1). Para que lesões não persistam no DNA que será transcrito ou replicado, algumas subvias de reparo dão preferência à correção de lesões presentes em fitas transcricionalmente ativas, em um processo denominado Reparo

Acoplado à Transcrição (ou TCR, do inglês *Transcription-Coupled Repair*) (revisto por Tornaletti, 2009). Além disso, algumas lesões promovem “atrasos” na progressão do ciclo celular, permitindo que o reparo ocorra antes da replicação (revisto por Toyoshima, 2009) (Figura 1).

As vias de reparo de DNA estão universalmente presentes nas células e são extremamente conservadas. Apesar da proteção oferecida por seus diversos mecanismos, alguns danos escapam ao reparo e causam erros na replicação e transcrição, promovendo mutagênese, morte celular, envelhecimento e doenças diversas. De acordo com as consequências que geram, as lesões são classificadas como mutagênicas (quando realizam pareamentos incorretos) ou citotóxicas (quando bloqueiam a replicação). Para contornar os efeitos citotóxicos de lesões que bloqueiam a atividade de DNA polimerases replicativas (ou polimerases de alta fidelidade), as células dispõem de DNA polimerases alternativas, que realizam um processo conhecido como síntese translesão (ou TLS, do inglês *Translesion Synthesis*). Com sítio catalítico menos restrito, essas polimerases conseguem replicar através de lesões e distorções na molécula de DNA (revisto por Bebenek e Kunkel, 2004). A baixa especificidade catalítica dessas polimerases possibilita, no entanto, a incorporação errônea de nucleotídeos em DNA não danificado, o que pode resultar em mutações pontuais (Bavoux *et al.*, 2005).

## **1.2. DANOS ENDÓGENOS NO DNA E VIAS DE REPARO**

Modificações de bases, de tipos diversos, podem ser causadas por fatores exógenos (ambientais) ou endógenos. Sabe-se que processos celulares normais geram danos no DNA, da mesma natureza, porém em maior frequência, que aqueles gerados por fatores ambientais (Jackson e Loeb, 2001). Estima-se que 20 000 lesões sejam produzidas



por dia, por célula de mamífero, em decorrência de danos endógenos. A maioria delas consiste em desaminações, hidrólises espontâneas de ligações N-glicosídicas (que geram sítios abásicos ou sítios AP), metilações e danos causados por ROS, RNS e produtos de peroxidação de lipídeos. Outras são causadas por erros no metabolismo de DNA, como a formação de SSBs e DSBs pelo colapso da forquilha de replicação e a introdução de nucleotídeos modificados durante a replicação (Lindahl, 1993; Drablos *et al.*, 2004; Tudek *et al.*, 2006; Olinski *et al.*, 2007). Desde bactérias a eucariotos, o reparo de danos endógenos no DNA é realizado predominantemente pelo BER, que corrige um número estimado de 10 000 lesões por dia em células de mamíferos (Nakamura *et al.*, 1998; Lindahl e Wood, 1999).

### **1.2.1. REPARO POR EXCISÃO DE BASES (BER)**

O reparo por excisão de bases (ou BER) é a via predominante de processamento de pequenas lesões de bases, como aquelas geradas por danos oxidativos e agentes alquilantes (Lindahl e Wood, 1999). Esta via funciona como uma série de complexos transientes de reparo que se formam em um sítio de lesão no DNA (Hitomi *et al.*, 2007). À medida que a lesão é processada, novas proteínas são recrutadas (e alternadas) e ocorre a progressão do processo de reparo (Wilson e Kunkel, 2000). A formação dos complexos protéicos no BER é mediada por interações entre proteínas e influenciada por modificações pós-traducionais. Ambos os eventos promovem alterações na especificidade e/ou na eficiência catalítica das proteínas da via (revisado por Almeida e Sobol, 2007).

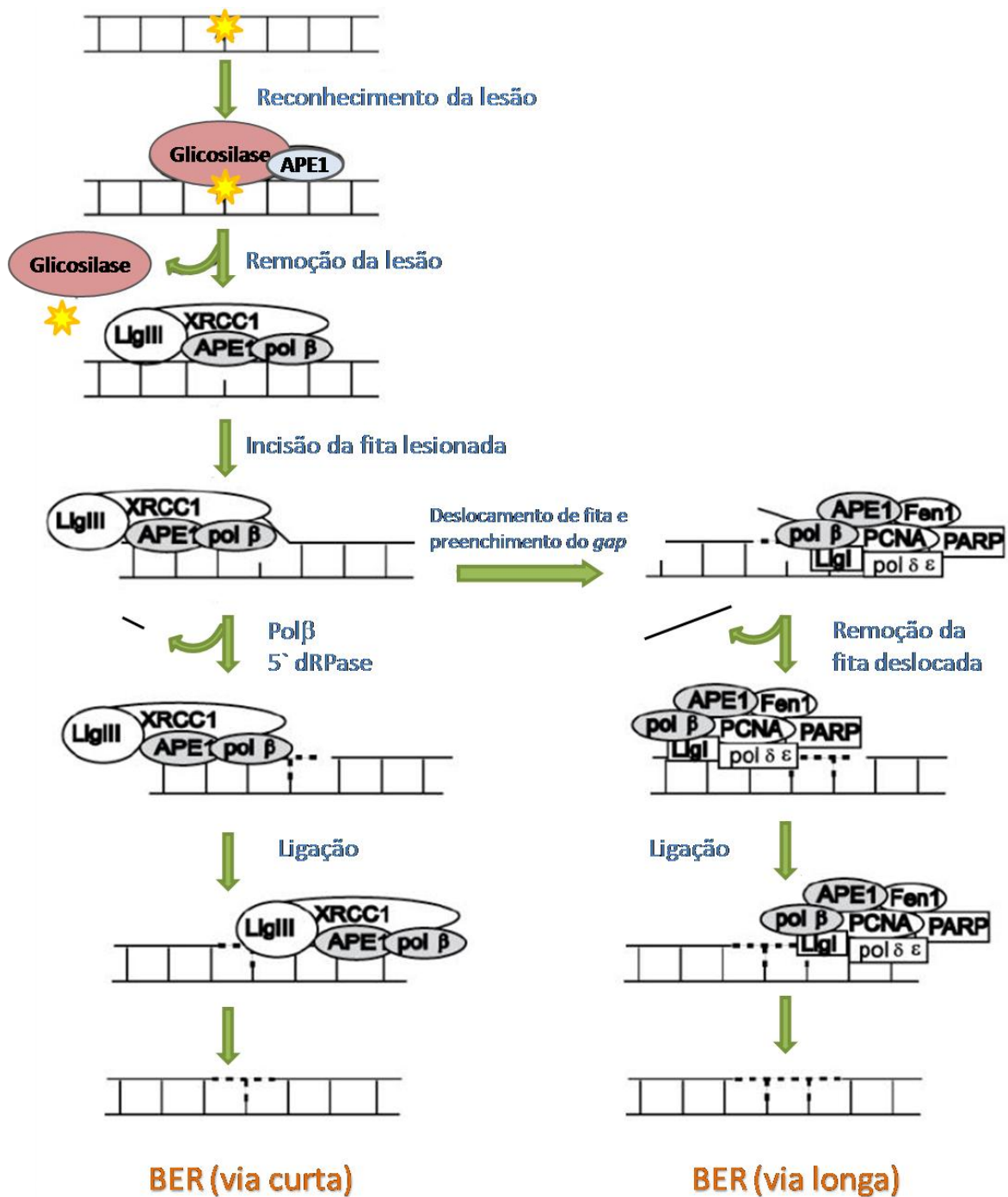
O BER é normalmente definido como uma via de reparo iniciada por DNA glicosilases específicas (mono ou bifuncionais) e continuada por uma das duas subvias: via curta (*short-patch BER*), mecanismo mais comum, onde apenas 1 nucleotídeo é

substituído, ou via longa (*long-patch BER*), onde 2 a 13 nucleotídeos são substituídos (Lindahl e Wood, 1999;).

A via curta, quando iniciada por uma glicosilase monofuncional, envolve a remoção da base modificada (lesionada ou mal pareada) com a formação de um sítio abásico (AP ou apurínico/apirimidínico). Esta etapa é acompanhada da hidrólise do sítio AP por uma AP endonuclease (APE1), que catalisa a incisão da fita lesionada, deixando um terminal 3'-OH e um grupo desoxirribose-fosfato na outra extremidade (5'-dRP). A DNA polimerase  $\beta$  ( $\text{pol}\beta$ ), em seguida, insere um único nucleotídeo no *gap* formado e remove o grupamento dRP (através de sua atividade liásica), preparando a fita para a ligação por uma DNA ligase (Lig I ou Lig IIIA/XRCC1) (Wood *et al.*, 2005) (Figura 2).

No entanto, algumas lesões (como bases oxidadas) são primariamente removidas por DNA glicosilases bifuncionais, que apresentam uma atividade adicional de 3' AP liase. Além de excisar a lesão, a glicosilase bifuncional pode realizar a incisão do esqueleto de DNA a 3' do sítio danificado, deixando (após uma reação de  $\beta$ -eliminação) um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado no terminal 3' e grupamento fosfato no terminal 5' (5'-P). A atividade 3' fosfodiesterase de APE1 cliva o terminal 3' como preparação à extensão por  $\text{pol}\beta$ , seguida da ligação (Bruner *et al.*, 2000).

A via longa do BER ocorre quando o grupamento presente no terminal 5' é refratário à atividade liásica de  $\text{pol}\beta$ . Neste caso, as polimerases  $\beta$  ou  $\delta/\epsilon$ , associadas à PCNA e várias outras proteínas (como Fen1, PARP1, LigI), realizam a síntese de DNA para o preenchimento do *gap*, resultando em deslocamento de 2 a 13 bases da fita anterior (o fragmento deslocado é denominado *flap*). A síntese é seguida por clivagem do segmento deslocado por uma *flap* endonuclease (Fen1), passo esse que precede a ligação da fita (Figura 2) (Lindahl e Wood, 1999).



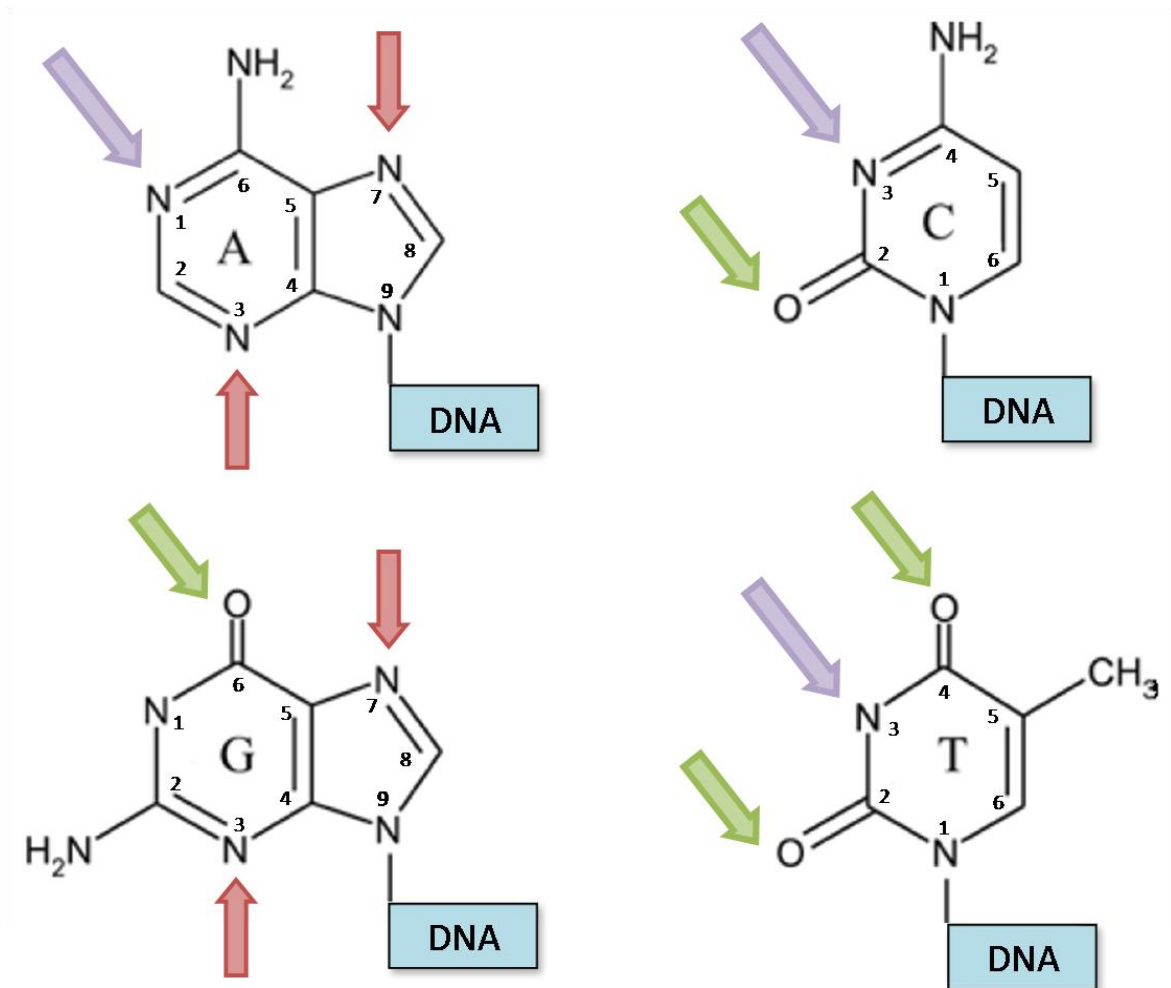
**FIGURA 2 – Via de Reparo por Excisão de Bases.** Representação das vias curta e longa do BER, iniciadas por uma DNA glicosilase, seguida pela incisão da fita por APE1. O processamento do terminal 5' e o preenchimento do *gap* são feitos pela pol $\beta$  na via curta. A quebra é selada pelo complexo XRCC1/LigIII $\alpha$ . Na via longa, o terminal 5' é refratário à atividade de pol $\beta$  e o complexo de reparo é modificado. A incorporação de nucleotídeos é feita por pol $\beta$  ou pol $\delta/\epsilon$ , acompanhada por deslocamento de fita. A fita deslocada é removida por Fen1. A ligação é feita por Lig1. Adaptado de Almeida e Sobol, 2007.

Alternativamente, o reparo pelas proteínas do BER pode ser iniciado por hidrólise espontânea da ligação *N*-glicosídica, que gera sítios AP, ou pela presença de quebras no DNA (SSBs) que apresentem terminais diferentes de 3'-OH e 5'-P (revisado por Almeida e Sobol, 2007).

### **1.2.2. DANOS CAUSADOS POR AGENTES ALQUILANTES**

Agentes alquilantes são substâncias químicas que introduzem grupos metil ou etil em átomos de nitrogênio ou oxigênio disponíveis nas bases do DNA (Figura 3), produzindo inúmeras lesões potencialmente citotóxicas e mutagênicas, que causam atraso na replicação, bloqueio na transcrição ou disparam vias de *ckeckpoints* ou apoptose (revisto por Nieminuszczy e Grzesiuk, 2007). Além de dispersos no ambiente, agentes alquilantes são gerados no meio intracelular, como produtos do metabolismo normal. De acordo com o modo de ação, são divididos em dois tipos:  $S_N1$ , que reagem com átomos de oxigênio e nitrogênio (ex.: MNNG ou *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina) e  $S_N2$ , que alquilam nitrogênios, principalmente (ex.: MMS ou metilmetano sulfonato). Em geral, átomos de nitrogênio que realizam ponte de hidrogênio em fitas dupla de DNA (ex.:  $N^3$  da citosina ou  $N^1$  da adenina) estão protegidos da ação de agentes alquilantes (Falnes e Rognes, 2003), porém são prontamente atacados em DNA de fita simples ou RNA (revisto por Drablos *et al.*, 2004). Dentre as substâncias endógenas que metilam espontaneamente o DNA, destaca-se a SAM (S-adenosilmetionina), principal doador biológico de grupamentos metila (Lu, 2000), além de produtos de peroxidação de lipídios e nitrosação de glicinas (Shuker e Margison, 1997; Garcia-Santos *et al.*, 2001).

O principal produto de metilação de DNA é a 7-metilguanina (7meG). Essa modificação não é mutagênica nem citotóxica, porém enfraquece a ligação *N*-glicosídica da base, resultando na formação de sítios AP, ou favorece a abertura do anel de imidazol,



**FIGURA 3 – Possíveis sítios de alquilação de bases no DNA.** Setas vermelhas indicam sítios alquilados pela maioria dos agentes; setas verdes indicam os principais sítios modificados por agentes do tipo  $S_N1$  e setas roxas indicam os principais sítios de atuação de agentes  $S_N2$  em DNA de fita simples. Adaptado de Nieminuszczy e Grzesiuk, 2007.

gerando a lesão altamente mutagênica 7me-FapyG. (Tudek *et al.*, 1992). As lesões 3-metiladenina (3meA) e  $O^6$ -metilguanina ( $O^6$ -meG) são as maiores responsáveis pelos efeitos biológicos dos agentes metilantes em DNA de dupla fita (Singer, 1976). A 3-meA, talvez o mais tóxico produto de metilação, é um potente bloqueador de replicação e resulta em indução de TP53, parada de ciclo celular em fase S, aberrações cromossômicas e apoptose (Engelward *et al.*, 1998). A  $O^6$ -meG é uma lesão mutagênica, que faz pareamento incorreto com a timina durante a replicação, provocando transições GC→AT.

### 1.2.3. RESPOSTA CELULAR A AGENTES ALQUILANTES

Para conter os efeitos citotóxicos e mutagênicos dos agentes alquilantes, as células valem-se principalmente de dois mecanismos: (i) reparo direto das lesões por metiltransferases (que transferem grupamentos metila não-nativos das bases lesionadas para resíduos de aminoácidos internos) ou desmetilases oxidativas e (ii) excisão de lesões metiladas por glicosilases específicas do BER (revisado por Nieminuszczy e Grzesiuk, 2007). Além disso, o MMR atua no reconhecimento e correção de erros de pareamento envolvendo bases metiladas, como a  $O^6$ -meG (revisado por Casorelli *et al.*, 2008). Os dois primeiros mecanismos fazem parte de uma resposta adaptativa a agentes alquilantes presente em *E. coli*, induzida após exposição a pequenas doses desses reagentes. Altamente conservada, a resposta adaptativa (ou resposta Ada) envolve quatro genes em *E. coli*: *Ada*, *AlkA*, *AlkB* e *AidB* (revisado por Kleibl, 2002). O componente-chave dessa resposta é o produto do gene *Ada*, uma proteína multifuncional que ativa a própria expressão e a dos outros três genes, além de apresentar atividade  $O^6$ G-metiltransferase. Em eucariotos, a homóloga de *Ada* é a proteína MGMT ou  $O^6$ -metilguanina DNA metiltransferase. Essa enzima “suicida” remove o grupo metil da posição  $O^6$  da guanina e o transfere para um resíduo interno de cisteína. Ao fazê-lo, a proteína torna-se irreversivelmente inativa

(Lindahl e Wood 1999). A glicosilase AlkA reconhece e remove um amplo espectro de lesões, incluindo a 3-meA. A proteína AlkB (e seus homólogos ABH em humanos) é uma dioxigenase dependente de  $\text{Fe}^{+2}$ , que repara especificamente lesões geradas por agentes  $\text{S}_{\text{N}}2$  (como 1meA e 3meC) em DNA de fita simples ou RNA (tRNA, rRNA, ou mRNA) (Falnes *et al.*, 2002; Aas *et al.*, 2003). O papel da proteína AidB ainda é incerto. Alguns autores sugerem que a proteína atue na degradação de agentes alquilantes endógenos e na proteção de DNA contra tais substâncias (Bowles *et al.*, 2008). Conforme mencionado, a conservação dos mecanismos adaptativos ao longo da evolução evidencia a importância do reparo de danos de alquilação.

#### **1.2.4. DANOS CAUSADOS POR ESTRESSE OXIDATIVO**

A oxidação, no que diz respeito à modificação de bases, representa o principal fator endógeno de danos ao DNA, sendo estimada a formação de 10 000 bases oxidadas por dia por célula de mamífero. Mais de cem tipos diferentes de modificações causadas por ROS no DNA já foram identificadas, incluindo lesões de bases, sítios AP, lesões de desoxirribose, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e *crosslinks*, muitas das quais apresentam propriedades citotóxicas e/ou mutagênicas (Cadet *et al.*, 1997).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são constantemente formadas na célula como produtos secundários da respiração aeróbica. Ao longo da cadeia transportadora de elétrons, ocorre a passagem de elétrons por várias moléculas receptoras, sendo a energia livre resultante dessas transferências parcialmente captada na forma de ATP. O oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), o último a receber os elétrons, é normalmente reduzido a  $\text{H}_2\text{O}$ . A redução incompleta de  $\text{O}_2$ , por outro lado, dá origem ao radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ). Este apresenta baixa reatividade, porém, quando escapa da cadeia transportadora, provoca efeitos adversos por ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela enzima

superóxido dismutase (SOD) e, em seguida, a radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), que apresenta altíssima reatividade (Michiels *et al.*, 1994). O ânion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  induz ainda a formação de  $\cdot\text{OH}$  pela reação de Haber-Weiss ( $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ). A molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode ser reduzida a  $\text{H}_2\text{O}$  pelas enzimas catalase e glutathiona peroxidase. No entanto, na presença de metais como ferro e cobre, pode ser reduzida a  $\cdot\text{OH}$  por uma reação do tipo Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{+3}$ ). Esses são os principais exemplos da geração endógena das espécies reativas de oxigênio de maior importância biológica ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\cdot\text{OH}$ ). Além da cadeia respiratória, ROS são formadas como subprodutos do metabolismo de biomoléculas ou produzidas durante a resposta inflamatória, por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (revisado por Valko *et al.*, 2006). Ainda, são decorrentes da exposição da célula a fatores ambientais, como raios X e raios  $\gamma$  (que produzem  $\cdot\text{OH}$  pela radiólise da água) e substâncias químicas diversas.

Conforme mencionado, o aumento intracelular de ROS causa danos a diversas biomoléculas e caracteriza uma situação de estresse oxidativo. No curso da evolução, os organismos desenvolveram diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios de danos oxidativos (ou reduzir o custo do próprio metabolismo), incluindo um intrincado sistema de defesa antioxidante (composto por SOD, glutathiona peroxidase, catalase, peroxiredoxinas) (Finkel e Holbrook, 2000) e diversos mecanismos de reparo do DNA, dos quais se destaca o reparo por excisão de bases (BER) (Friedberg *et al.*, 1995). Dentre os diversos danos causados por ROS no DNA, o BER está envolvido no reparo de lesões em bases, erros de pareamento, sítios AP e quebras de fita simples (Friedberg *et al.*, 1995).

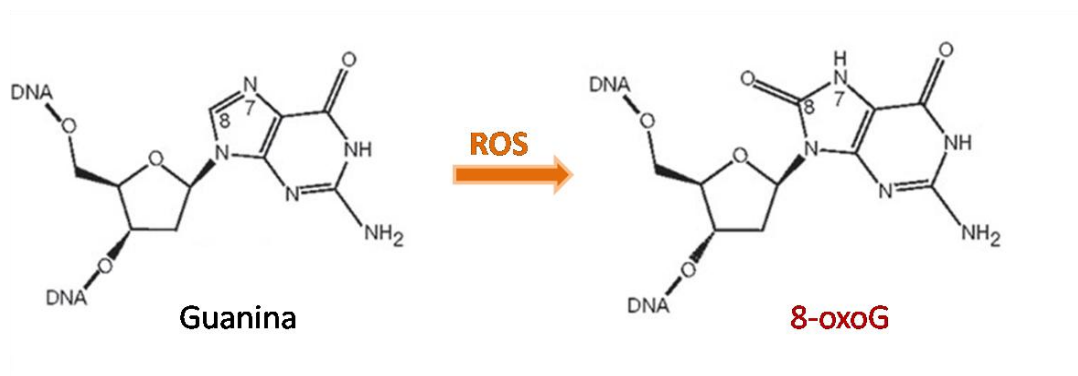


### 1.2.5. 8-oxoG E SISTEMA GO

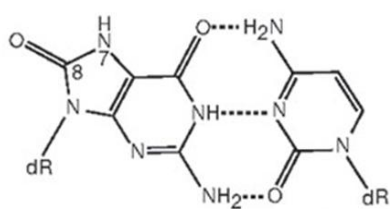
Dentre os quase 50 tipos identificados de lesões de base causadas por estresse oxidativo, a lesão 8-oxoG (8-oxoguanina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina, muitas vezes referida como **GO**) (Figura 4) é uma das mais abundantes e bem caracterizadas (Dizdaroglu *et al.*, 2002). A 8-oxoG é formada em altas quantidades, pela reação de diferentes moléculas oxidantes com o DNA, mas principalmente pelo radical  $\cdot\text{OH}$  (Devasagayam *et al.*, 1991). Apresenta propriedades mutagênicas, devido à capacidade de realizar pareamento com a adenina durante a replicação (Figura 4), o que pode resultar, predominantemente, em alta frequência de transversões GC→TA (Wood *et al.*, 1992). Altas concentrações de 8-oxoG são encontradas no DNA nuclear e mitocondrial de diferentes tipos de células, embora seus valores basais absolutos, que refletem o balanço entre a geração contínua da lesão e sua remoção, sejam controversos (Collins *et al.*, 1997).

Em *Escherichia coli*, três diferentes enzimas, que constituem o **Sistema GO**, cooperam simultaneamente para prevenir a mutagênese espontânea causada pela 8-oxoG: Fpg, MutY e MutT (Michaels e Miller, 1992) (Figuras 5 e 6). Fpg é uma DNA glicosilase bifuncional que reconhece e remove especificamente a lesão 8-oxoG quando pareada a citosina (Boiteux *et al.*, 1987). Seu homólogo funcional em eucariotos é a enzima Ogg1, que também apresenta atividade AP liásica e realiza excisão da base seguida pela clivagem do DNA a 3' do sítio AP por uma reação de  $\beta$  eliminação (van der Kemp *et al.*, 1996). Em mamíferos, a clivagem da fita parece não ser efetivamente realizada por Ogg1 em condições fisiológicas, já que a atividade AP liásica desta enzima é bastante baixa (Bjorås *et al.*, 1997). Na verdade, a atividade glicosilásica de Ogg1 parece ser estimulada (e a sua atividade AP liásica desfavorecida) por proteínas de etapas subsequentes da via de reparo, como APE1 e XRCC1 (Hill *et al.*, 2001). Este fato é consistente com o mecanismo de

A)



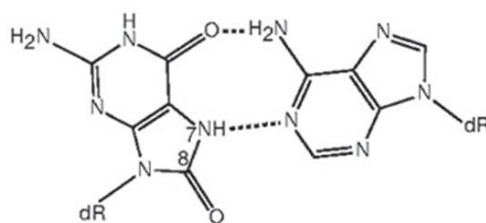
B)



**8-oxoG (anti)**

**dC**

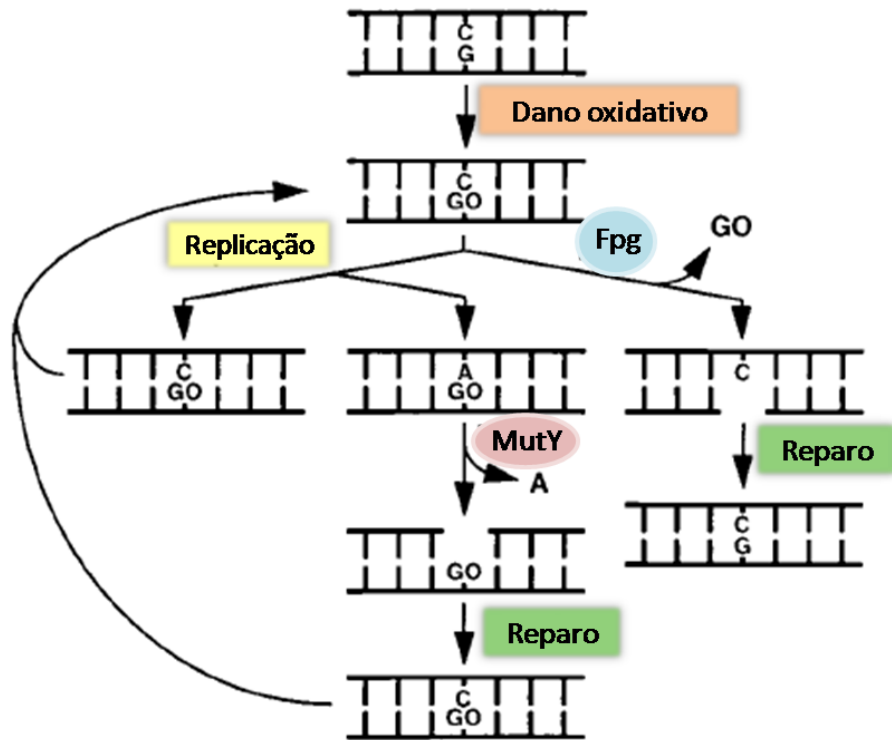
C)



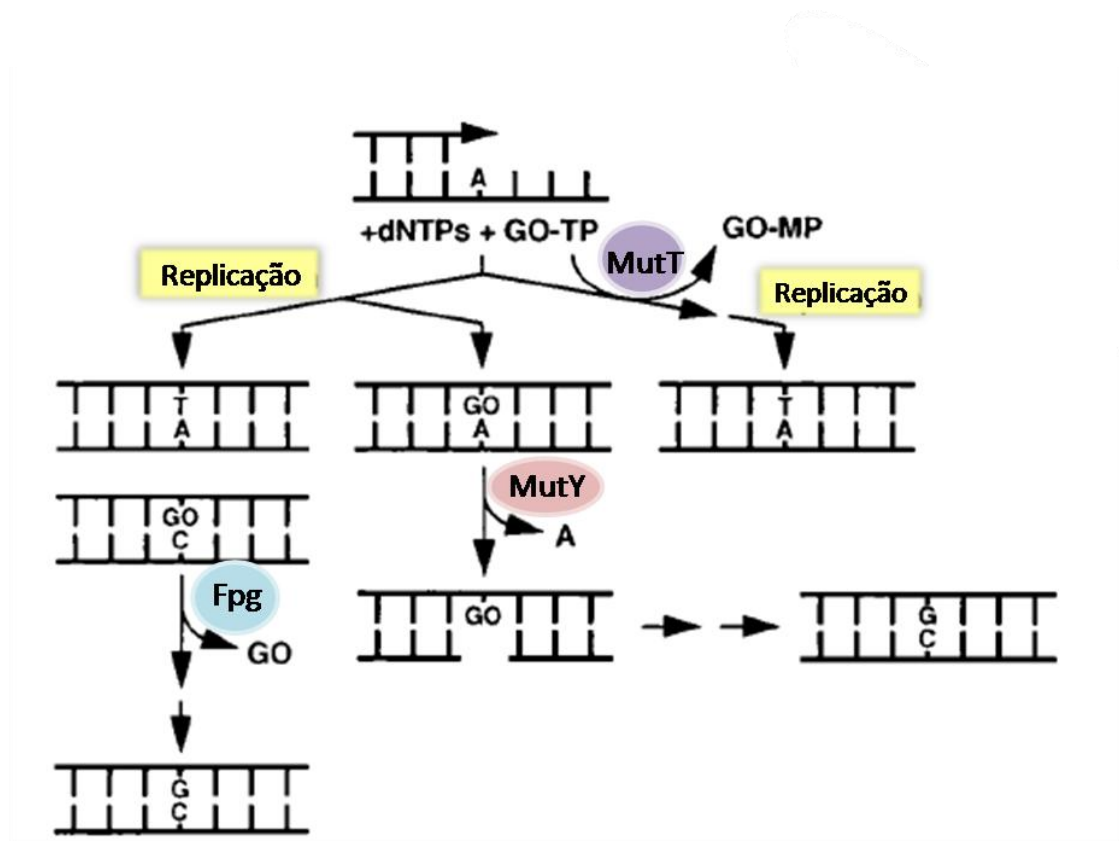
**8-oxoG (syn)**

**dA**

**FIGURA 4 – A lesão 8-oxoguanina.** (A) Oxidação da guanina em  $C^8$  por espécies reativas de oxigênio (ROS). (B) 8-oxoG pareada com dC em um par de bases tipo Watson-Crick. Linhas pontilhadas indicam prováveis pontes de hidrogênio. (C) 8-oxoG na conformação *syn* pareada a dA (*anti*) em um pareamento do tipo Hoogsteen.



**FIGURA 5 – Sistema GO: Fpg e MutY.** O estresse oxidativo gera a lesão 8-oxoG (ou GO) no DNA. Essa lesão pode ser removida pela glicosilase Fpg (Ogg1) e o reparo subsequente restaurar o par GC original. Caso a lesão não seja removida antes da replicação, é provável que polimerases replicativas incorporem A frente a GO. MutY remove a adenina erroneamente inserida do par A:GO. As polimerases que participam do reparo são menos propensas a erro durante a síntese translesão e podem gerar um par GO:C, substrato de Fpg.



**FIGURA 6 – Sistema GO: Fpg, MutY e MutT.** A oxidação do *pool* de nucleotídeos pode gerar 8-oxo-dGTP. Caso 8-oxo-dGTP não seja hidrolisada a 8-oxo-dGMP por MutT, pode ser incorporada frente a A, gerando o par A:GO, substrato de MutY. A ação de MutY remove a base molde (adenina), fixando a mutação AT→GC. 8-oxo-dGTP também pode ser incorporada frente a C, gerando o par C:GO, substrato de Fpg. Adaptada de Slupska *et al.*, 1996.

“passagem de bastão” proposto para o BER, em que interações cooperativas entre enzimas e suas sucessoras coordenam as etapas sequenciais dessa via de reparo, prevenindo a formação de intermediários perigosos (Wilson e Kunkel, 2000).

Alguns resíduos de 8-oxoG não são reparados por Fpg (ou Ogg1) e persistem no DNA até a próxima replicação. Nesses casos, considerando que polimerases replicativas preferencialmente incorporam adenina frente a 8-oxoG (de 5 a 200 vezes mais frequentemente que citosina), é alta a probabilidade de, em um segundo *round* de replicação, ocorrer uma transversão GC→TA no local da lesão (Shibutani *et al.*, 1991). Para minimizar este problema, a glicosilase MutY remove adenina do par 8-oxoG:A (e deve atuar antes do segundo *round* de replicação envolvendo a lesão), gerando um *gap* que será preenchido pelo BER (Figura 5) (Michaels *et al.*, 1990). A síntese de DNA durante o reparo normalmente restaura o par 8-oxoG:C (uma vez que a polimerase envolvida no reparo incorpora C, preferencialmente), criando uma nova oportunidade para a retirada de 8-oxoG por Fpg (Shibutani *et al.*, 1991). Em eucariotos, os homólogos de MutY são as enzimas MYH (Slupska *et al.*, 1996).

O *pool* de nucleotídeos também é alvo de oxidação e GTPs são atacados por ROS, formando 8-oxodGTPs. Em *E. coli*, em condições de estresse oxidativo, nucleotídeos presentes no *pool* são, na verdade, os principais alvos de oxidação pelo radical  $\cdot\text{OH}$  (Nunoshiba *et al.*, 2002). Quando 8-oxo-dGTP é erroneamente incorporado frente à adenina no molde de DNA, a ação da glicosilase MutY favorece a fixação da transversão AT→CG, pois remove a base correta do par 8-oxoG:A, a adenina (Tajiri *et al.*, 1995). Dessa forma, é importante que nucleotídeos oxidados, principalmente 8-oxo-dGTPs, sejam eliminados do *pool* de nucleotídeos. Essa função é realizada pela terceira proteína do sistema GO, a hidrolase MutT, que previne a incorporação de 8-oxodGTP no

DNA, hidrolisando o trifosfato oxidado a monofosfato (8-oxo-dGMP) (Maki e Sekiguchi, 1992). Em eucariotos, os homólogos funcionais de MutT são as enzimas MTH1 (Sakumi, *et al.*, 1993). Em leveduras, que não apresentam MTH1, proteínas com domínio Nudix realizam a “limpeza” do *pool* de nucleotídeos (Nunoshiba *et al.*, 2004).

A importância do sistema GO pode ser evidenciada pelo elevado fenótipo mutador apresentado por *E. coli* deficientes nos genes *fpg*, *mutY* e *mutT*. As frequências de transversões GC→TA e AT→GC são até 800 vezes maiores em *E. coli* duplo mutantes *fpg- mutY-* (Michaels e Miller, 1992) e até 1000 vezes maiores em mutantes *mutT-*, quando comparadas às células selvagens (Akiyama *et al.*, 1987).

## **1.3. O REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO (MMR)**

### **1.3.1. O MMR EM PROCARIOTOS**

O reparo de erros de pareamento (ou MMR) 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 (Thomas *et al.*, 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.

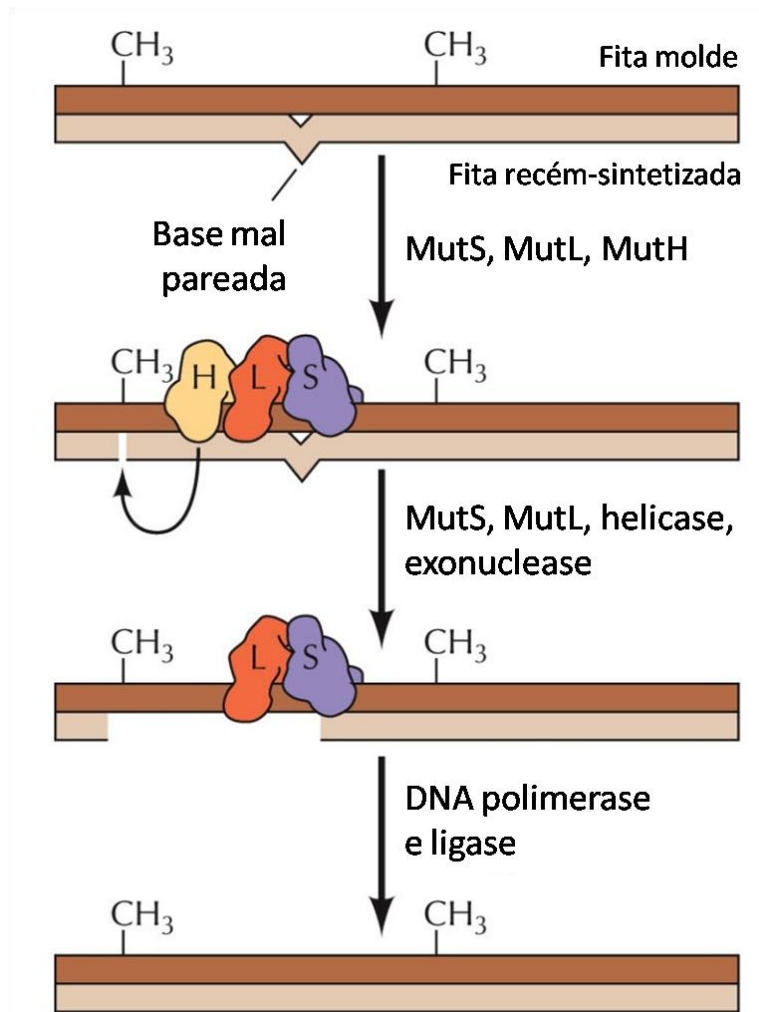
Oito diferentes tipos de erros de pareamento podem ser gerados durante a replicação, além de estruturas em forma de alça resultantes de inserções ou deleções de nucleotídeos em uma das fitas de DNA. O MMR reconhece com eficiência a maioria dos

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 7). 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 sequência GATC, sua ligação com MutL forma uma alça no DNA. MutL ativa MutH, que cliva o DNA a 5' da sequência 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).

### **1.3.2. O MMR EM EUKARIOTOS**

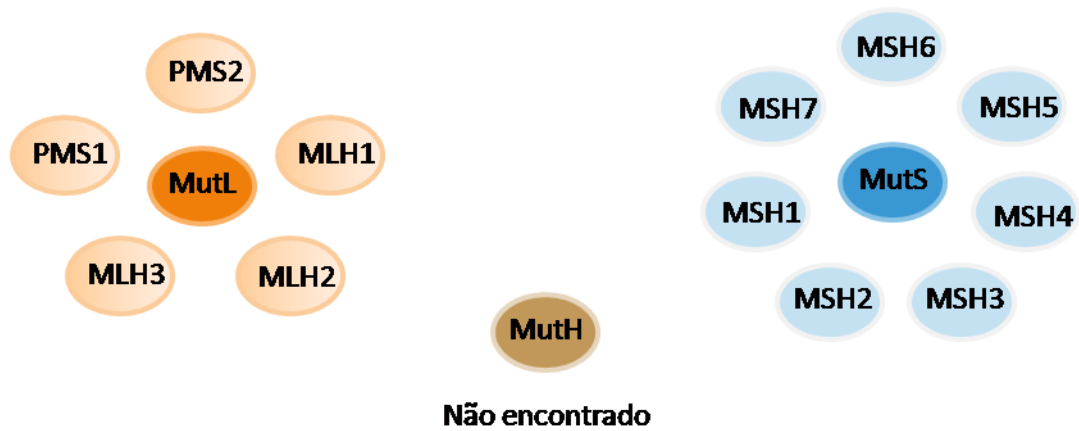
A via de MMR foi conservada durante a evolução, porém não é inteiramente conhecida em eucariotos. A complexidade dessa via nesses organismos é maior que a encontrada em procariotos, de modo que há ainda mais dúvidas quanto aos detalhes do processo de reparo. Existem vários homólogos de MutS e MutL em eucariotos, denominados MSH e MLH (Figura 8). Essas proteínas formam heterocomplexos que exercem funções múltiplas, tais como reconhecimento e reparo de erros de pareamento, alças de inserções ou deleções e junções de Holliday. É interessante notar a presença de MSH2 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 ela atue em substratos variados e vias diversas. Apesar de homólogos eucarióticos de MutH não terem sido encontrados,



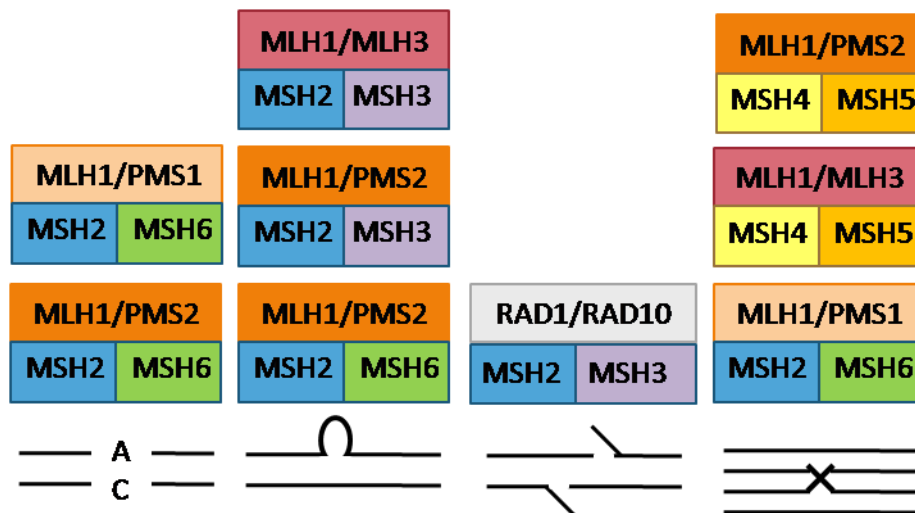
**FIGURA 7: MMR em procariotos.** Para a correção de bases mal incorporadas, é necessária distinção entre a fita molde e a fita recém sintetizada. Em procariotos, logo após a replicação, as adeninas no contexto GATC estão metiladas apenas na fita molde. O processo de reparo se inicia com a ligação do homodímero de MutS ao erro de pareamento. Então, MutL é recrutada e ativa MutH, que cliva a fita não metilada a 5' da sequência GATC mais próxima (acima ou abaixo do erro de pareamento). O fragmento desde o local de clivagem até o erro de pareamento é removido por uma exonuclease, auxiliada por uma helicase e por proteínas de ligação a fita simples. A distância entre o *mismatch* e o sítio GATC pode chegar a 1000 pb, o que torna o MMR um processo bastante dispendioso. Adaptada de *The Cell*, 4ª edição.



## A) Divergência genética de MutS e MutL



## B) MMR Eucariótico



**FIGURA 8 – Representação esquemática do MMR eucariótico.** (A) As proteínas MutL e MutS procarióticas apresentam cinco e sete ortólogos em eucariotos, respectivamente. (B) Em eucariotos, as proteínas MSH e MLH formam complexos heterodiméricos que reconhecem vários tipos de substratos, dentre eles: erros de pareamento, quebras de fita simples geradas por processos de recombinação homóloga e junções de Holliday, representadas na figura, nessa ordem. Adaptada de Nakagawa *et al.*, 1999.

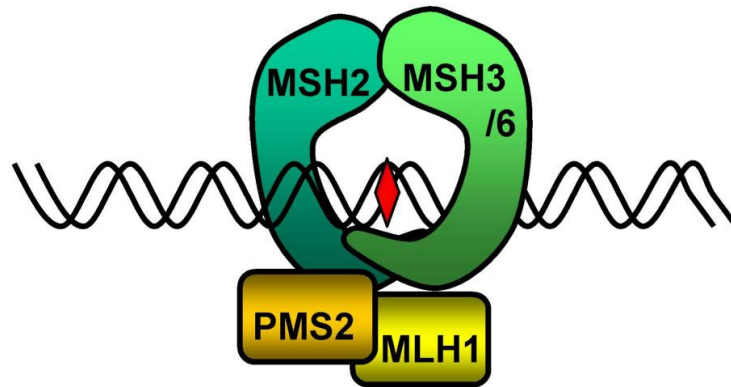
um trabalho recente (Kadyrov *et al.*, 2006) demonstrou que, ao menos em humanos, a função de MutH seria suprimida pelo heterodímero MLH1-PMS2, que apresenta uma atividade endonucleásica ativada por erros de pareamento (entre outros fatores) e afinidade *in vitro* de 10 a 20 vezes maior por fitas descontínuas de DNA, em relação a fitas contínuas (Figura 9).

Além da correção de erros de pareamento após a replicação do DNA, diversas proteínas do MMR participam de outros processos celulares, como o disparo de vias de apoptose após o reconhecimento de determinadas lesões (como as causadas por MNNG, cisplatina e UVB) (revisado por O'Brien e Brown, 2006) o reconhecimento de lesões oxidativas no DNA (Boiteux *et al.*, 2002; Colussi *et al.*, 2002; Macpherson *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2007), a regulação de eventos de recombinação entre sequências divergentes (Rayssiguier *et al.*, 1989; Emmanuel *et al.*, 2006), dentre outros. A capacidade de reconhecimento de diversas estruturas no DNA é conferida pela interação das proteínas do MMR entre si e com fatores acessórios, como Rad1 e Rad10, dentre outros (Nakagawa *et al.*, 1999).

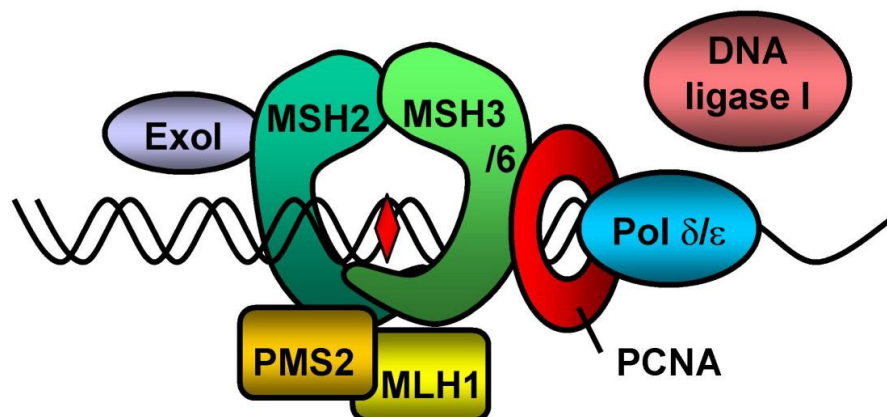
### **1.3.3.0 PAPEL DO MMR DO REPARO DE 8-OXOG**

Apesar do papel principal do Sistema GO no controle da mutagênese por 8-oxoG, estudos sugerem cada vez mais que o MMR é uma importante via alternativa de controle dos níveis de 8-oxoG no DNA. O heterodímero de MSH2-MSH6 é capaz de reconhecer a lesão em determinados contextos, tanto em células humanas quanto em *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* (Macpherson *et al.*, 2005, Boiteux *et al.*, 2002; Wyrzykowski e Volkert, 2003). Além disso, estudos com camundongos deficientes em MSH2 (De Weese *et al.*, 1998; Egashira *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2007) mostram uma redução no reparo de 8-oxoG, após exposição à radiação ionizante, e aumento no nível

## A) Iniciação



## B) Excisão e ressíntese



**FIGURA 9: MMR em eucariotos.** (A) Iniciação do MMR pelos complexos MutS- $\alpha$  (MSH2-MSH6) MutS- $\beta$  (MSH2-MSH3), através do reconhecimento do erro de pareamento ou de alça de fita simples, seguido pelo recrutamento do complexo MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2). Nas etapas seguintes, de excisão e ressíntese, tem sido sugerida a participação de PCNA, DNA polimerase  $\delta/\epsilon$  e helicase I. Adaptada de Bellacosa, 2001.

desta lesão em diversos tecidos, indicando a participação de MSH2 na correção de danos oxidativos. Resultados obtidos por Colussi e colaboradores (2002) com células de mamíferos sugerem que MSH2 removeria 8-oxoG incorporada no DNA a partir do *pool* de nucleotídeos, e não proveniente da oxidação de guaninas no DNA. Um estudo posterior (Russo *et al.*, 2004) reforça esses dados, quando mostra que o fenótipo mutador de linhagens celulares *Msh2*<sup>-/-</sup> ou *Msh6*<sup>-/-</sup> é abolido pela superexpressão de MTH1, homólogo de MutT, que retira guaninas oxidadas do *pool* de nucleotídeos.

## 1.4. TAXA DE MUTAÇÃO

Apesar de o reparo de DNA ser crucial para a manutenção da integridade genômica em todos os organismos, o surgimento de variação no conteúdo genômico, gerando novos caracteres, que podem permitir maior adaptação a novas condições ambientais, também é essencial para o sucesso evolutivo. Sem mutações, seria impossível alcançar adaptação.

A taxa de mutação espontânea em um organismo (expressa em número de mutações por genoma por replicação) é relativamente constante entre diferentes organismos, com diferentes tamanhos de genoma (Drake *et al.*, 1998) e reflete o balanço entre os processos químicos e biológicos que geram as mutações e os processos biológicos que suprimem as mutações (Glassner *et al.*, 1998). Esse balanço pode eventualmente ser alterado, promovendo fenótipos mutadores ou antimutadores.

Fenótipos mutadores podem ser gerados por um conjunto de fatores como: defeitos em vias de reparo de DNA (Miller, 1996), elevada exposição a agentes mutagênicos, defeitos na atividade revisora de DNA polimerases (Scheuermann e Echols, 1984), síntese translesão propensa a erros (Lawrence, 1994; Roche *et al.*, 1994), entre

outros. Dentre eles, alterações em mecanismos de controle da fidelidade de replicação do DNA (incluindo a inativação do MMR ou a indução de polimerases propensas a erro) parecem ser os principais responsáveis por aumentos na taxa de mutação e geração de variabilidade (Tenailon *et al.*, 2001).

Um fenótipo mutador pode conferir vantagem seletiva em ambientes adversos, através da maior geração de variabilidade e, portanto, maior adaptabilidade ao meio. No entanto, uma vez que a maioria das mutações são deletérias ou neutras, o acúmulo de mutações indesejadas, promovido por um fenótipo mutador, pode resultar em perda de *fitness*. Dessa forma, quando o ambiente se torna constante, o fenótipo mutador já não é mais favorável à célula adaptada e as células devem, assim, perder a característica mutadora (o que pode ser obtido, por exemplo, através da transferência horizontal de genes). Alternativamente, o próprio estresse ambiental pode ser a fonte de um fenótipo mutador transiente, suficiente para gerar variabilidade justamente no momento em que ela é necessária (Kang *et al.*, 2006). Os mecanismos através dos quais o estresse ambiental aumenta a frequência de mutações são o dano direto no DNA e, principalmente, a indução de respostas globais de tolerância, como a síntese translesão propensa a erros ou a regulação negativa de genes do MMR, através da ativação de respostas SOS.

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 reverterem por um evento específico de transição, transversão ou *frameshift*. 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. Portanto, este sistema pode ser utilizado para testar diretamente a especificidade da mutação. 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 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.

## **1.5. REPARO DE DNA EM ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Apesar de todas as espécies conhecidas apresentarem proteínas de reparo de DNA, o conhecimento acerca dessas vias tem sido produzido principalmente em estudos com bactérias, leveduras, camundongos e em humanos. No entanto, tendo em vista a importância do sistema de reparo, novos estudos têm surgido envolvendo também outros organismos. Particularmente, o entendimento das vias de reparo em organismos patogênicos pode auxiliar uma melhor compreensão da biologia desses organismos e a obtenção de novos alvos para desenho de drogas.

### **1.5.1.      *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS**

*O Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas, uma enfermidade crônica 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, por 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.

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 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).

### **1.5.2. VARIABILIDADE INTRA-ESPECÍFICA EM *T. 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). 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**olymorphic **D**N.A) 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 da 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. Mais recentemente, extensas análises de diferentes



marcadores sugeriram a existência de uma terceira linhagem independente de *T. cruzi* (Freitas *et al.*, 2006).

Um possível cenário para a evolução das atuais linhagens desse parasita, em que pelo menos três grupos ancestrais teriam existido (*T. cruzi* I, II e III) foi proposto por nosso grupo (Freitas *et al.*, 2006). Eventos de hibridização teriam ocorrido entre *T. cruzi* II e III, produzindo linhagens híbridas atuais como a linhagem CL Brener, a qual teve seu genoma totalmente sequenciado (El-Sayed *et al.*, 2005). Essas hibridizações teriam sido ocasionais e subsequentemente estabilizadas por eventos frequentes de propagação clonal. De modo interessante, *T. cruzi* III teria sido o doador de material citoplasmático nessas hibridizações e *T. cruzi* II/III doadores de material nuclear (uma vez que todos os híbridos analisados até o momento possuem mitocôndria característica de *T. cruzi* III e material nuclear característico de *T. cruzi* II/III). De fato, eventos de hibridização entre cepas de *T. cruzi* já foram demonstrados em laboratório (Gaunt *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, estudos sugerem que a variabilidade genética presente entre as cepas do grupo II é maior que aquela presente entre as cepas do grupo *T. cruzi* I (Brisse *et al.*, 2001, Buscaglia e DiNoia, 2003; Mathieu-Daude *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008). 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 (Fernandes *et al.*, 1999 e Freitas *et al.*, 2005). 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 (Machado *et al.*, 2006).

### 1.5.3. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA GERAÇÃO DE VARIABILIDADE EM *T. CRUZI*

Apesar do grande volume de dados descrevendo a variabilidade genética da espécie e propondo a classificação das diferentes cepas, poucos estudos foram realizados buscando identificar os mecanismos responsáveis pela geração de variabilidade em *T. cruzi*. O entendimento desses mecanismos é necessário para que possamos compreender melhor a interação desse parasita e seus hospedeiros vertebrados.

Ao invadir células do hospedeiro, o *T. cruzi* escapa dos danos causados por uma eventual resposta imune humoral, porém ainda necessita de uma estratégia para garantir a eficiência da infecção e adaptação aos diferentes hospedeiros e às flutuações nas condições dentro do próprio hospedeiro. Um alto nível de polimorfismos parece representar uma potente arma para aumentar as chances de sobrevivência do parasita nessas condições, pois proporcionaria um meio de adesão a uma grande variedade de moléculas na membrana da célula hospedeira, além de favorecer o escape à resposta imune do hospedeiro (Frasch, 2000). Um estudo recente sugeriu que a frequência de mutações de ponto ao acaso em sequências codificadoras para genes nucleares tende a ser menor que em sequências de genes codificadores de proteína de superfície (Azuaje *et al.*, 2007), o que está de acordo com a hipótese da variabilidade como mecanismo de invasão/adaptação ao hospedeiro. Além disso, Cerqueira e colaboradores (2008) realizaram análises das sequências de genes de duas famílias multigênicas (Amastina e TcAg48) presentes no genoma de *T. cruzi*, possivelmente relacionadas a mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro e observaram que genes que codificam Amastina (uma glicoproteína de superfície de amastigotas) e TcAg48 (uma proteína de ligação a RNA reconhecida pelo soro de pacientes chagásicos), dispostos em *cluster* no genoma do parasito, apresentam alta

variabilidade intragenômica. De modo interessante, a variabilidade dessas sequências é ainda maior em cepas de *T. cruzi II*, quando comparadas a cepas de *T. cruzi I*.

Nosso grupo de pesquisa tem procurado compreender como a variabilidade genética é gerada em *T. cruzi*, buscando compreender o papel do metabolismo de DNA nesse processo. A ausência (ou baixa frequência) de recombinação sexuada implica em refinados mecanismos de controle entre o surgimento de mutações e processos de manutenção da estabilidade do genoma do parasito. Dessa forma, desenvolvemos estudos sobre MMR, BER, Sistema GO, recombinação homóloga e síntese translesão em *T. cruzi*, além de estudos sobre genes e proteínas dessas vias.

#### **1.5.4. METABOLISMO DE DNA EM *T. CRUZI***

É bem conhecida a participação do reparo de DNA em processos como mutagênese e recombinação, que podem ser importantes para a geração de variabilidade em *T. cruzi*. A maioria dos genes que codificam componentes da maquinaria de reparo de DNA foi identificada após o sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005), porém poucos estudos foram desenvolvidos acerca deste tema.

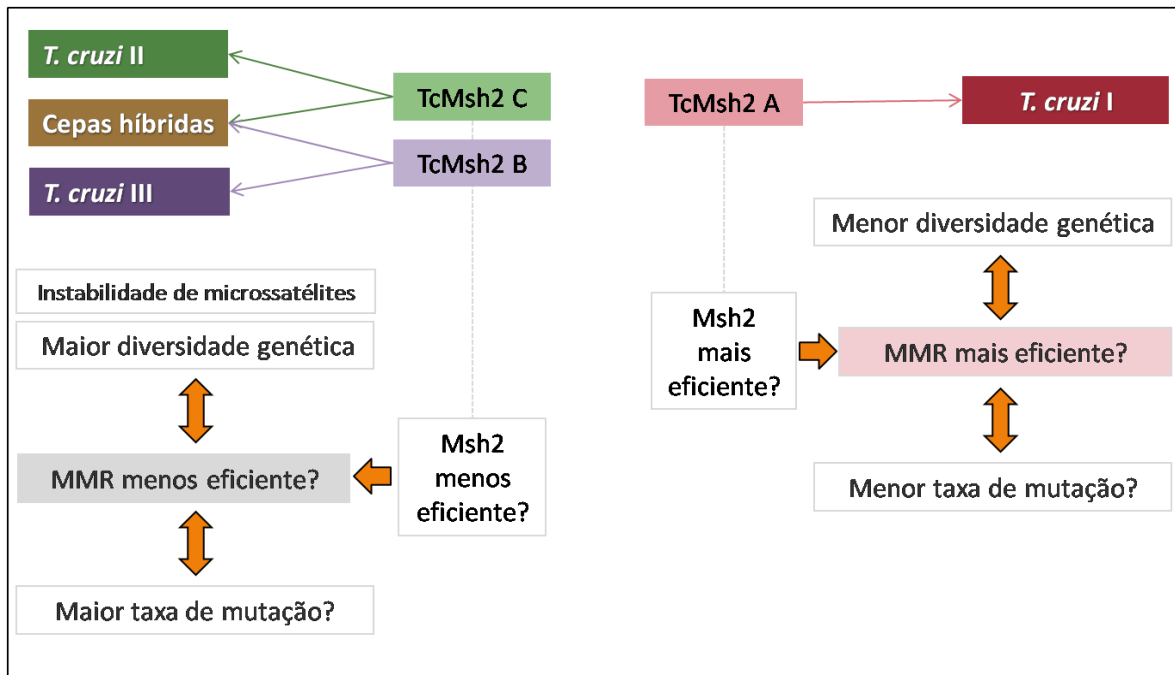
##### ***i. MMR***

As primeiras indicações de que *T. cruzi* possuía um MMR funcional foram obtidas através da clonagem e caracterização, nesse tripanossomatídeo, do gene *MSH2*, principal componente da via de reparo de erros de pareamento em eucariotos (Augusto-Pinto *et al.*, 2001; Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Posteriormente, um conjunto funcionalmente completo de genes envolvidos nessa via de reparo foi identificado através da análise da sequência completa do genoma desse organismo (El-Sayed *et al.*, 2005).

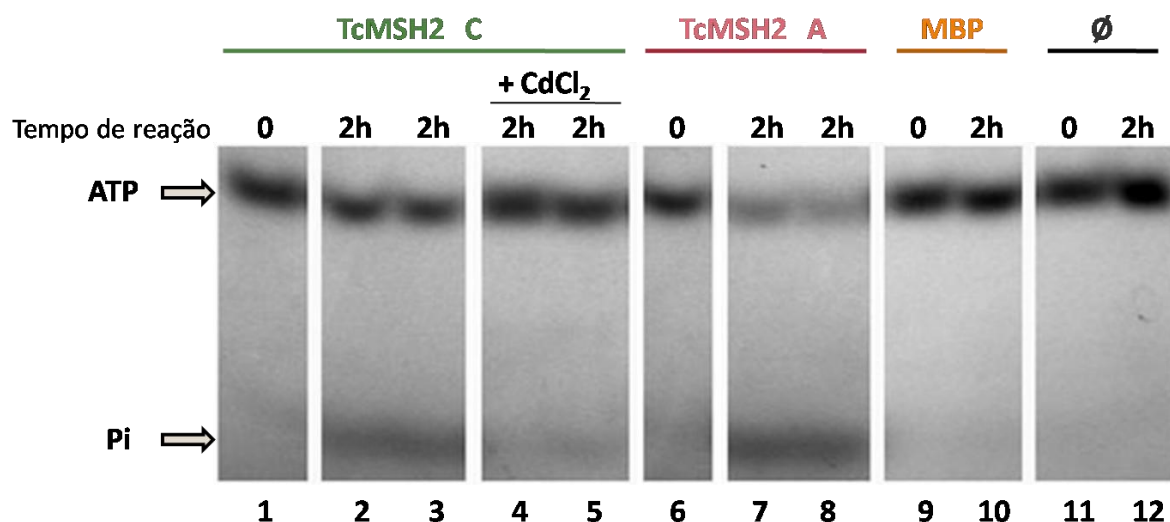
O gene TcMSH2 é um gene de cópia única, que possui uma fase aberta de leitura de 962 aminoácidos, uma identidade considerável com seus homólogos eucarióticos e é expresso constitutivamente em todos os estágios do ciclo de vida do parasito (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). O estudo com TcMSH2 de diferentes cepas de *T. cruzi* revelou a presença de polimorfismos na sequência desse gene, que indicam a existência de três isoformas da proteína MSH2 na espécie (TcMSH2A, TcMSH2B e TcMSH2C) (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Estes resultados sustentam a divisão da espécie *T. cruzi* em três linhagens principais (*T. cruzi* I, II e III), uma vez que cada isoforma é codificada por um desses grupos (Figura 10) (Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

Estudos posteriores compararam a ocorrência de instabilidade de microssatélites, após tratamento com peróxido de hidrogênio, entre linhagens celulares que codificam diferentes isoformas de TcMSH2 (Augusto-Pinto *et al.*, 2003, Machado-Silva, 2008). Os resultados indicaram que linhagens que codificam a isoforma C de TcMSH2 (*T. cruzi* II) apresentam menor eficiência no MMR, sob condições de estresse, quando comparadas a linhagens que apresentam a isoforma A (*T. cruzi* I) (Augusto-Pinto *et al.*, 2003, Machado-Silva, 2008). Estes dados estão de acordo com a maior variabilidade genética encontrada em linhagens do tipo II, uma vez que o MMR está diretamente relacionado ao controle da taxa de mutação em uma célula (Machado *et al.*, 2006).

Comparações entre as sequências protéicas das três isoformas de TcMSH2 mostraram a existência de substituições de aminoácidos em importantes domínios funcionais da proteína, como os responsáveis pela ligação ao *mismatch* e pela atividade ATPásica (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado-Silva, 2008). De fato, ensaios *in vitro* com TcMSH2 recombinante (Figura 11) indicaram que a isoforma A apresenta maior eficiência na atividade ATPásica, quando comparada à isoforma C (Machado-Silva, 2008). Além



**FIGURA 10 – Isoformas de TcMSH2 nas diferentes linhagens de *T. cruzi* e possíveis correlações com a eficiência do MMR, diversidade genética e taxa de mutação.**



Proteína	Tempo de Reação	ATP (%)
TcMSH2 C	0 h	100
	2 h	71,1 ± 5
TcMSH2 C + CdCl <sub>2</sub>	0 h	100
	2 h	101,7 ± 5,24
TcMSH2 A	0 h	100
	2 h	42,6 ± 5,46

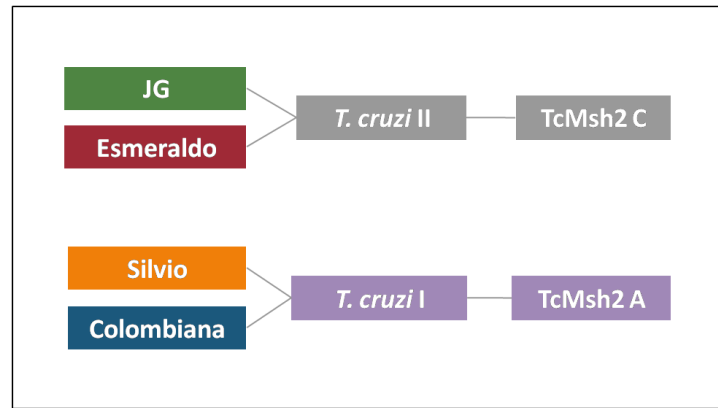
**FIGURA 11 - Atividade ATPásica de TcMSH2.** Gel de poliacrilamida 20% revelado em filme de fotografia mostrando o produto da reação de 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  com 2 pmol de TcMSH2C-MBP, em tampão apropriado, na ausência (linhas 1, 2 e 3) ou presença de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (linhas 4 e 5); o produto da reação de 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  com 2 pmol de TcMSH2A-MBP (linhas 6 a 8) ou com 2 pmol de MBP (linhas 9 e 10). A hidrólise de ATP é evidenciada pelo aparecimento de uma banda correspondente a Pi, indicada pela seta. O controle negativo foi realizado pela incubação de ATP a 37 °C em tampão de reação, na ausência de qualquer proteína (linhas 11 e 12). A radiação emitida pela banda correspondente ao ATP detectada pelo filme de fotografia foi quantificada, e seus valores relativos estão apresentados na tabela. (Fonte: Machado-Silva, 2008).

disso, foi visto que concentrações micromolares de cloreto de cádmio inibem a atividade ATPásica de TcMSH2C (Machado-Silva, 2008), o que está de acordo com dados na literatura que mostram que o cádmio, quando presente em baixas concentrações, é um inibidor específico do MMR, possivelmente pela inibição da atividade ATPásica de complexos envolvendo MSH2 (MSH2/MSH3 e MSH2/MSH6) (Jin *et al.*, 2003; Clark e Kunkel, 2004; Slebos *et al.*, 2006; Banerjee e Flores-Rozas, 2005).

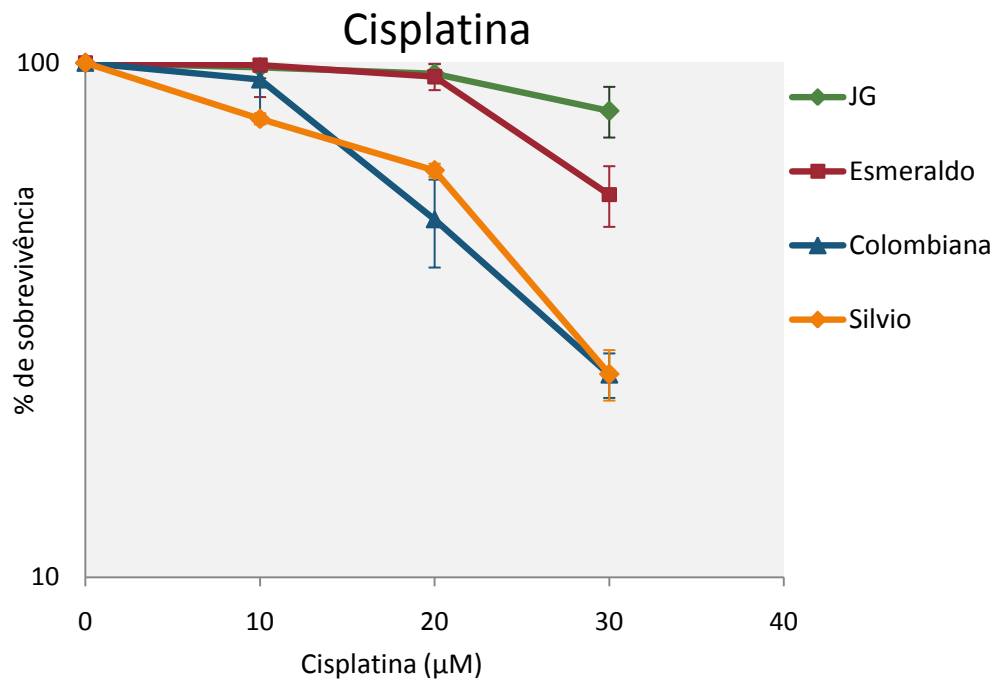
Ensaio de tolerância à cisplatina e MNNG (Campos *et al.*, artigo em preparação) utilizando quatro cepas de *T. cruzi* (Figura 12), também indicam maior eficiência do MMR em cepas que codificam a isoforma A de TcMSH2. Os fenótipos de tolerância à cisplatina (Fink *et al.*, 1996) e a MNNG (Adamson *et al.*, 2005) estão associados à baixa eficiência do MMR. Isto acontece porque proteínas do MMR (incluindo MSH2) podem atuar como sensores de determinados danos no DNA (como os causados por agentes alquilantes, como o MNNG, ou por drogas quimioterápicas, como a cisplatina), executando importante papel na ativação de *checkpoints* de ciclo celular e indução de apoptose quando esses danos ultrapassam certo limite crítico. Os ensaios mostram que cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I apresentaram maior sensibilidade em resposta ao tratamento com cisplatina ou MNNG, quando comparadas às cepas *T. cruzi* II.

Recentemente, estudos com TcMSH2 em um sistema heterólogo (linhagens de *Trypanosoma brucei* nocautes contendo o gene MSH2 deletado) indicaram ainda a participação de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo, de maneira independente de MLH1 (Machado-Silva, 2008). De fato, já é conhecida a participação de MSH2 no reconhecimento de erros de pareamento envolvendo lesões oxidativas (Ni *et al.*, 1999). Dessa forma, Campos e colaboradores (artigo em preparação) analisaram também a sobrevivência das cepas JG, Esmeraldo, Silvio e Colombiana em resposta ao estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os resultados (Figura 12D)

A)



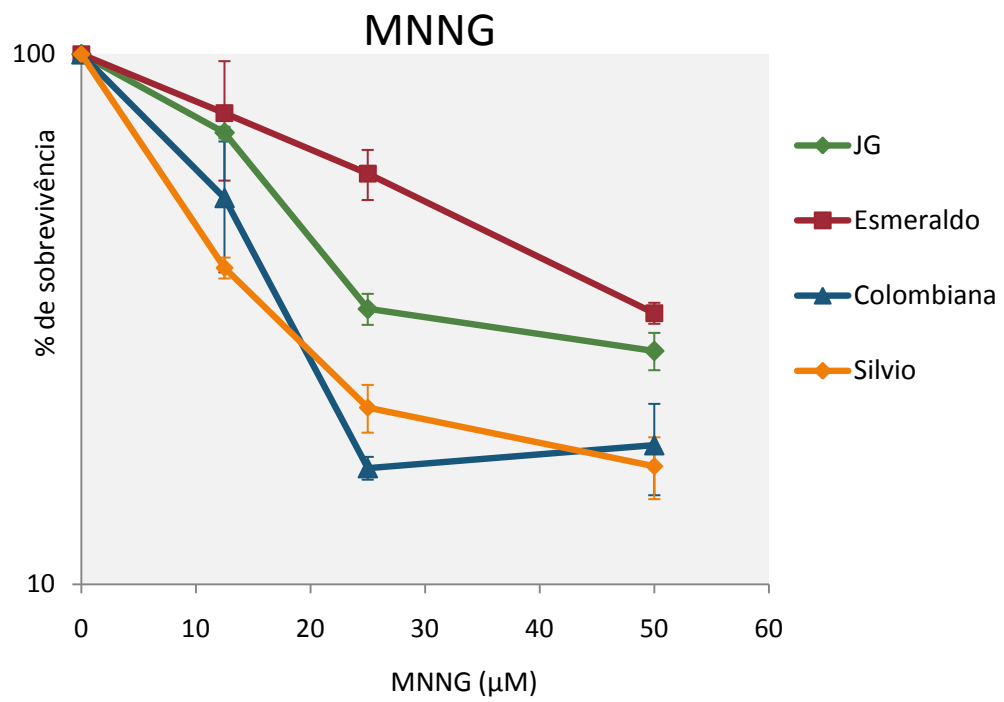
B)



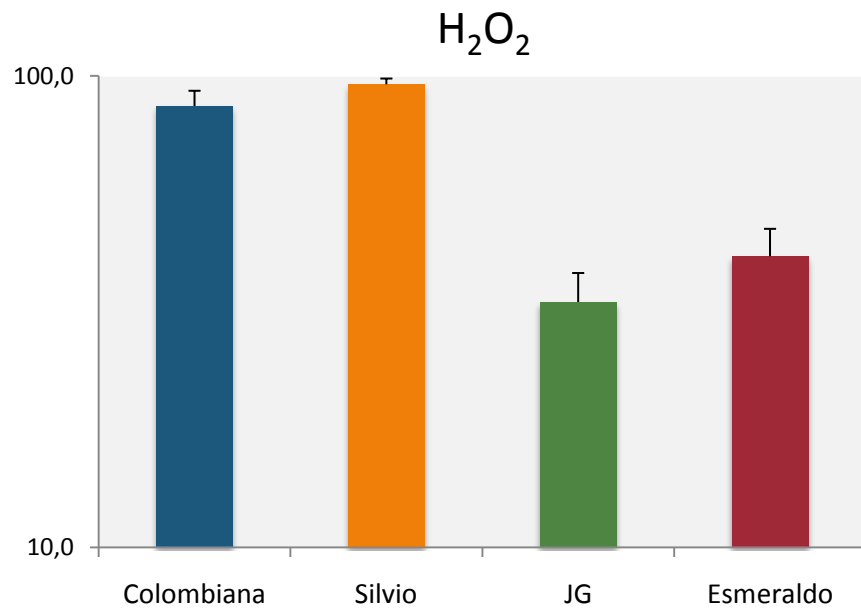
**FIGURA 12 – Resposta de diferentes cepas de *T. cruzi* ao tratamento com cisplatina, MNNG e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Figura adaptada do artigo em preparação dos autores Priscila Campos, Carolina Furtado, Carlos Machado e Santuza Teixeira



C)



D)



**Figura 12 – Continuação.**

mostraram que as cepas Silvio e Colombiana responderam melhor ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (maior sobrevivência na condição de estresse), quando comparadas às cepas JG e Esmeraldo, novamente sugerindo maior eficiência da atividade de TcMSH2 em linhagens *T. cruzi* II.

## **ii. Outras vias de reparo ou tolerância a danos no DNA**

Em relação a proteínas de *T. cruzi* envolvidas no reparo por excisão de bases, nosso grupo caracterizou recentemente as DNA polimerases  $\beta$  e  $\beta$ -PAK (Lopes *et al.*, 2008). Ambas apresentam atividades de DNA polimerase e dRP liase e uma localização mitocondrial incomum. A TcPol $\beta$ -PAK é capaz de realizar síntese através de 8-oxoG e a TcPol $\beta$  discrimina entre dNTPs e ddNTPs. Os dados indicam que ambas cooperam para manter a integridade do DNA mitocondrial, através da atuação em mecanismos múltiplos como o BER, preenchimento de *gaps* e síntese translesão.

Várias polimerases pertencentes à via de síntese translesão vêm sendo estudadas em *T. cruzi* (Rajão *et al.*, 2009, de Moura *et al.*, 2009). Estas enzimas especializadas aparentam ter um importante papel na evolução e na adaptação de organismos a ambientes hostis, uma vez que elas são capazes de causar mutações, de replicar DNA contendo lesões e ainda de atuar no reparo do DNA (Prakash *et al.*, 2005).

Uma das polimerases estudadas foi a DNA Polimerase Kappa (TcPol $\kappa$ ) que, diferentemente dos ortólogos descritos em outros eucariotos, possui localização mitocondrial (Rajão *et al.*, 2009). Essa proteína é capaz de polimerizar através de 8-oxoG *in vitro*, além de realizar síntese de DNA em um intermediário da recombinação, e parece estar envolvida na resistência do parasito a estresse oxidativo e à radiação gama, atuando em processos de recombinação homóloga. Além disso, é capaz de estender diferentes tipos

de erros de pareamento, o que pode evidenciar um importante papel adaptativo desta proteína, uma vez que tolera o surgimento de alterações (variabilidade genética) na sequência de um determinado gene.

Em relação aos processos de recombinação, foi demonstrado por nosso grupo que o *T. cruzi* é capaz de sobreviver a altas doses de radiação gama (Regis-da-Silva *et al.* 2006). Este tipo de radiação induz quebras duplas no DNA nuclear e mitocondrial, as quais são reparadas principalmente por recombinação homóloga neste parasito, uma vez que não possui a via NHEJ (El-Sayed *et al.* 2005). A resposta do *T. cruzi* frente à radiação gama é caracterizada por três estágios: (i) interrupção do crescimento da cultura e indução de genes do reparo por recombinação; (ii) aumento das taxas de reparo de DNA e (iii) inibição das proteínas do reparo por recombinação. Parasitos superexpressando *TcRad51* (que possui um papel crucial na recombinação homóloga) ou *TcPolK* apresentaram maior recuperação do crescimento após a irradiação, quando comparados a parasitos selvagens (Regis-da-Silva *et al.*, 2006, Rajão *et al.*, 2009).

Dentre todas as particularidades encontradas no metabolismo de DNA em *T. cruzi*, talvez as mais distintas sejam aquelas relacionadas ao seu DNA mitocondrial. Diferentemente de outros organismos eucariotos, o DNA mitocondrial dos tripanosomatídeos (kDNA) está organizado em uma estrutura extremamente complexa, a qual requer a participação de um grande número de enzimas para completar todas as etapas de sua replicação (Liu *et al.*, 2005). Várias enzimas que em outros eucariotos se encontram localizadas no núcleo, nos tripanosomatídeos apresentam localização mitocondrial. A mitocôndria de mamíferos, por exemplo, possui apenas uma DNA polimerase – Poly (Hudson e Chinery, 2006) – enquanto em tripanosomatídeos já foi verificada a presença de pelo menos sete – Pol $\kappa$ , Pol $\beta$ , Pol $\beta$ -PAK, Pol IA, Pol IB, Pol IC e Pol ID (Klingbeil *et al.*,

2002; Saxowsky *et al.*, 2003; Rajão *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2008). Cada uma destas polimerases possui um papel específico na duplicação do kDNA. De fato, estudos em *T. brucei* mostram que a inibição de um destes genes compromete a duplicação do cinetoplasto (Klingbeil *et al.*, 2002). Isto mostra que o metabolismo do kDNA, além de ser um processo que demanda uma maquinaria enzimática complexa, é essencial para a vida de tripanosomatídeos. Uma vez que os tripanosomatídeos possuem apenas uma mitocôndria, uma eficiente duplicação do kDNA é crucial para a divisão da célula. Assim, o bloqueio de forquilhas de replicação causado por lesões de 8-oxoG poderia ser letal para o *T. cruzi*. A atividade de síntese translesão realizada por TcPol $\beta$ -PAK e TcPol $\kappa$  poderia permitir que a replicação do kDNA progredisse mesmo na presença de lesões causadas por estresse oxidativo. Enquanto a TcPol $\beta$ -PAK está localizada principalmente no centro do “disco” do cinetoplasto (Saxowsky *et al.*, 2003), a TcPol $\kappa$  possui sua localização mais concentrada nos sítios antipodais, onde também se localiza a TcPol $\beta$ .

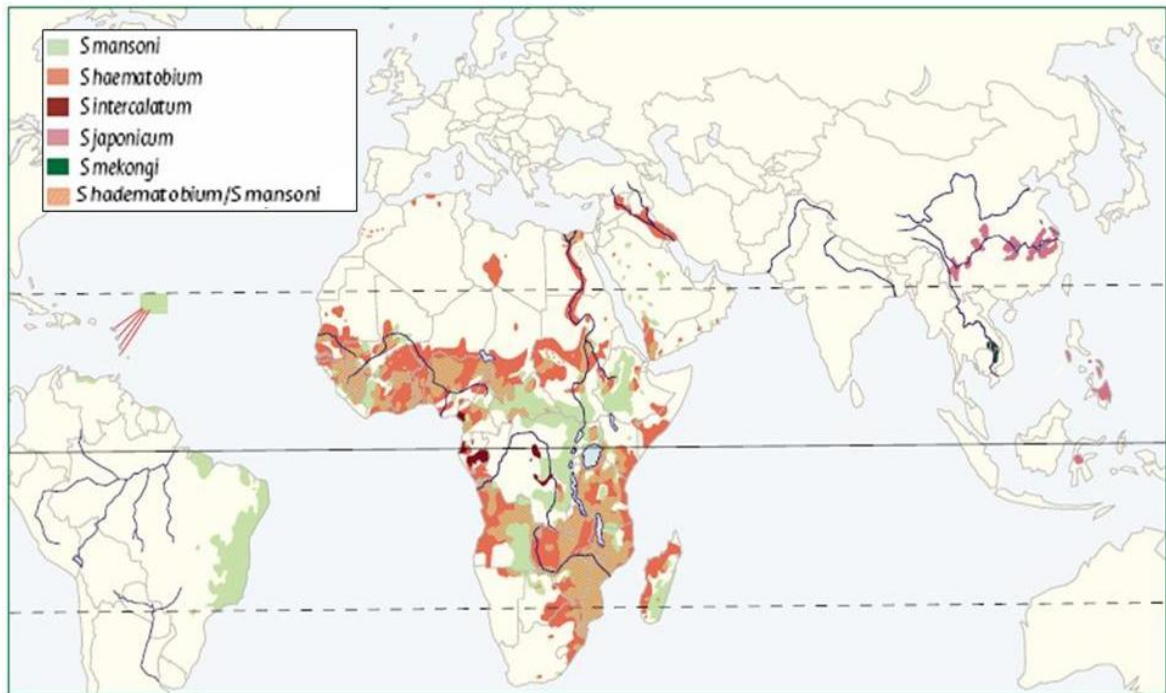
Neste trabalho, um dos objetivos principais foi investigar supostas variações na eficiência de reparo de DNA entre linhagens de *T. cruzi* que apresentam diferentes níveis de variabilidade genética, com ênfase em vias de correção de erros de pareamento (MMR) ou de danos oxidativos. Dentro dessa proposta, alvejamos estudar os possíveis efeitos destas vias sobre a taxa de mutação nessas linhagens. Por isso, um segundo objetivo foi desenvolver um sistema para análise da taxa de mutação em *T. cruzi*. Além disso, visamos caracterizar alguns mecanismos de controle da mutagênese promovida por estresse oxidativo neste organismo, em especial, enzimas do Sistema GO.

### 1.5.5. O *SCHISTOSOMA MANSONI* E A ESQUISTOSSOMOSE

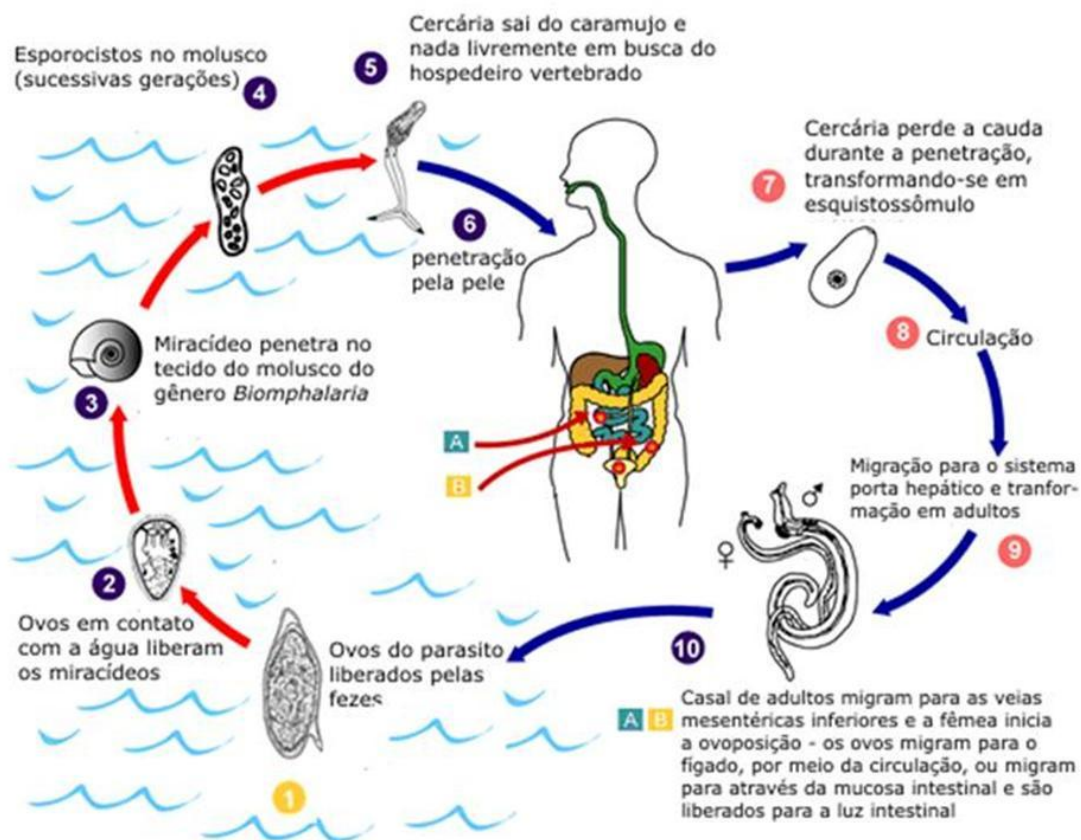
No Brasil, o trematódeo *Schistosoma mansoni* é o principal agente causador da esquistossomose, uma das mais importantes doenças parasitárias em áreas tropicais e subtropicais (Neves, 2004). Endêmica em 76 países, a esquistossomose infecta mais de 200 milhões de pessoas, sendo que destas, 120 milhões apresentam sintomas. A esquistossomose também pode ser causada por outras espécies do gênero *Schistosoma* (Figura 13), sendo que a espécie infectante determina a sintomatologia da doença (Neves, 2004). Apesar da mortalidade pela parasitose ser relativamente baixa (20.000 mortes por ano), ela representa uma ameaça aos países em desenvolvimento, pois apresenta caráter debilitante e incapacitante (Engels *et al.*, 2002).

O *S. mansoni* causa a esquistossomose intestinal e hepatoesplênica (Savioli *et al.*, 1997) e seu ciclo de vida caracteriza-se pela alternância de fase sexuada no hospedeiro vertebrado e fase assexuada no hospedeiro invertebrado (moluscos gastrópodes do gênero *Biomphalaria*), como mostra a figura 14.

Tentativas de controle e erradicação da esquistossomose não mostram bons resultados (Doenhoff *et al.*, 2002; Wilson e Coulson, 2006). No Brasil, o praziquantel tem sido utilizado de maneira eficaz no controle da morbidade pela esquistossomose, porém não reduz sua prevalência, pois não evita novas infecções. Além disso, existem evidências que sugerem o desenvolvimento de resistência ao praziquantel em *S. mansoni* (Doenhoff *et al.*, 2002, Fenwick *et al.*, 2003). Dessa forma, torna-se necessária a identificação de novos alvos para drogas, vacinas e diagnósticos da doença, além do esclarecimento das bases biológicas de processos como resistência do parasita a drogas, diversidade antigênica, infectividade e patologia.



**FIGURA 13–** Distribuição global da esquistossomose. Fonte: Gryseels *et al.*, 2006.



**FIGURA 14 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.** As setas vermelhas indicam os estágios de vida do parasito fora do hospedeiro vertebrado, e as setas em azul os estágios internos. (1) Ovos eliminados nas fezes liberam miracídeos (2) que penetram o caramujo (3). Miracídeos se transformam em esporocistos (4) que dão origem à várias cercarias (5), essas penetram no homem pela pele (6) e transformam-se em esquistossômulos (7). Nessa fase, o parasito atinge a circulação (8) e chega ao sistema porta-hepático onde atinge maturidade sexual (9). Os vermes adultos acasalados (10) migram para veias mesentéricas onde realizam a oviposição. Fonte: adaptado de Center for Disease Control (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

A concentração de esforços em estudos de genômica e genômica funcional dos vermes parasitas do gênero *Schistosoma* visa atingir tais objetivos (LoVerde *et al.*, 2004). Até o momento, mais de 19 000 novos genes do parasita já foram descobertos ([http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/T\\_release.pl?gudb=s\\_mansoni](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/T_release.pl?gudb=s_mansoni)). Muitos deles (cerca de 75%), no entanto, têm funções desconhecidas, por não apresentarem homologia com genes já descritos de outras espécies (Wilson *et al.*, 2006). Dessa forma, torna-se necessária a caracterização funcional desses genes.

### **1.5.6. PÓS-GENÔMICA DO *SCHISTOSOMA MANSONI***

A pesquisa em biologia de esquistossomos ainda sofre com várias dificuldades experimentais: (i) esses parasitos têm ciclo de vida complexo, que envolve dois hospedeiros distintos e diversos estágios de vida; (ii) esquistossomos não se multiplicam *in vitro* e (iii) apresentam tecidos distintos que ainda não são cultivados *in vitro* (Wilson *et al.*, 2006; Van Hellemond *et al.*, 2007). Além disso, ainda não foi possível a produção de vermes transgênicos, o que dificulta a obtenção de nocautes.

Vários grupos têm buscado contornar essas dificuldades, através de diferentes metodologias. Dentre elas, destacam-se a manipulação ou silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) (Boyle *et al.*, 2003; Ndegwa *et al.*, 2007; Geldhof *et al.*, 2007), a comparação da expressão gênica diferencial por *microarray* (Dillon *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2005; Waisberg *et al.*, 2008), a análise serial da expressão gênica (SAGE) para caracterizar o desenvolvimento do verme (Williams *et al.*, 2007) e a caracterização do proteoma por eletroforese bidimensional combinada com espectrometria de massa (Curwen *et al.*, 2004; revisado por Van Hellemond *et al.*, 2007). Além destes, novos procedimentos estão sendo desenvolvidos, como a transformação na linha germinal de *S. mansoni* (Beckmann *et al.*, 2007) e a análise de expressão gênica por microdissecção



microscópica a laser (Jones *et al.*, 2007). Entre os trabalhos realizados pelo nosso grupo, uma técnica muito utilizada foi a caracterização funcional de produtos gênicos através da complementação funcional de leveduras nocaute.

### **1.5.7. REPARO DE DNA EM *S. MANSONI***

Ao longo de seu complexo ciclo de vida, o *S. mansoni* necessita se adaptar a diferentes ambientes e, conseqüentemente, é exposto a diferentes agentes que danificam o DNA. Este organismo é exposto, por exemplo, à luz UV e poluentes químicos em seus estágios de vida livre, e a radicais livres provenientes do sistema imune, quando se encontra dentro de um hospedeiro vertebrado. A grande disponibilidade de sequências de *S. mansoni* geradas pelos projetos genoma e transcriptoma permitiu identificar genes e transcritos relacionados ao processo de reparo ou de tolerância a danos no DNA do parasito. No entanto, poucos estudos específicos acerca desses processos foram realizados. Na verdade, há apenas dois trabalhos sobre o tema: o primeiro trabalho (Silva *et al.*, 2006) analisa a expressão das enzimas RAD6, UBC13 e MMS2 em diferentes fases do ciclo de vida de *S. mansoni*. Essas proteínas, envolvidas no processo de ubiquitinação de PCNA (Hoege *et al.* 2002), estão relacionadas com o mecanismo de síntese translesão. Através de RT-PCR, os autores mostraram que essas proteínas são expressas em todas as fases analisadas do parasito (verme adulto, ovos, cercária, esquistossômulo e caramujos infectados), indicando a importância dessa via de tolerância a danos no DNA no parasito. Outro trabalho (Ruelas *et al.*, 2007) mostra que o reparo de danos por luz UV (UVB) em miracídeos e esporocistos de *S. mansoni* ocorre principalmente através do processo de fotoreativação (reparo de DNA pela exposição a luz visível após a luz UVB), e não pelo NER, o que indica que os danos gerados por UVB são principalmente dímeros de pirimidina-ciclobutano

Neste trabalho, com o objetivo de identificar e caracterizar genes de *S. mansoni* envolvidos no reparo de DNA e/ou tolerância a danos no DNA, utilizamos a estratégia de complementação funcional heteróloga de bactérias deficientes em diferentes vias de reparo e uma biblioteca de cDNA do verme adulto. A complementação funcional foi empregada com sucesso em diferentes organismos (Augusto-Pinto *et al.*, 2003) e está ancorada na alta conservação que os genes envolvidos no reparo de DNA mantiveram ao longo da evolução.

## 2. Objetivos

## OBJETIVO GERAL

Investigar alguns aspectos do metabolismo de DNA relacionados à geração de variabilidade genética, vias de reparo ou mecanismos de tolerância a danos no DNA nos parasitos humanos *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar e caracterizar genes de *S. mansoni* envolvidos no reparo e/ou tolerância a danos no DNA causados pelo agente alquilante MMS;
2. Comparar cepas de *T. cruzi* pertencentes às linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, quanto à resposta a diferentes agentes mutagênicos (cisplatina, MNNG e cloreto de cádmio) e ao estresse oxidativo, buscando avaliar o papel do MMR e da proteína MHS2 nesse processo;
3. Investigar um dos componentes da resposta ao estresse oxidativo no *T. cruzi*, a DNA glicosilase TcOgg1, através de estudos *in vivo*;
4. Investigar a existência de atividade MutT-like em *T. cruzi*, através da complementação do fenótipo hipermutador de bactérias deficientes em *mutT*;
5. Verificar os efeitos da superexpressão do gene *mutT* de *E. coli* em *T. cruzi* quanto à resistência do parasito ao estresse oxidativo e ao controle dos níveis de 8-oxoG no DNA nuclear e mitocondrial;
6. Estabelecer um sistema de transfecção com gene repórter para avaliar a taxa de mutação em *T. cruzi*.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwerty  
uiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasd  
fghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzx  
cvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxc  
vbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxc  
vbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmq  
wertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyui  
opasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg  
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbn  
mqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwert  
yuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopas

### 3. Material e métodos

## 3.1 CÉLULAS E MEIOS DE CULTURA

### 3.1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foram utilizadas, no presente estudo, cinco cepas de *Trypanosoma cruzi*: JG, Colombiana (clone Col1.7g2) e CL Brener, provenientes do laboratório do Prof. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, além de Silvio X10 clone 1 e Esmeraldo clone 3, gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Bianca Zingales da Universidade de São Paulo. As culturas foram mantidas a 28 °C por passagens regulares em meio LIT (0,5% de *liver digested neutralized*, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% KCl, 0,8% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 µg.mL<sup>-1</sup> de hemina, pH 7,3) esterilizado por filtração em filtro de 0,2 µm, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e acrescido de penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen), como descrito previamente por Camargo (1964).

### 3.1.2 *ESCHERICHIA COLI*

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste estudo foram: DH5α (*supE44*, *lacU169*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*) (Hanahan, 1983) e AB1157 [*F- thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *argE3*, *his-G4*,  $\Delta$ (*gpt-proA*), *62lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *ara-14*, *rpsL31*, *kdgK51* *mtl-1*, *txs-33*, *supE44* (str<sup>R</sup>) *rfbD1*] (Bachmann, 1972), além das derivativas GC4803 (como AB1157, *tag:alkA*) (Clarke *et al.*, 1984), AB1186 (como AB1157, *uvrA6*) (Bachmann, 1972), BW535 (como AB1157, *xth*, *nfo*, *nth*) (Cunningham *et al.*, 1986), BH600 [como AB1157, *leuB6::Tn10* (tet<sup>R</sup>)] e BH20 [como AB1157, *fpgI::Tn5* (kan<sup>R</sup>)] (Boiteux & Huisman, 1989), provenientes do laboratório do Dr. Serge Boiteux

(Laboratoire de Radiobiologie de l'ADN, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, Centre National de la Recherche Scientifique, France).

As linhagens bacterianas foram cultivadas a 37 °C, sob agitação constante (180 rpm), em meio 2xYT (1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,0) (Sambrook, 1989) esterilizado por autoclavagem. Quando necessário, foram adicionados ao meio de cultura os antibióticos ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>), tetraciclina (12,5 µg.mL<sup>-1</sup>), kanamicina (10 µg.mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (10 µg.mL<sup>-1</sup>). Para produção de meio 2xYT sólido, foi adicionado 1,5% de ágar antes da autoclavação. O crescimento das bactérias em meio sólido foi feito em estufa a 37 °C.

### **3.1.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

A cepa haplóide selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada neste trabalho foi BY4735 (MAT $\alpha$ , *ade2 $\Delta$ :hisG*, *his3 $\Delta$ 200*, *leu2 $\Delta$ 0*, *met15 $\Delta$ 0*, *trp1 $\Delta$ 63*, *ura3 $\Delta$* ) (Brachmann, 1998). A cepa mutante CRIMP4 foi construída a partir de BY4735, conforme descrito em itens adiante.

As leveduras selvagens foram crescidas a 30 °C, sob agitação constante (220 rpm), em meio rico YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose ou galactose, pH 7,0) esterilizado por autoclavagem. As leveduras modificadas foram crescidas nas mesmas condições, porém em meio mínimo seletivo SD (*Synthetic Drop-Out Media*) [0,5% de sulfato de amônio, 0,17% de YNB (*yeast nitrogen base*), pH 5,8], suplementado, conforme necessário, com adenina (200 mg.mL<sup>-1</sup>), leucina (1 g.mL<sup>-1</sup>), metionina (200 g.mL<sup>-1</sup>), triptofano (200 g.mL<sup>-1</sup>) e uracila (200 g.mL<sup>-1</sup>) (Bachmann, 1972). Para produção de meios YPD ou SD sólidos, foi adicionado ágar a 2% antes da autoclavação. O crescimento das leveduras em meio sólido foi feito em estufa a 30 °C.

## 3.2 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

Os iniciadores utilizados neste trabalho (Tabela 1) foram sintetizados pela companhia Alpha DNA (Quebec, Canadá), diluídos em água deionizada e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em alíquotas na concentração de  $200\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . A utilização de cada iniciador está indicada na tabela 2.

As amplificações de regiões específicas de DNA para clonagem em vetores plasmídianos foram feitas a partir de 50 ng de DNA genômico ou 2 ng de DNA plasmídiano, em reações de 20  $\mu\text{L}$  contendo 5 pmol de iniciador *forward*, 5 pmol de iniciador *reverse*, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1X de tampão IB (Phoneutria) [1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 0,1% Triton X-100] e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria).

Nas reações de amplificação feitas para confirmar a presença de insertos em clones transformados de bactérias (PCR de colônia), pequenas porções de colônias isoladas foram adicionadas a 10  $\mu\text{L}$  de mix de reação contendo 2,5 pmol de cada iniciador específico, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 1X de tampão IB.

Nos procedimentos de PCR a partir de clones de leveduras transformadas, colônias isoladas foram transferidas para microtubos contendo 50  $\mu\text{L}$  de mix de PCR composto de 15 pmol de cada iniciador específico, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 1X de tampão IB e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Após a adição das células, os tubos foram vortexados por 30 seg.

Em algumas reações de amplificação, às quais denominamos “PCR de colônia de *T. cruzi*”, utilizamos como molde o DNA genômico de populações clonais de *T. cruzi* presente em baixo grau de pureza em uma alíquota (2-6  $\mu\text{L}$ ) de lisado celular. Essas



**TABELA 1** – Sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência (5' → 3')<sup>1</sup></b>
LEV1	TCCTTCTAATGACACACTAT
LEV2	TCTTCCCTTCGTTTCGTTTTG
HIS311	AACCCTATACCTGTGTGGA
DED1	GCTCCAAGAAACGAAAAGG
IMP1	GGTGTTCCAACTTCTTTGAC
IMP2	GGCAGTCCTTATGAATCTTC
<i>OggA.Xba-F</i>	TCTAGAATGTATTTTGCTAT
<i>OggA.Hind-R</i>	<u>AAGCTTTCAGTTGTCTCTTTGCCC</u>
<i>OggA.Xho-R</i>	<u>CTCGAGTCAGTTGTCTCTTTGCCC</u>
<i>Ndx1BamF</i>	<u>GGATCCATGTTGAAGCGGTATGAA</u>
<i>Ndx1HindR</i>	<u>AAGCTTTTAACAAAACATCGTACTCAT</u>
<i>Ndx4BamF</i>	<u>GGATCCATGACTCTGACAACTCATGAT</u>
<i>Ndx4HindR</i>	<u>AAGCTTTCACTCCTGTTGCACTCGTGG</u>
<i>mthEcoF</i>	<u>GAATTCATGGCCGCGATGACTGCGAC</u>
<i>mthHindR</i>	<u>AAGCTTTCAGCTGGAGTTTTCCTTGT</u>

<i>muttXbaF</i>	<u>TCTAGA</u> AATGAAAAAGCTGCAAATTGC
<i>muttPstR</i>	<u>CTGCAG</u> CTACAGACGTTTAAGCTTCGC
<i>muttXhoR</i>	<u>CTCGAG</u> CTACAGACGCTTAAGCTTCGCA
<i>RTmuttF</i>	GTAGGTATTATTCGCAACGAGA
<i>RTmuttR</i>	TTTCACCCATTTC AATTTTACCG
<i>NeostopXbaF</i>	<u>TCTAGA</u> AATGTGATCGGCCATTGAA
<i>NeostopBamF</i>	<u>GGATCC</u> ATGTGATCGGCCATTGAACA
<i>NeoBamF</i>	<u>GGATCC</u> ATGGGATCGGCCATTGAACA
<i>NeoXhoR</i>	<u>CTCGAG</u> TCAGAAGAACTCGTCAAG
<i>NeoHindR</i>	<u>AAGCTT</u> TCAGAAGAACTCGTCAAG
<i>Δ90neoF</i>	<u>GGATCC</u> ATGACAATCGGCTGCTCTGATGC
<i>Δ180neoF</i>	<u>GGATCC</u> ATGAATGAACTGCAGGACGAGGC
<i>Δ270neoF</i>	<u>GGATCC</u> ATGGGAAGGGACTGGCTGCTATT
<i>Hx1-F</i>	TTCTTCAA AATATGCAGCGG
<i>NeoSeq-R</i>	ACAGGTCGGTCTTGACA

(1) Os sítios de restrição estão sublinhados

**TABELA 2** – Fragmentos amplificados pelos diferentes pares de iniciadores utilizados

<b>Pares de Iniciadores</b>	<b>Fragmento amplificado (organismo)</b>	<b>Utilização</b>
LEV1 e LEV2	Gene <i>IMP4</i> ( <i>S. cerevisiae</i> , cepa BY4735)	Clonagem em pUC18
LEV1 e HIS311	Fragmento híbrido formado por parte do gene <i>IMP4</i> e parte do cassete <i>HIS</i> ( <i>S. cerevisiae</i> , linhagem CRIMP4)	Verificação da disruptura de ScImp4 em leveduras CRIMP4
IMP1 e IMP2	Porção 5' do gene <i>IMP4</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	RT PCR de leveduras
DED1 e IMP2	Fragmento híbrido formado por parte do gene <i>DED1</i> e parte do gene <i>IMP4</i> ( <i>S. cerevisiae</i> , linhagem CRIMP4)	RT PCR de leveduras
<i>OggA.XbaF</i> e <i>OggA.HindR</i>	Alelo TcOgg1A ( <i>T. cruzi</i> , clone CL Brener)	Clonagem em pMAL c2G
<i>OggA.XbaF</i> e <i>OggA.XhoR</i>		Clonagem em pROCK_HIGRO
<i>Ndx1BamF</i> e <i>Ndx1HindR</i>	Ndx1 ( <i>T. cruzi</i> , clone CL Brener)	Clonagem em pMAL c2G
<i>Ndx4BamF</i> e <i>Ndx4HindR</i>	Ndx 4 ( <i>T. cruzi</i> , clone CL Brener)	Clonagem em pMAL c2G
<i>mtHEcoF</i> e <i>mtHHindR</i>	TcMTH ( <i>T. cruzi</i> , clone CL Brener)	Clonagem em pMAL c2G
<i>muttXbaF</i> e <i>muttPstR</i>	Gene <i>MutT</i> ( <i>E. coli</i> , linhagem AB1157)	Clonagem em pMAL c2G
<i>muttXbaF</i> e <i>muttXhoR</i>		Clonagem em pROCK_HIGRO
<i>RTmuttF</i> e <i>RTmuttR</i>	Fragmento interno ao gene <i>MutT</i> de <i>E. coli</i>	RT PCR de <i>T. cruzi</i>
<i>NeostopBamF</i> e <i>NeoHindR</i>	Gene <i>Neostop</i>	Clonagem em pMAL c2G
<i>NeostopXbaF</i> e <i>NeoXhoR</i>		Clonagem em pROCK_HIGRO

<i>NeoBamF</i> e <i>NeoHindR</i>	Gene <i>Neo</i>	Clonagem em pMAL c2G
$\Delta 90neoF$ e <i>NeoHindR</i>	Gene Neo truncado: deleção de 90 pb na porção 3'	Clonagem em pMAL c2G
$\Delta 180neoF$ e <i>NeoHindR</i>	Gene Neo truncado: deleção de 180 pb na porção 3'	Clonagem em pMAL c2G
$\Delta 270neoF$ e <i>NeoHindR</i>	Gene Neo truncado: deleção de 270 pb na porção 3'	Clonagem em pMAL c2G
<i>Hx1F</i> e <i>NeoSeq-R</i>	Fragmento híbrido contendo porção 3' do gene <i>neostop</i>	Sequenciamento da porção 3' do gene <i>neostop</i>

reações continham 5 pmol de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTPs, 1X de tampão IB e 2U de Taq DNA polimerase em um volume final de 20  $\mu$ L.

Todas as amplificações foram realizadas em termocicladores J. M. Research PTC-100. O programa de amplificação consistiu em:

- i. 5 min de desnaturação inicial a 94 °C;
- ii. 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento (54 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 1 min);
- iii. 10 min de extensão final a 72 °C.

O produto das amplificações foi analisado em gel de agarose 1% na presença do padrão de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídeo e analisados sob luz UV.

### 3.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento de DNA plasmidiano ou de produtos amplificados por PCR foi feito em ambas as direções, de acordo com o método descrito por Sanger (1977), através do sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Em cada reação foram utilizados 4  $\mu$ L do kit *DYEnamic ET Dye Terminator MegaBACE* (GE Healthcare), 5 pmol de iniciador específico *forward* ou *reverse* e quantidades variáveis de DNA molde (200 ng de DNA plasmidiano ou 50 ng de produtos de PCR purificados por PEG) O programa de amplificação, realizado no termociclador *Mastercycle gradient* (Eppendorf), consistiu em 35 ciclos de desnaturação (95 °C, 20 seg), anelamento (54 °C, 15 seg ) e extensão (60 °C, 80 seg). Após a amplificação, os produtos fluorescentes foram

precipitados com etanol (Sambrook, 1989) e injetados no sequenciador, de acordo com as especificações do fabricante.

### **3.4 ANÁLISES *IN SILICO***

Os resultados obtidos pelo sequenciamento de DNA foram analisados através do programa Phred, do pacote Phred-Phrap (Ewing *et al*, 1998), disponibilizado em <http://helix.biomol.unb.br/phph>. Sequências gênicas e protéicas foram alinhadas e examinadas através da interface Multalin (Corpet, 1988) em <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>. Resíduos conservados e não conservados de sequências protéicas foram destacados utilizando o programa BOXSHADE 3.21, disponível em ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) foi utilizado na busca pela maior janela aberta de leitura em sequências de nucleotídeos e predição de sua sequência de aminoácidos. Sequências homólogas a diferentes ORFs foram encontradas com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.5 VETORES PLASMIDIANOS E CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA**

Os vetores plasmidianos utilizados neste trabalho foram pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (Anexo 1), pROCK\_HIGRO (DaRocha *et al*, 2004) (Anexo 2), pMAL-c2G (New England Biolabs) (Anexo 3), pUC18 (Amersham Biosciences) (Anexo 4), além dos vetores pDIS e pYEDP (ou pYEDP60-2-ADE2-URA3-GAL10-CYC1) (Anexo 5). Os últimos plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Francisco Nóbrega, da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São Paulo.

Nas clonagens de DNA em vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, uma alíquota (2,5 µL) dos produtos de PCR foi utilizada diretamente em reações contendo 50 ng do vetor, 3U de T4 DNA Ligase e 1X do tampão *Rapid Ligation Buffer* [30 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 5% PEG MW8000] em um volume final de 10 µL. As reações de clonagem ocorreram a 4 °C, por 16 horas. Todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante (Promega).

As clonagens de produtos de PCR no sítio de *SmaI* do vetor pUC18 foram feitas utilizando o kit *SureClone<sup>®</sup> Ligation Kit* (Amersham Biosciences), que elimina a adenina presente nas extremidades 3` de produtos de PCR, conforme instruções do fabricante.

As clonagens de DNA nos vetores de expressão pROCK\_HIGRO, pMAL-c2G e pYEDP foram feitas por 16 horas, a 4 °C, em reações de 15 µL contendo 50 ng de vetor linearizado, 5U de T4 DNA Ligase (Invitrogen), 1X de tampão *Reaction Buffer* [50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% PEG 8000] (Invitrogen) previamente descongelado no gelo e vortexado, além do inserto, presente em uma razão molar de 3:1 em relação ao vetor. Os vetores foram previamente digeridos com o par apropriado de endonucleases de restrição, precipitados com PEG 25% e solubilizados em água; os insertos foram liberados do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy pela digestão com as mesmas enzimas e purificados a partir de gel de agarose. As quantidades de inserto utilizadas foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão molar inserto:vetor}}{\text{tamanho do vetor (kb)}}$$

Uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  do produto das ligações foi utilizada na transformação de bactérias eletrocompetentes. Um esquema ilustrativo acerca das construções plasmídicas deste trabalho pode ser visto nas figuras 15 e 16.

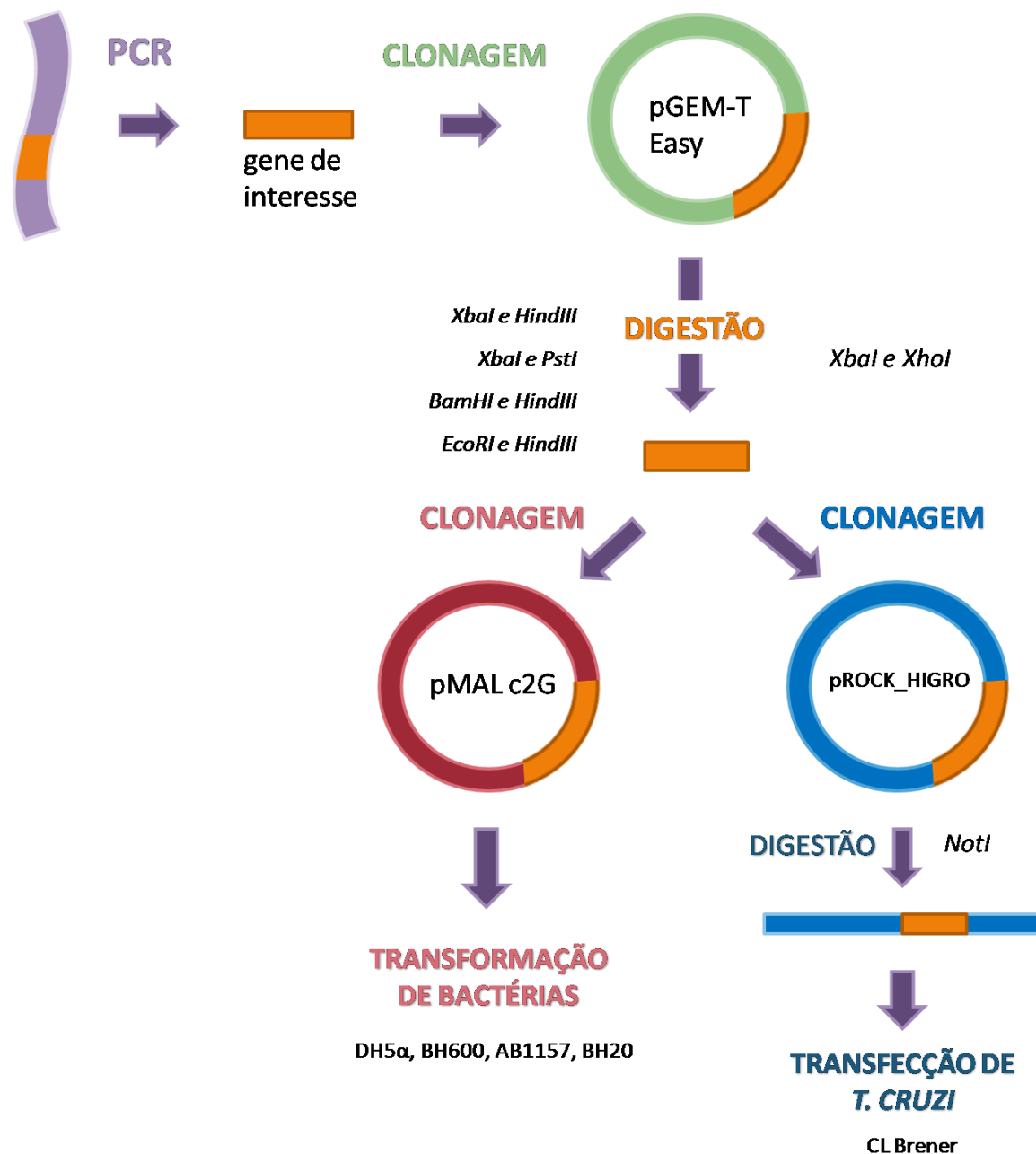
### **3.6 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES**

Bactérias de diferentes linhagens (DH5 $\alpha$ , AB1157, BH600, BH20, GC4803, AB1186 e BW535) foram tornadas eletrocompetentes para posterior transformação com DNA plasmídico através da metodologia descrita por Sambrook (1989). Uma cultura de bactérias em fase exponencial de crescimento ( $\text{DO}_{600}$  entre 0,6 e 0,8) foi centrifugada a 7500 g por 10 min e lavada três vezes com água deionizada a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas e solubilizadas em glicerol 10%, aliqüotadas e armazenadas a – 80 °C.

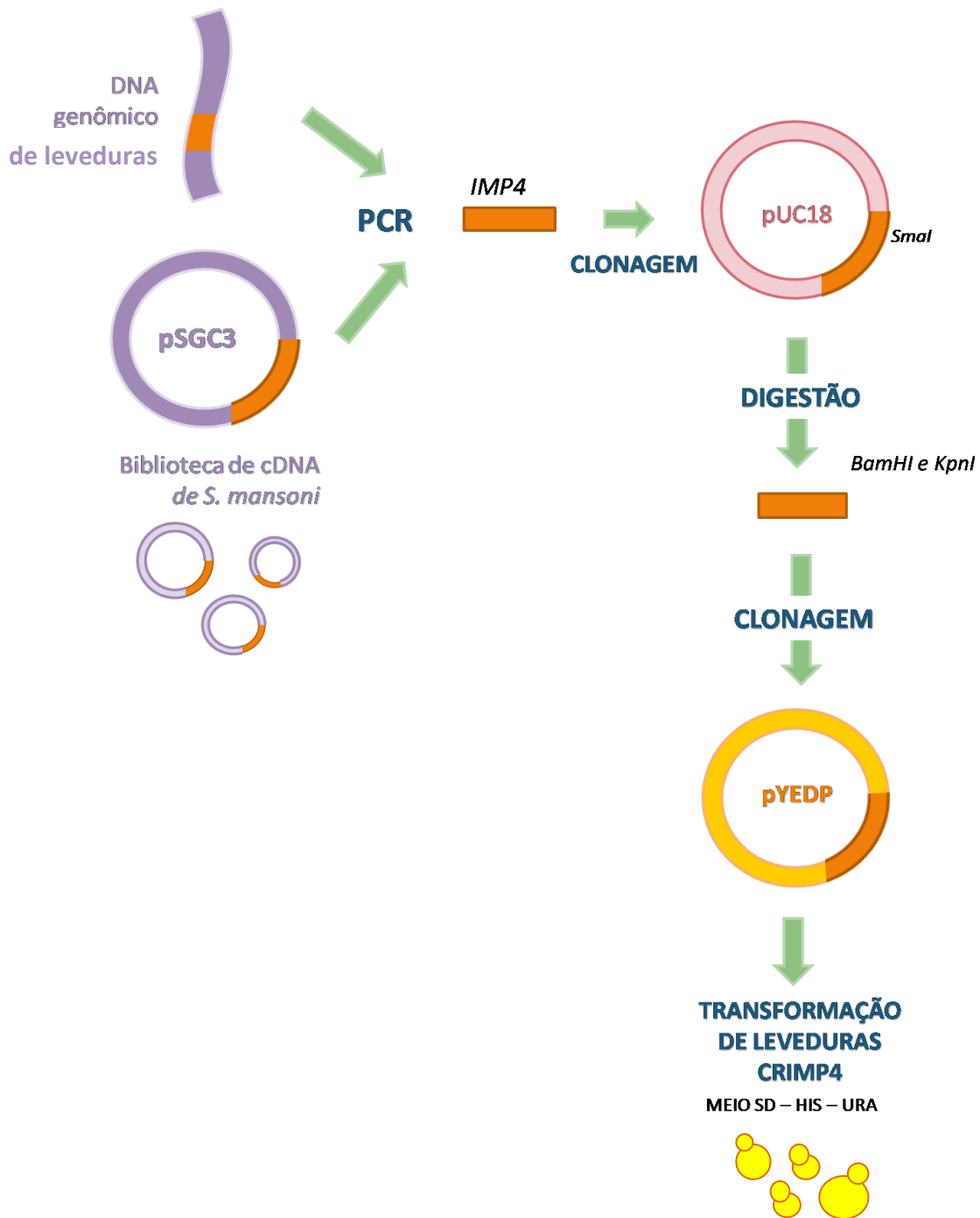
Uma alíquota de bactérias eletrocompetentes foi incubada por 10 min no gelo na presença do DNA de interesse. A mistura foi então transferida para uma cubeta *Gene Pulser* de 0,2 cm (BioRad) e submetida a um pulso elétrico de 2,5 kV (MicroPulser, BioRad). Após a eletroporação, as bactérias foram transferidas para microtubos de ensaio contendo 700  $\mu\text{L}$  de meio 2xYT e incubadas por 45 min, a 37 °C, sob agitação constante (180 rpm). Após este período de crescimento, 200  $\mu\text{L}$  da cultura foram plaqueados em meio 2xYT sólido suplementado com ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

Colônias de bactérias isoladas, resultantes de cada transformação, foram testadas quanto à presença dos plasmídeos com os insertos de interesse através de PCR de colônia, utilizando os iniciadores apropriados, conforme descrito no item 3.2.





**FIGURA 15 – Estratégias de clonagem em pMAL-c2G e pROCK-HIGRO.** O produto da PCR específica é diretamente clonado em pGEM-T<sup>®</sup> easy e liberado por digestão com o par de enzimas apropriado (mostradas em *itálico*). O fragmento liberado pela digestão é purificado a partir de gel de agarose e clonado nos vetores pMAL-c2G ou pROCK\_HIGRO, digeridos com o mesmo par de enzimas. Os vetores são utilizados na transformação de bactérias eletrocompetentes (DH5 $\alpha$ , BH600, AB1157, BH20) ou transfecção de *T. cruzi* (cepa CL Brener). Antes da transfecção, o vetor pROCK é linearizado por digestão com *NotI*.



**FIGURA 16 – Estratégia de clonagem em pYEDP.** O produto da PCR é diretamente clonado em pUC18 e liberado por digestão com o *BamHI* e *KpnI*. O fragmento liberado pela digestão é purificado a partir de gel de agarose e clonado no vetor pYEDP, digerido com o mesmo par de enzimas. Os vetores são então utilizados na transformação de leveduras CRIMP4.

### **3.7 OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIANO**

Colônias de bactérias contendo plasmídeos de interesse foram crescidas sob agitação por 16 horas, a 37 °C, em 4 mL de meio 2xYT, na presença de ampicilina. As células foram então sedimentadas por centrifugação a 10 000 g por 2 min, lisadas em meio alcalino e aproximadamente 20 µg do DNA plasmidiano foi purificado em coluna de afinidade utilizando o kit *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Nas extrações em larga escala foi utilizado o kit *Wizard Max Prep* (Promega) e cerca de 1 mg do plasmídeo de interesse foi obtido em alto grau de pureza a partir de 500 mL de cultura de bactérias em fase estacionária, sedimentadas por 10 min de centrifugação a 5 000 g, seguindo as determinações do *kit*.

### **3.8 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**

As digestões de DNA plasmidiano foram realizadas nas proporções de 1,5 U de cada enzima de restrição para cada 1 µg de DNA, na presença de 100 µg.mL<sup>-1</sup> de BSA (albumina bovina sérica) 1X do tampão especificado pelo fabricante, a 37 °C, por 16 horas.

### **3.9 PURIFICAÇÃO DE DNA**

#### **3.9.1 PURIFICAÇÃO DE BANDAS DE GEL DE AGAROSE**

Bandas relativas a fragmentos de DNA de interesse foram excisadas de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e os fragmentos purificados por afinidade a uma membrana de sílica procedente do *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco-BRL), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.9.2 PRECIPITAÇÃO DE DNA COM ETANOL**

As precipitações de DNA em solução foram feitas adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) às soluções e incubando-as por 16 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O precipitado de DNA foi obtido após centrifugação a 20 000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi lavado duas vezes com etanol 70%, solubilizado em água e quantificado.

### **3.9.3 PRECIPITAÇÃO DE DNA COM PEG**

As precipitações de produtos de PCR e de DNA de alto peso molecular produto de digestões foram feitas com polietilenoglicol (PEG). Inicialmente, foi adicionado às soluções 1 volume de PEG 25% sendo a mistura incubada por 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o DNA foi precipitado por centrifugação a 20 000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , lavado 2 vezes com etanol 80%, ressuspendido em água e quantificado.

## **3.10 DOSAGEM DE ÁCIDOS NUCLÉICOS EM SOLUÇÃO**

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

## **3.11 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR**

As extrações de RNA total foram feitas utilizando o reagente TRizol (Invitrogen). O RNA foi extraído a partir de  $10^7$  células de *T. cruzi* (epimastigotas em fase exponencial de crescimento) ou  $2 \times 10^8$  células de *S. cerevisiae* (esferoplastos). Leveduras provenientes de culturas exponenciais foram convertidas a esferoplastos pelo tratamento

por 2 horas a 42°C com 25 mg de enzimas líticas de *Rhizoctonia solani* (Sigma Aldrich), em um tampão apropriado (1M de sorbitol, 0,1M de EDTA, pH7, 5).

Inicialmente, cada cultura ou suspensão celular foi centrifugada (5 000 g, 15 min, temperatura ambiente), e o sobrenadante foi descartado. As células foram lisadas pela adição de 1 mL de TRizol e a mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio ao lisado, que foi então homogeneizado e incubado por 3 min à temperatura ambiente. A separação da fase aquosa foi feita por centrifugação a 12 000 g por 15 min, a 4 °C. A fase aquosa incolor foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico. A mistura foi então incubada por 10 min à temperatura ambiente. O RNA foi precipitado por centrifugação a 12 000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (7500 g, 5 min, 4 °C). O RNA foi ressuspenso em 60 µL de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (**dietil pirocarbonato**) e dosado. Em seguida, foi resolvido em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído e corado com brometo de etídeo.

Antes da síntese de cDNA, o RNA foi tratado com DNase para remover contaminações com DNA genômico. Para tanto, 2 µg de RNA foram incubados por 15 min à temperatura ambiente com 1 unidade de DNase (Invitrogen) e 1X de tampão de DNase em um volume final de 10 µL. A reação foi interrompida pela adição de 1 µL de EDTA 0,25 mM e aquecimento a 65 °C por 15 min.

Cerca de 2µg do RNA tratado foi utilizado em reações de síntese de cDNA a partir de 500 ng de oligo (dT)<sub>12-18</sub>, através do kit illustra Ready-To-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. A amplificação de fragmentos

específicos de cDNA foi realizada sequencialmente, na mesma reação, com 0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador. O programa de síntese de cDNA e amplificação consistiu em:

- (i) 42 °C por 25 min,
- (ii) 95 °C por 5 min,
- (iii) 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 1 min), anelamento (50 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 1 min),
- (iv) 72 °C por 10 min.

O controle negativo das reações foi feito na ausência de transcrição reversa, para a detecção de possíveis contaminações com DNA genômico (nestes tubos, o passo *i* consistiu em 10 min de aquecimento a 95 °C). O produto da RT-PCR foi analisado em gel de poliacrilamida 6%, corado por nitrato de prata, ou em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, de acordo com seu tamanho, na presença de padrão de peso molecular.

### **3.12 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *T. CRUZI***

O DNA genômico de epimastigotas da cepa CL Brener foi obtido em alto grau de pureza através de em três etapas principais: lise celular, desproteinização e precipitação, como descrito por Andrade e colaboradores (1999). Cerca de  $1 \times 10^8$  parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados três vezes com PBS, sedimentados a 1500 g por 10 min a 4 °C e incubados com 200  $\mu\text{L}$  de solução de lise [0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100  $\mu\text{M}$  EDTA] contendo 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de RNase, por 1 hora a 37 °C. Em seguida, adicionou-se Proteinase K (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e o lisado foi incubado a 50 °C por 3 horas. A desproteinização ocorreu em três etapas. Na primeira delas, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de fenol ao lisado, homogeneizando vagarosamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 1500 g, por 10 minutos, a 4 °C, gerando duas fases. A fase aquosa foi coletada e a não

aquosa, descartada. Na segunda etapa adicionou-se à fase aquosa 200 µL de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) e foram repetidos os procedimentos de homogeneização, centrifugação e coleta da fase aquosa. A terceira etapa consistiu na adição de 200 µL de clorofórmio e repetição dos demais procedimentos. A precipitação foi feita com etanol absoluto, conforme descrito no item 3.7.

A extração de DNA genômico de *T. cruzi* em baixo grau de pureza para realização de “PCRs de colônia” (item 3.2) foi feita a partir de culturas de epimastigotas em fase estacionária de crescimento. Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi centrifugada a 5 000 g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de água miliQ. A suspensão de células foi fervida por 10 min e então centrifugada por 3 min a 11 000 g. O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado na reação de PCR.

### **3.13 TRANSFECCÃO DE *T. CRUZI***

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Como preparação para a etapa de transfecção, 100 µg do vetor pROCK\_HIGRO contendo o inserto de interesse foram linearizados com *NotI*, precipitados com isopropanol e solubilizados em 50µL de água miliQ estéril. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8.0, e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a uma concentração final de  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>. Em uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser* de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de DNA de interesse. Em seguida foi aplicado o choque elétrico de dois pulsos de 0,3 kV e 500 µF,

intervalados por 30 segundos. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo onde sofreram seleção, por cerca de 6 semanas, através do cultivo na presença de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina.

### **3.14 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA COM *T. CRUZI***

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com diferentes drogas (MNNG, cisplatina, cloreto de cádmio, peróxido de hidrogênio, INALa, G418) por períodos determinados de tempo [48h, 72h ou 5 dias, conforme a(s) droga(s) utilizada(s)]. Em seguida, a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das culturas controle não tratadas crescidas sob as mesmas condições.

Os ensaios foram feitos em placas de 24 poços, em triplicatas. De modo geral, cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura à densidade de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> (em particular, culturas do clone Esmeraldo apresentavam densidade inicial de  $1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>; além disso, nos ensaios com G418, todas as culturas partiram da densidade de  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>). Nos poços tratados, foi adicionada a quantidade apropriada da droga em estudo, em um volume fixo, solubilizada no solvente adequado. Nos poços controle, foi adicionado apenas o solvente, em um volume correspondente ao utilizado nos tratamentos. As placas foram vedadas, embaladas em papel alumínio e incubadas a 28 °C. Após o período de crescimento, as células vivas foram contadas em câmaras de Neubauer. As concentrações utilizadas de cada droga e o tempo de crescimento estão indicadas nas legendas das respectivas figuras.



O cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram solubilizados em água estéril. Cisplatina e INALa (2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) propionamida) foram solubilizadas em DMF; MNNG foi solubilizado em tampão citrato contendo 10% de acetona. Nos ensaios com INALa, antes da incubação a  $28^\circ\text{C}$ , as placas foram submetidas a 30 minutos de irradiação com luz branca (duas lâmpadas dicróicas de 400W, ou uma lâmpada fluorescente de 40W, localizadas a 15 cm da placa de cultura) para excitação da droga.

### **3.15 CURVAS DE CRESCIMENTO COM *T. CRUZI***

O crescimento de diferentes populações clonais de *T. cruzi* foi comparado por sete dias em meio líquido, na ausência de agentes mutagênicos, ou na presença de  $50\ \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Culturas contendo inicialmente  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  e contadas após 1, 2, 5 ou 7 dias de crescimento. O ensaio foi feito em placas de 24 poços, em triplicatas, e cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura. As culturas foram contadas em câmara citométrica na presença do corante vital Eritrosina.

### **3.16 CLONAGEM DE PARASITOS EM MEIO ÁGAR SANGUE**

Diferentes populações de *T. cruzi* foram submetidas à clonagem em meio semi-sólido, de acordo com a técnica descrita por Gomes e colaboradores (1991), com pequenas modificações. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram plaqueados em 20 mL de meio Ágar sangue (0,75% de bacto-ágar, 48% de LIT completo, 48% de BHI, 2,5% de sangue desfibrinado) contendo  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de higromicina ou  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de G418. As placas foram embaladas individualmente em papel pardo e mantidas a  $28^\circ\text{C}$  por cinco semanas.

Após este período, clones isolados crescidos nas placas foram transferidos, com a ajuda de um palito estéril, para 1 mL de meio LIT acrescido do antibiótico específico (higromicina ou G418, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em placas de 24 poços (1 clone por poço, 1 mL por poço). Estas placas foram incubadas a 28 °C por sete dias. Ao fim deste período, transferiu-se 500  $\mu\text{L}$  de cada um dos poços para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT acrescido de antibiótico. As populações clonais foram mantidas a 28 °C por repiques semanais, conforme descrito no item 3.1

### **3.17 MARCAÇÃO DE 8-OXOG POR FITC-AVIDINA**

Os níveis de 8-oxoG em epimastigotas de diferentes culturas de *T. cruzi* foram acessados, após tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através do ensaio de marcação da lesão com avidina conjugada à fluoresceína isotiocianato (FITC).

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram sedimentados por centrifugação (5 000 g, 5 min) e lavados duas vezes com PBS 1X. Após a segunda lavagem,  $1 \times 10^7$  células foram tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em PBS por 20 min, protegidos da luz. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 600 $\mu\text{L}$  de solução de paraformaldeído a 4% em PBS. A suspensão foi incubada por 1h a 4°C, no escuro. Após esse período, as células foram lavadas três vezes: nas duas primeiras, com solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 50 mM em PBS; na terceira, com PBS 1X. Os parasitos foram então ressuspensos em PBS 1X e 20 $\mu\text{L}$  da suspensão foram aplicados em uma lâmina de vidro de oito poços (*Lab-Tek<sup>TM</sup> Chamber Slide*, Nunc), onde foram incubados por 18 horas à temperatura ambiente, no escuro. Após a etapa de fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X100 0,2% em PBS por 15 min, lavadas duas vezes com PBS 1X e tratadas com RNaseA (0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em PBS)

por 15 min a 37°C. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X, incubadas com solução de bloqueio (soro fetal bovino a 5% em PBS) por 1 hora e então incubadas por mais 1 hora no escuro com FITC-Avidina diluída 1:200 em tampão apropriado (15 mM de azida sódica em PBS contendo 10% de tampão carbonato 0,5 M). As células sofreram três lavagens com PBS sendo então incubadas por 15 min com solução de iodeto de propídeo (100 µg.mL<sup>-1</sup> em PBS) e lavadas mais 4 vezes com PBS 1X. A lâmina foi preparada com VECTASHIELD Mounting Medium with Propidium Iodide (PI) e visualizada em microscópio de fluorescência

### **3.18 ENSAIO COM MTT**

Um total de 10<sup>7</sup> epimastigotas, provenientes de culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento, foram ressuspensas em um volume de 480 µL de meio LIT completo e incubadas com 20 µL de solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazole brometo] (5mg/mL em PBS 1X) a 28 °C por 18 horas. Em seguida, as células foram lisadas pela adição de 1 mL de solução de isopropanol:HCl (299:1 v/v). O lisado foi incubado por 30 min à temperatura ambiente. A mistura foi então vortexada e centrifugada a 5000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à leitura de densidade óptica a 570 nm em espectrofotômetro.

### **3.19 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS**

A transformação de leveduras foi realizada segundo o método descrito por Gietz e Woods (2002). Células em crescimento exponencial foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e repetidamente lavadas em água deionizadas. Em seguida, para cada transformação, adicionou-se ao precipitado celular (10<sup>7</sup> células) 240 µL de PEG

3500 50%, 36  $\mu\text{L}$  de LiAc (1M), 50  $\mu\text{L}$  de DNA de esperma de salmão (2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fervido e resfriado rapidamente no gelo, e 1  $\mu\text{g}$  de DNA de interesse em solução aquosa (em um volume máximo de 34  $\mu\text{L}$ ). A mistura de transformação foi homogeneizada, incubada por 30 min a 30 °C e então submetida a choque térmico a 42 °C por 30 min. Após uma breve centrifugação (3000 g, 30 seg), o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de água deionizada. Cerca de 100  $\mu\text{L}$  desta suspensão celular foram plaqueados em meio seletivo apropriado (SD *-HIS* ou SD *-HIS,URA*).

## **3.20 ENSAIOS *IN VIVO* COM LEVEDURAS**

Leveduras selvagens (BY4735) ou modificadas (CRIMP4) carregando diferentes construções plasmídicas foram testadas quanto ao crescimento e sensibilidade a hidroxiuréia, UV e MMS, conforme descrito a seguir.

### **3.20.1 CRESCIMENTO EM PLACA**

A densidade celular de culturas em fase estacionária de crescimento foi determinada por contagem de células em câmara de Neubauer. Em seguida, foi retirada uma alíquota de cada cultura (contendo cerca de 700 células), as quais foram espalhadas em placas de meio YNB-ágar (contendo 2% de glicose ou galactose). As placas foram incubadas por 48 ou 96h, em estufa a 30 °C. O crescimento das culturas foi avaliado pela capacidade de formação de colônias.

### **3.20.2 CURVA DE CRESCIMENTO**

A densidade celular de culturas em fase estacionária de crescimento foi determinada por contagem de células em câmara de Neubauer. As culturas foram então

diluídas em meio YNB-gli (contendo 2% de glicose) ou YNB-gal (contendo 2% de galactose) a uma densidade final de  $5 \times 10^6$  células/mL. As culturas diluídas foram incubadas a 30 °C, sob agitação (220 rpm), e a densidade celular das culturas foi avaliada por contagem de células, em diferentes intervalos de tempo.

### **3.20.3 TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA (HU)**

A densidade celular de culturas em fase exponencial de crescimento foi determinada por contagem de células em câmara de Neubauer. As culturas foram então diluídas em meio YNB-gli (contendo 2% de glicose) ou YNB-gal (contendo 2% de galactose) a uma densidade final de  $7,4 \times 10^4$  células/mL. Cada suspensão foi distribuída em 24 poços de uma placa de 96 poços (135 µL por poço). Cada poço recebeu também 15 µL de solução de hidroxauréia (a 0M, 0,5M, 1M ou 2M, suficientes para as concentrações finais de 0, 50, 100 e 200 µM de HU; ao todo foram feitas seis repetições para cada dose). Em seguida as placas foram incubadas por 18 horas a 30 °C, sob o abrigo da luz. Após esse período, as culturas foram submetidas à análise de densidade óptica ( $DO_{660}$ ) em um leitor de ELISA para a análise da sobrevivência. A densidade apresentada pela cultura não tratada foi considerada como 100% de sobrevivência (Toussaint *et al.*, 2006).

### **3.20.4 TRATAMENTO COM UV**

A densidade celular de culturas em fase exponencial de crescimento foi determinada por contagem de células em câmara de Neubauer. Foi retirada uma alíquota de cada cultura (contendo cerca de 500 células), a qual foi espalhada em placas de meio YNB-ágar (contendo 2% de glicose ou galactose). Em seguida, as placas foram irradiadas com lâmpada germicida (254 nm) a 0, 10, 20 ou 40 J/m<sup>2</sup>. As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C e a sobrevivência analisada por contagem de colônias.

### **3.20.5 TRATAMENTO COM MMS**

Foram feitas placas de meio YNB-ágar-gli e YNB-ágar-gal contendo concentrações crescentes de MMS de uma borda a outra [de 0 a 0,05% de MMS (v/v)]. Nestas placas, foram gotejadas alíquotas (2,5 µL) de suspensões celulares diluídas contendo cerca de 500 células por gota (provenientes de culturas em fase estacionária). As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Após este período, avaliamos a sobrevivência das células pela habilidade em formar colônias.

## **3.21 ENSAIOS *IN VIVO* COM BACTÉRIAS**

### **3.21.1 ENSAIO DE TOXICIDADE**

Colônias de bactérias DH5α carregando o vetor pMAL-c2G vazio ou a construção pMAL\_Ogg1A foram inoculadas em meio líquido contendo ampicilina e crescidas por 16 horas a 37 °C. Após este período, cada cultura foi sucessivamente diluída em água estéril até a razão de 1:10<sup>6</sup> (v/v). Uma alíquota (2,5 µL) da suspensão mais diluída de cada cultura foi então gotejada em meio 2xYT sólido, acrescido de ampicilina, contendo ou não 0,1 mM de IPTG. As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C, e o crescimento das células foi analisado em seguida. O ensaio foi feito em triplicata.

### **3.21.2 ENSAIO DE RESISTÊNCIA À KANAMICINA**

Colônias de bactérias carregando diferentes construções plasmídicas foram crescidas sob agitação por 16 horas a 37 °C em meio 2xYT contendo ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, alíquotas de 2,5 µL de diluições sucessivas de cada cultura (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-10</sup>) foram gotejadas em placas de meio 2xYT sólido contendo apenas

ampicilina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e em placas contendo ampicilina, kanamicina ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e IPTG (0,1 mM). As placas foram incubadas por 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , e o crescimento das células foi analisado em seguida.

### **3.21.3 CURVAS DE CRESCIMENTO**

Colônias de bactérias BH20 (*fpg*-) e AB1157 carregando diferentes construções plasmídicas foram inoculadas em meio líquido contendo ampicilina e IPTG 0,1 mM ou apenas ampicilina. Os inóculos foram mantidos, sob agitação constante, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 8 horas (180 rpm), e o crescimento das culturas foi acompanhado através de leituras da densidade óptica a 600 nm, realizadas a cada hora.

### **3.21.4 ENSAIOS DE COMPLEMENTAÇÃO FUNCIONAL HETERÓLOGA**

#### ***I. VARREDURA DE BIBLIOTECA DE S. MANSONI***

Células eletrocompetentes GC4803 foram transformadas com a biblioteca plasmídica em pBSKS de cDNA de *S. mansoni* (Santos *et al.*, 1999) e crescidas em 2xYT/ampicilina até a densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0,6. Em seguida, foram desafiadas em meio 2xYT sólido acrescido de 10 mM de MMS. As placas foram cultivadas por 18 h a  $37^{\circ}\text{C}$  e cada clone selecionado foi novamente plaqueado em meio sólido contendo 10 mM de MMS, para confirmação do fenótipo de resistência.

#### ***II. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA***

Culturas de bactérias mutantes GC4803 (*alk:tag*), BW535 (*xth*, *nfo*, *nth*) e AB1886 (*uvrA*-) carregando diferentes construções plasmídicas foram crescidas até a  $\text{DO}_{600}$  de 0,6 em meio 2xYT/ampicilina e então submetidas a diferentes tratamentos com

luz UV ou MMS, por 10 minutos. Em seguida as culturas foram diluídas em meio 2xYT, plaqueadas em meio 2xYT-ágar e incubadas a 37 °C. Após 18 h de incubação, o número de colônias crescidas em cada placa foi determinado por contagem. O número de colônias crescidas nas placas correspondentes às culturas não tratadas foi considerado como 100% de sobrevivência. A sobrevivência das células ao tratamento foi estabelecida por comparação às culturas não tratadas, em termos percentuais.

Em ensaios com GC4803 foram utilizados 0, 100, 200 e 400 µM de MMS; em ensaios com BW535 foram utilizados 0, 1 e 5 mM de MMS; nos ensaios com luz UV, as células AB1886 foram irradiadas com 0, 1 e 3 J/m<sup>2</sup> de luz UV. Células AB1157 foram utilizadas como controles positivos em cada um dos ensaios.

### **III. ENSAIOS DE MUTAÇÃO EM RIFAMPICINA**

Clones de bactérias carregando diferentes construções plasmídianas foram crescidos em 3 mL de meio 2xYT/ampicilina sob agitação, por 16 horas, a 37°C. Em seguida, 100µL de cada cultura foi diretamente espalhado em 1 placa de Petri pequena de meio 2xYT/ampicilina sólido acrescido de rifampicina (100 µg.µL<sup>-1</sup>). O restante de cada cultura foi sucessivamente diluído em água estéril até a razão de 1:10<sup>6</sup> (v/v). Da suspensão celular mais diluída foi retirada uma alíquota de 100 µL, a qual foi inoculada em 1 placa de meio 2xYT/ampicilina sólido. As placas foram então incubadas a 37°C e após 18 horas de crescimento o número de clones em cada placa foi determinado por contagem.

A frequência de mutantes resistentes a rifampicina (*rpoB* ou Rif<sup>R</sup>) em cada população foi obtida pela razão  $R/Af$ , onde  $R$  corresponde à soma dos clones crescidos na placa com rifampicina;  $A$  é a soma dos clones crescidos na placa com apenas ampicilina, levando em consideração o fator de diluição  $f$  (10<sup>6</sup>) do inóculo utilizado nestas. Para cada



linhagem bacteriana, a frequência de mutantes *rpoB* foi medida em pelo menos 20 culturas de diferentes clones da linhagem. Então, foi obtida a média da frequência de mutantes *rpoB* entre os vários clones testados de cada linhagem.

## 4. Resultados

## **4.1. REPARO DE DNA EM *S. MANSONI*: ESTUDOS COM O GENE IMP4**

### **4.1.1. O CLONE SGC3, DE UMA BIBLIOTECA DE *S. MANSONI* EM ESTÁGIO ADULTO, COMPLEMENTA BACTÉRIAS SENSÍVEIS A MMS**

Uma biblioteca de cDNA de *S. mansoni* em fase adulta foi preparada por nosso grupo (Franco *et al.*, 2000) e convertida em uma biblioteca plasmidiana utilizando o vetor pBlue Script KS+. Com o objetivo de identificar genes de *S. mansoni* envolvidos no reparo ou tolerância a danos no DNA, especialmente aqueles causados por metilação das bases, realizamos uma busca, nessa biblioteca, por cDNAs capazes de complementar bactérias da linhagem GC4803, deficientes nas glicosilases *AlkA* e *TagA*. Conforme apresentado anteriormente, essas enzimas, da via de reparo por excisão de bases (BER), participam da correção de danos no DNA causados por agentes alquilantes.

Bactérias GC4803, altamente sensíveis a MMS, foram transformadas com 500 000 clones da biblioteca plasmidiana e desafiadas em meio sólido na presença dessa droga. O MMS, ou metilmetano sulfonato, é um agente alquilante do tipo S<sub>N</sub>2, que reage com bases no DNA, provocando sua metilação, principalmente em átomos de nitrogênio. O principal dano causado por MMS é a lesão 3-meA (Engelward *et al.*, 1998). A linhagem GC4803 é especialmente sensível a MMS por ser deficiente em glicosilases que fazem o reconhecimento e excisão de 3-meA no DNA. Nosso objetivo foi verificar a existência de cDNAs de *S. mansoni* capazes de complementar a deficiência dessas bactérias, permitindo seu crescimento na presença de 10 mM de MMS. Dos 500 000 clones testados, 10 foram selecionados após o primeiro desafio (dado não mostrado). Estes clones foram novamente plaqueados em meio sólido contendo 10 mM de MMS e apenas um clone, a que

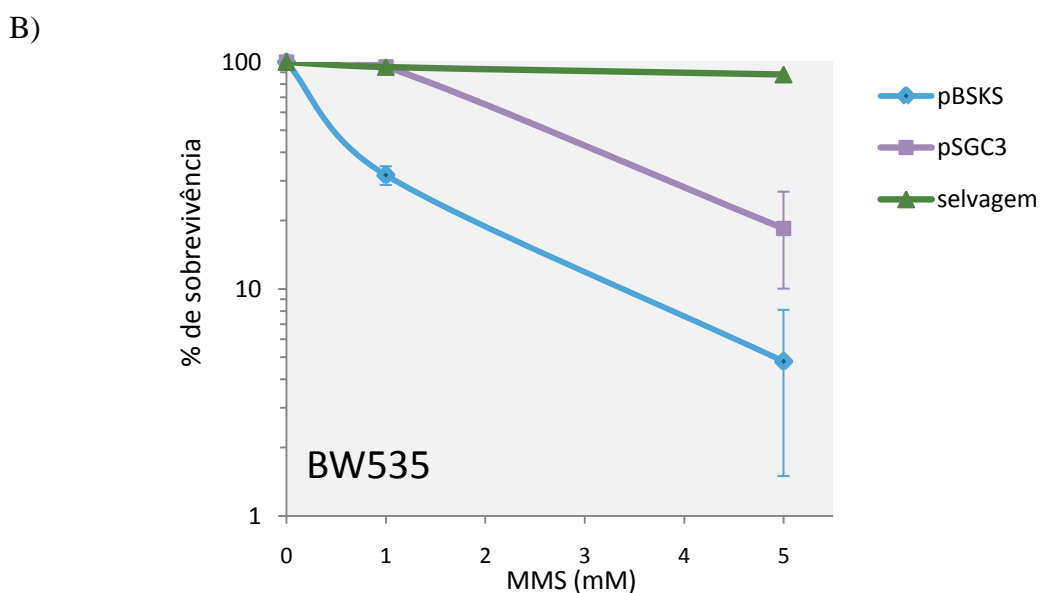
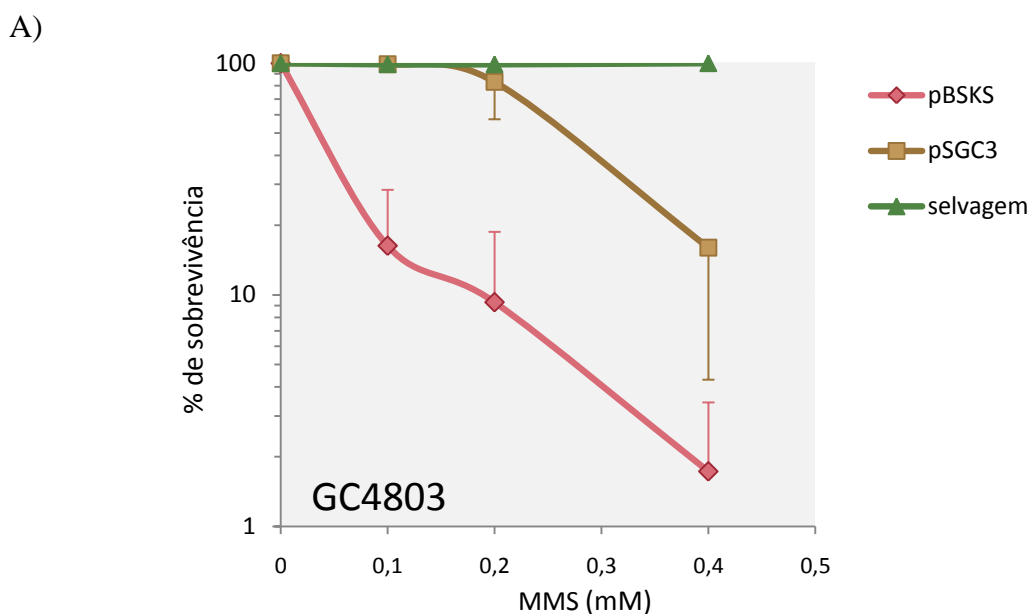
denominamos SGC3, cresceu após o segundo plaqueamento. O vetor plasmidiano do clone selecionado (pSGC3) foi então purificado para procedimentos posteriores.

#### **4.1.2. O CLONE SGC3 COMPLEMENTA LINHAGENS BACTERIANAS DEFICIENTES EM PROTEÍNAS DO BER**

Para confirmar a complementação do fenótipo de sensibilidade a MMS pelo cDNA selecionado de *S. mansoni*, foram realizadas curvas de sobrevivência com diferentes linhagens bacterianas sensíveis a esse agente, carregando os vetores pBSKS vazio ou pSGC3.

Inicialmente, verificamos a sobrevivência apresentada por células selvagens ou por mutantes GC4803 (carregando os vetores pBSKS ou pSGC3) em resposta ao tratamento com 100, 200 e 400  $\mu$ M de MMS. Conforme mostrado na figura 17A, células GC4803 carregando o vetor pBSKS vazio mostraram-se bastante sensíveis a MMS, quando comparadas às células selvagens carregando o mesmo vetor. No entanto, a morte celular decorrente do tratamento com MMS foi diminuída pela expressão do cDNA de *S. mansoni* nas células mutantes GC4803.

Em seguida, verificamos a capacidade de SGC3 em reverter a sensibilidade a MMS em bactérias da linhagem mutante BW535, deficiente nos genes *xth*, *nfo* e *nth* (exonuclease III, endonuclease IV e endonuclease III), que codificam proteínas da segunda etapa do BER (clivagem do sítio AP). Nas curvas de sobrevivência com células BW535, que são menos sensíveis a MMS em relação a GC4803, foram utilizadas doses maiores da droga (1 e 5 mM de MMS). Conforme indicado na figura 17B, o cDNA de *S. mansoni* também foi capaz de complementar parcialmente o fenótipo de sensibilidade a MMS de células BW535, quando comparado ao vetor vazio.



**FIGURA 17 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com MMS.**

Sobrevivência de culturas celulares em resposta ao tratamento com (A) 0, 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de MMS por 10 min ou (B) 0, 1 e 5 mM de MMS por 10 min. ( $\blacktriangle$ ): linhagem selvagem AB1157, transformada com o vetor pBSKS vazio; ( $\blacklozenge$ ): linhagem mutante GC4803, transformada com pBSKS; ( $\blacksquare$ ): GC4803 transformada com pSGC3; ( $\blacklozenge$ ): linhagem mutante BW535, transformada com pBSKS; ( $\blacksquare$ ): BW535 transformada com pSGC3. Os valores correspondem à média de quatro experimentos independentes, as barras representam o desvio padrão.

Estes resultados indicam que o cDNA clonado de *S. mansoni* (SGC3) contribui para o reparo ou tolerância a MMS em bactérias mutantes deficientes em diferentes etapas do BER.

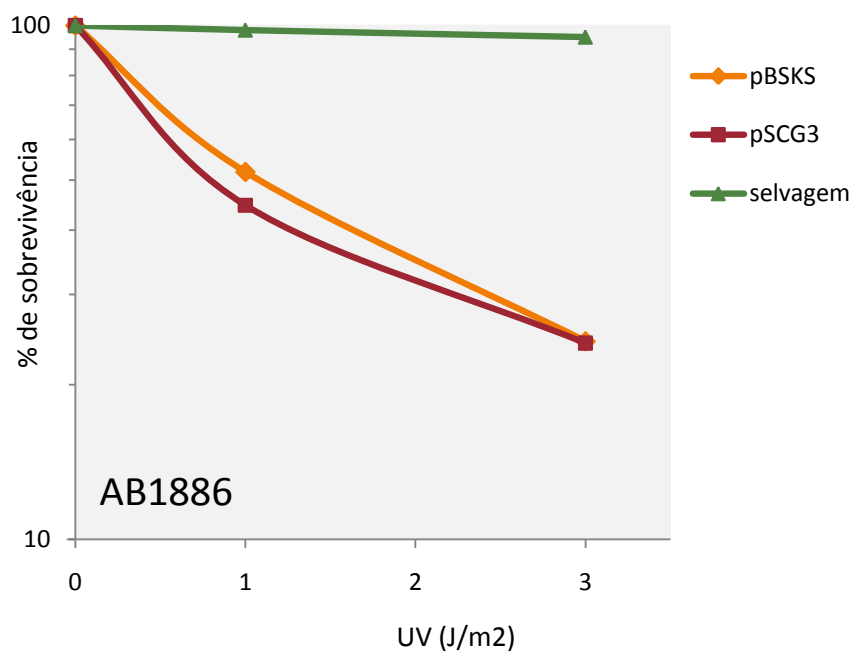
#### **4.1.3.0 CLONE SGC3 NÃO COMPLEMENTA UMA LINHAGEM BACTERIANA DEFICIENTE EM PROTEÍNAS DO NER**

Para verificar a capacidade do cDNA selecionado em complementar bactérias mutantes deficientes em outra via de reparo, realizamos ensaios de sobrevivência com células da linhagem AB1886, deficiente na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e portanto, mais sensível à radiação ultravioleta.

Células AB1886, carregando os vetores pBSKS vazio ou pSGC3, foram analisadas quanto à sobrevivência após exposição a 0, 1 e 3 J/m<sup>2</sup> de luz UV (Figura 18). Conforme esperado, células AB1886 carregando o vetor pBSKS vazio mostraram-se mais sensíveis à luz UV, em relação às células selvagens carregando o mesmo vetor. Além disso, a morte celular decorrente da irradiação não foi diminuída na presença do cDNA de *S. mansoni* nas bactérias mutantes. Este resultado mostra que o cDNA de *S. mansoni* não foi capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade à luz UV apresentado por mutantes AB1886, indicando que SGC3 não participa desta via de reparo.

#### **4.1.4.0 SEQUENCIAMENTO DE SGC3 INDICOU HOMOLOGIA COM IMP4**

O cDNA do clone SGC3 foi sequenciado de ambas extremidades a partir de iniciadores que se anelam nas extremidades da região clonada em pBSKS. As várias sequências parciais obtidas pelo sequenciamento foram combinadas para a predição da sequência do clone (código no GenBank: DQ060567). Esta sequência foi analisada quanto à presença de janelas abertas de leitura (ORFs), pelo programa ORF Finder. A maior ORF



**FIGURA 18 – Sobrevivência de bactérias em resposta ao tratamento com luz UV.** Sobrevivência de culturas celulares em resposta ao tratamento com 0, 1 e 3 J/m<sup>2</sup> de luz UV por 10 min. (▲): linhagem selvagem AB1157, transformada com o vetor pBSKS vazio; (◆): linhagem mutante AB1886, transformada com pBSKS; (■): AB1886 transformada com pSGC3. Os valores correspondem à média de quatro experimentos independentes, as barras representam o desvio padrão.

encontrada codifica um polipeptídeo putativo de 303 aminoácidos, com o peso molecular estimado de 35.684,17 Da e ponto isoeletrico de 8,81.

Foi então feita uma busca em banco de dados não redundante de sequências protéicas, através da ferramenta BLAST, por sequências homólogas àquela codificada pela ORF predita. Essa busca revelou a existência de homologia entre o polipeptídeo putativo de *S. mansoni* e proteínas IMP4 de diferentes organismos (*Danio rerio* e *Xenopus laevis*, 51% de identidade e 72% de similaridade; *Homo sapiens*, 51% de identidade e 69% de similaridade; *Caenorhabditis elegans*, 48% de identidade e 66% de similaridade; *Drosophila melanogaster*, 44% de identidade e 65% de similaridade; *Arabidopsis thaliana*, 46% de identidade e 66% de similaridade; *Schizosaccharomyces pombe*, 45% de identidade e 66% de similaridade; *Saccharomyces cerevisiae*, 43% de identidade e 64% de similaridade) (Figura 19). A proteína IMP4 é componente do complexo U3snoRNP, necessário para a correta maturação do rRNA 18S e assim, essencial à formação da subunidade pequena do ribossomo, em fungos e vertebrados (Hughes and Ares, 1991; Kass et al, 1990; Savino and Gerbi, 1990).

#### **4.1.5. OBTENÇÃO DE LEVEDURAS DEFICIENTES EM IMP4**

Para verificar o envolvimento de IMP4 no reparo de DNA construímos uma linhagem mutante de levedura (linhagem CRIMP4), que contém o gene IMP4 interrompido pela inserção de um cassete HIS3 (Figura 20).

Para tanto, o gene *ScIMP4* foi amplificado a partir de um clone selvagem de *S. cerevisiae* (clone BY4735), com os iniciadores LEV1 e LEV2, e clonado no sítio de *SmaI* do vetor pUC18. Em seguida, o vetor foi linearizado por digestão com *BamHI*, em um sítio localizado internamente ao gene *ScIMP4*. Neste sítio foi introduzido o gene HIS3



```

1 70
S.mansoni M-ERQARLRRLRFIFMRRSTIEV RDAENEKKKK MLKAFALAEKGLPKEIQEGLQLNEELDWS --DGEGEV
D.rerio MLRRREVLRLRK EYLVRKAGEP RLRTIEEKKQ KLSKALDENR LLPTEVRKEA LEVQKLEFD ---EGEGEV
X.leavis MLRRREVLRLRK EYLVRKAGEA KLHSIEEKKE RLKHALDENR LIPTEIRREA LTLQKQLEFD ---EGEGEV
H.sapiens MLRRREARLRRLRFIFMRRKAREE AQRSAQERKE RLRHALDENR LIPTELRRREA LALQGSLEFD ---AGEGEV
C.elegans MLRRRENRLRR EYIFRKSIEE KQKSLEEKRE KIRNALENNT KIDYNLRKDA IELAKG---S ---WGQQY
D.melanoga MLRKQARQRR EYLYNKALTE RLKSKQKIQE TVVKSINENK AIGSKNVKKS LTAYKSLKYA ---EGVDDR
A.thaliana MRRLVRLK EYIVRKSIEG DERKVYEQKR LIRBALAEKGLPIPTELRNV EAKLRQIDLE ---QNTAVP
S.pombe MLRRRAVRRLRFQFIMKRNCEL QEAKLNEKRR ALRHALAEKGL ELNKDLQEDS -QLQKDYKYD S-RATQEET
S.cerevisi MLRRQARRR EYLVRKAGEP QDSQLQQRQ IIKGALAEKGLPLPKELAEDE -SLQKDFRYD SLKESEAD

71 140
*****
S.mansoni ATNQDDEYLW A-GTDDPQV ITTSRSPSSK LKFAKELRF LIPNAAKINR GNYLNKNLLE ACLAKQITDV
D.rerio SSHMDDEYLW A-GVDDPKIM VITSRDPSSR LKMFAKEMKL MFPNAQRNR GNHEVKTIVH ACKSNNVTDL
X.leavis SSHVDDEYLW A-GVDDPKIM ITTSRDPSSR LKIFAKEMRL IFPNAQRNR GKHEVGALVQ ACRANDVTDL
H.sapiens TSHVDDEYLW A-GVDDPKVM ITTSRDPSSR LKMFAKELKL VFPNAQRNR GRHEVGALVR ACKANGVTDL
C.elegans ET--DSEYLW A-GAODPKIV ITTSRDPSSR LKMFAKEMKL IFPNAQRNR GHYDVKQVQV ASKAQDSTDL
D.melanoga TV--NDEYLW A-GCEDPKIM ITTSRDPSSR LKMFEMKELRL IIPNAQRNR GNYQLTLMH ACRANNVTDL
A.thaliana RSHIDDEYAN A-TEADPKIL ITTSRNPSP LIRFTKELKF VFPNQRNR GSQVISEIE TARSHDFTDV
S.pombe ESNLDDEYHR L-GEREPKVL VITSRDPSSR LAQFAKELRL LIPNSRNR GNIVVGSLEV AARANDITDI
S.cerevisi DLQVDDEYAA TSGIMDPRIT VITSRDPSSR LKFAKELKL LFPNQRNR GNYVMPNLVD ACKKSGTDL

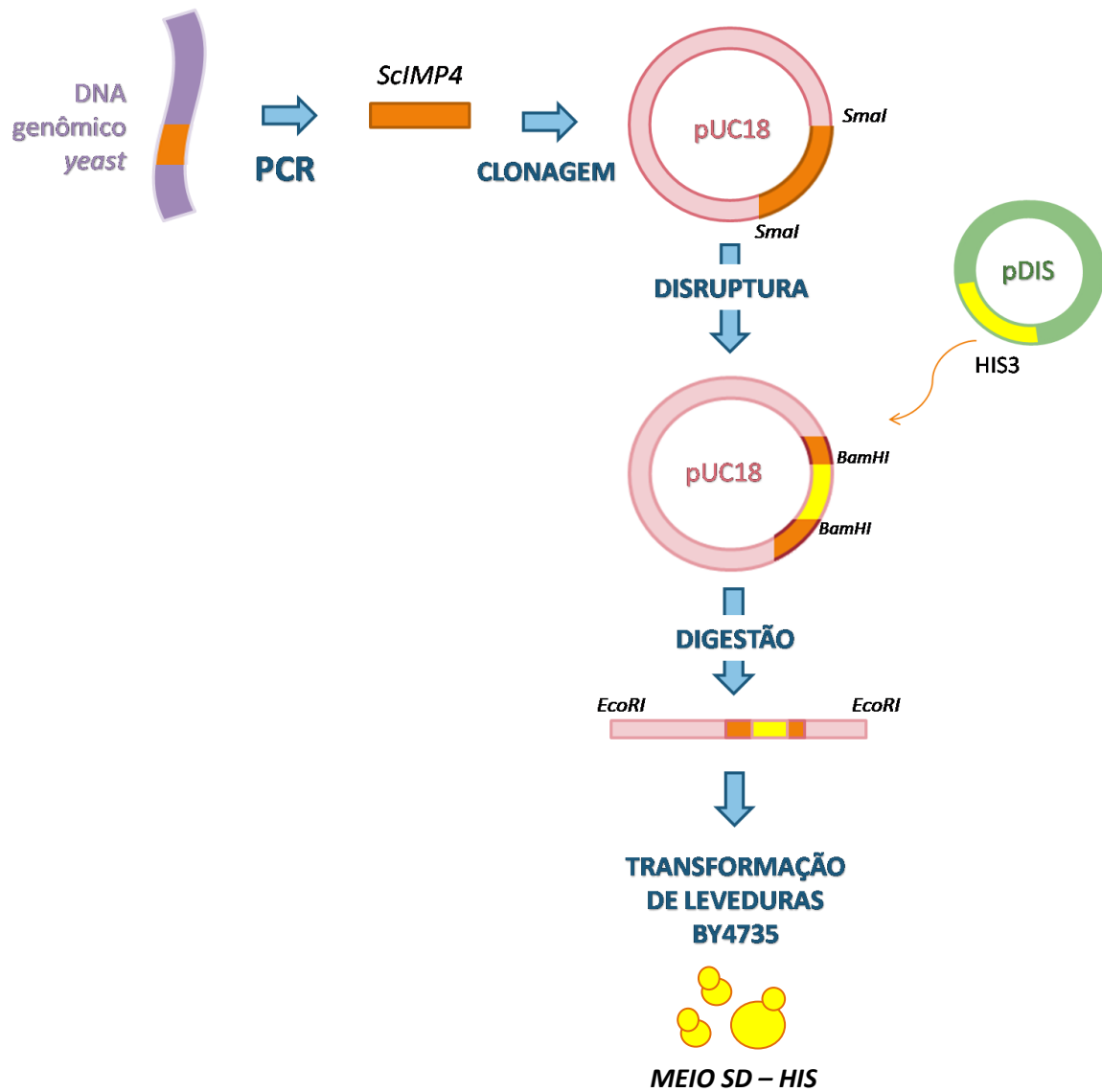
141 210
*****
S.mansoni IIVNEHRCVDP DGLVISHLPF GPTAFELVN VVRHDMETM CGGTGAKLPC TYPNHLIFKGL NSNLGQRVRC
D.rerio VIVHEHRCVDP DGLVCHLPF GPTAFELVN VVMRHVDPD ---LCTMSE APHLIFHNF TSLRGRVSN
X.leavis LIVHEHRCVDP DGLVCHLPF GPTAFELVN VVMRHDI PD ---LCTMSE APHLIFHNF TSLRGRVAD
H.sapiens LVVHEHRCVDP DGLVSHLPF GPTAFELVN VVMRHDI PD ---LCTMSE APHLITHGF SSRGRVSD
C.elegans IIFHEHRCVDP DGLVCHLPF GPTAFELVN VVMRHDI PN ---LCTMSE QPHLIFDNL NSKGRFTT
D.melanoga LIVHEHRCVDP DGLVCHLPY GPTAFELNISD VVMRHDI PD ---LCTMSE QPHLIFNNF KTPHGRVVK
A.thaliana ILVHEHRCVDP DGLVISHLPF GPTAFELVN VVMRHDI SDK K--SICMSE QPHLIFNNF TQMGQRVGN
S.pombe VIIHEHRCVDP DGLVISHLPY GPTAFELVN VVMRHDI PN ---LCTMSE APHLIFENL TSLGRVKT
S.cerevisi VVHEHRCVDP TSLVISHLPF GPTAFELVN VVMRHDI IN ---LCTMSE VPHLIFDNF TSLGRVVC

211 280
*****
S.mansoni LLKHLFPV-P KNDKSRVVTW YEEDVVICFR HBYKYVD-- -KKELETFC EFDLRLYNI WRGELHEEAT
D.rerio LLKHLFPV-P KDSRRVITF ANDDYISFR HBYKKTDH- -KNVELTEVG PRFEMKLYNI RLGTLENEST
X.leavis LMKHLFPV-P KDSKRVVTF ANDDYISFR HBYKKTDH- -KNVELTEVG PRFEMKLYNI RLGTLENEST
H.sapiens LLRYLFPV-P KDSHRVITF ANDDYISFR HBYKKTDH- -RNVELTEVG PRFEMKLYNI RLGTLENEST
C.elegans LLKHLFPV-P KDSKRITF SNSEDIYSFR HBYKKTEND- -GEVELTEAG PRFEMKLYNI RLGTLETLAA
D.melanoga LLKHLFPV-P KENSQRVMSF LNHNDSIIFR HBYKYVN-- -KELETTEVG PRFSIKLYNI RLGTLENIKA
A.thaliana LLKHIFPA-P KIDAKRIVTF SNQSDYISFR NBYDKGEGG PKSIELEKFC PRFELRLYNI RLGTVEQ-NE
S.pombe ALSALFPVDP KDTTPRVVTF ANDDYISFR HBYVAKTG-- PKQIITSEAG PRFEMKLYNI RLGTVDM-VD

281 313
S.mansoni ADHEWVIRPY MNTSKKRLC VRTIISNLILI LL
D.rerio ADVEWRHHPY TETAKKRKFL SVE
X.leavis AEVEWRHHPY TETAKKRKYL SAQ
H.sapiens ADVEWRHHPY TETAKKRKFL STE
C.elegans AEVEWVLRSY TETAKKRKFL SISRADDE
D.melanoga ADHEWVIRPY MNTSKKRLIF SNDPGIINKD TEA
A.thaliana AEHEWVIRPY MNTSKKRFI GE
S.pombe ADVEWKLMPY QR--HKRDVL AE
S.cerevisi ADVEWQLRFF IRTANKDYDL

```

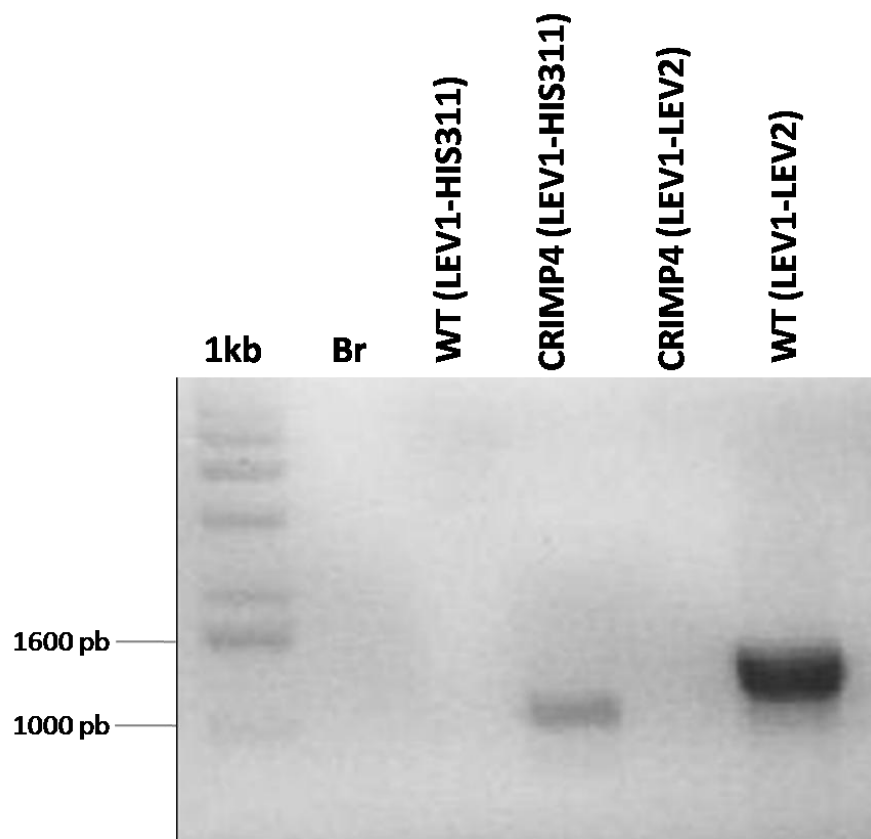
FIGURA 19 – Comparação entre a sequência de aminoácidos de proteínas IMP4 de diferentes organismos e o produto predito do gene clonado de *S. mansoni*. Os resíduos idênticos estão destacados em preto, substituições conservativas estão em negrito. Os asteriscos indicam a porção da proteína envolvida na formação do complexo U3snoRNP.



**FIGURA 20 – Estratégia de construção da linhagem CRIMP4.** O gene *ScIMP4* foi amplificado de DNA genômico da cepa BY4735, clonado no sítio de *SmaI* no vetor pUC, interrompido por um cassete de *HIS3* e usado para transformar leveduras selvagens. Antes da transformação, o vetor foi linearizado por digestão com *EcoRI*.

(que foi retirado do vetor pDIS por digestão com *BamHI*), que confere prototrofia para o aminoácido histidina. O vetor foi linearizado com *EcoRI*, em um sítio presente em pUC18 e então utilizado para transformar leveduras selvagens BY4735. O fragmento contendo o gene *ScIMP4* interrompido por *HIS3* deveria substituir, por recombinação, o gene *ScIMP4* selvagem na levedura. As leveduras transformadas foram selecionadas em meio mínimo SD, contendo 2% de glicose, além dos nutrientes necessários, exceto histidina (SD – *HIS*).

Os clones resultantes da transformação foram testados quanto a interrupção de *ScIMP4* através de PCR de colônia. Quando utilizamos os iniciadores LEV1 e LEV2 (que amplificam a ORF completa do gene *ScIMP4*, além de parte de suas regiões 3' e 5' UTR) em reações de PCR com leveduras selvagens, um fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 1400 pb) foi obtido (Figura 21). No entanto, quando a PCR foi feita a partir de leveduras CRIMP4, não houve amplificação de qualquer fragmento. Este resultado era esperado e sugere que houve a inserção (no local correto) do fragmento recombinante na levedura transformada. Por outro lado, quando realizamos reações de PCR utilizando o iniciador *reverse* HIS311 (que se anela internamente ao cassete *HIS3*) junto com o iniciador *forward* LEV1, a amplificação de um fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 1100 pb) foi vista em reações contendo DNA genômico de leveduras CRIMP4 (Figura 21). No entanto, este fragmento não foi amplificado em reações contendo DNA genômico de leveduras selvagens. Estes resultados indicam que foi possível obter uma levedura contendo o gene *IMP4* interrompido. A linhagem modificada foi denominada CRIMP4.



**FIGURA 21 – Disruptura de ScIMP4 na levedura mutante CRIMP4.** Imagem negativa de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, mostrando produto da PCR de colônia com leveduras selvagens (WT) ou modificadas (CRIMP4) com os pares de iniciadores LEV1/HIS311 ou LEV1/LEV2. (1kb): Padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). (br): Controles negativos das reações de PCR feitos na ausência de leveduras.

#### 4.1.6. UM FRAGMENTO HÍBRIDO CONTENDO A PORÇÃO C-TERMINAL DE IMP4 É EXPRESSO NA LINHAGEM CRIMP4

Embora a deleção completa do gene *ScIMP4* não seja possível, uma vez que é letal em leveduras (Lee e Baserga, 1999), fomos capazes de obter uma linhagem deficiente em IMP4, construindo um gene *ScIMP4* truncado. Para verificar a estrutura de *ScIMP4* na linhagem mutante CRIMP4, realizamos o sequenciamento do gene truncado presente no vetor pUC18, o qual utilizamos na construção da linhagem mutante.

O sequenciamento mostrou que: (i) a região remanescente de *ScIMP4* a 5' do cassete HIS3 é constituída de 257 pb (destacada em cinza na figura 22), (ii) a região remanescente de *ScIMP4* a 3' do cassete HIS3 é constituída de 616 pb (também destacada em cinza), (iii) existe um códon de terminação TAG na região 5' UTR de *HIS3*, em fase com o ATG inicial de *ScIMP4* e (iv) existe um ATG no cassete HIS3, em fase com o códon de terminação de *ScIMP4*. Este ATG corresponde ao códon de iniciação do gene *Ded1*, cuja porção inicial também está presente no cassete HIS3 (conforme mencionado anteriormente, o cassete HIS3 foi obtido pela digestão do vetor pDIS com a endonuclease *BamHI* e é constituído do gene *HIS3* além de regiões flanqueadoras a 3' e a 5', incluindo regiões UTR e o início do gene *Ded1*, a 3' do gene *HIS3*) (Figura 22).

Dessa forma, é possível que duas proteínas truncadas sejam produzidas na levedura CRIMP4: uma proteína menor, contendo 86 resíduos N-terminais de Imp4p, cuja sequência codificadora está grifada por uma linha única na figura 22 e outra maior, híbrida, cuja sequência codificadora está grifada por uma linha dupla, a qual seria constituída pelos primeiros 112 aminoácidos de DED1 e por 204 aminoácidos C-terminais de Imp4p, incluindo domínios conservados que participam da biogênese de RNA (Wehner e Baserga, 2002).



ATGCTAAGAAGACAAGCCCGTGAAAGGAGAGAATATCTATACAGAAAAGCGCAAGAATTACAAGATTCTCAACTGCAACA  
AAAACGTCAAATAATTAACAAGCGCTAGCTCAGGGGAAGCCATTGCCAAAGGAAGCTAGCAGAAGATGAGAGTTTACAAA  
AGGATTTTCAGATATGACCAAAGTTTAAAGGAGAGCGAAGAAGCAGATGATCTACAGGTTGATGATGAATATGCTGCCACA  
AGTGGTATAATGGATCCGCTGCACGGTCCGTTCCTAGCATGTACGTGAGCGTATTTCTTTTAAACCACGACGCTTTG  
TCTTCATTCAACGTTTCCATTGTTTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGAAAAACTTATCGAAAAGATGACGACTTTTT  
CTTAATTCTCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTGAACACGGCATTAGTCAGGGAAG  
TCATAACACAGTCCTTTCCCGCAATTTCTTTTTCTATTACTCTTGGCCCTCTAGTACACTCTATATTTTTTTATGCC  
TCGGTAATGATTTTCATTTTTTTTTTCCACCTAGCGGATGACTCTTTTTTTTTCTTAGCGATTGGCATTATCACATAAT  
GAATTATACATTATATAAAGTAATGTGATTTCTTCGAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAA  
GATGACAGAGCAGAAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATGAAACCAAGATTCAGATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGTC  
CCCTAGCGATAGAGCACTCGATCTTCCAGAAAAGAGGCAGAAGCAGTAGCAGAACAGGCCACACAATCGCAAGTGATT  
AACGTCCACACAGGTATAGGTTTCTGGACCATATGATACATGCTCTGGCCAAGCATTCCGGCTGGTGGTAAATCGTTGA  
GTGCATTGGTGACTTACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGTCAAGCTTTTAAAGAGG  
CCCTAGGGGCCGTGGTGGAGTAAAAGGTTTGGATCAGGATTTGGCCCTTTGGATGAGGCACTTTCCAGAGCGGTGGTA  
GATCTTTGCAACAGGCCGTACGCAGTTGTGCAACTTGGTTTGCAAGGGAGAAAGTAGGAGATCTCTCTTGGCAGATGAT  
CCCGCATTTCTTGAAAGCTTTGCAGAGGCTAGCAGAAATTACCCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATGATCATC  
ACCGTAGTGAGAGTGGTTCAAGGCTCTTGGGTTGCCATAAGAGAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACGATGTTCCO  
TCCACCAAAGGTGTTCTTATGTAAGTACACCGATTATTTAAAGCTGCAGCATACGATATATATACATGTGTATATATGTA  
TACCTATGAATGTCAGTAAGTATGTATACGAACAGTATGATACTGAAGATGACAAGGTAATGCATCATTCTATACGTGTC  
ATTCTGAACGAGGCGCGCTTTCCTTTTTCTTTTTGCTTTTTCTTTTTTTTTCTTGAACCTCGAGAAAAAAAATATAAA  
AGAGATGGAGGAACGGGAAAAAGTTAGTTGTGGTGATAGGTGGCAAGTGGTATTCGTAAGAACACAAGAAAAGCATT  
CATATTATGGCTGAACCTGAGCGAACAAAGTGCAAAATTTAAGCATCAACGACAAACAACGAGAAATGGTTATGTTCCCTCA  
CTTAAGAGGAAAAACAAGAAGTGCCAGAAATAACAGTAGCAACTACAATAACAACAACGGCGGCTACAACGGTGGCCGTG  
GCGGTGGCAGCTTCTTTAGCAACAACCGTCTGGTGGTTACGGCAACGGTGGTTTCTTCGGTGGAAACAACGGTGGCAGC  
AGATCTAACGGCCGTTCTGGTGGTAGATGGATCGATGGCAACATGTCCAGCTCCAAGAAACGAAAAGGCCGAGATCGC  
CATATTTGGTGTCCCCGAGGATCCAAGAAATCATCGTCACAACATCTCGTGACCCAAGCACTCGTCTCTCGCAATTTGCCA  
AAGAAATTAACCTGCTATTTCCAAATGCTGTGAGGCTGAACAGAGGTAATATGTGATGCCAAATCTAGTGGATGCTTGT  
AAAAATCCGGTACTACAGATTTGGTGGTATTACATGAACATAGAGGTGTTCCAACCTCTTTGACCATATCACATTTTCC  
ACATGGACCCACTGCACAGTTTAGTTTACACAATGTTGTTATGAGACATGATATTATAAATGCTGGTAACCAAAGCGAAG  
TGAATCCACATCTAATATTTGATAACTTTACTACCGCTTTAGGGAAAAGAGTAGTCTGTATTTAAAGCACTTGTTCAT  
GCGGGGCCCAAAAAGATTCCGAAAGAGTAATCACTTTTGCGAATAGGGGTGATTTTCATTAGCGTTAGACAGCATGTATA  
TGTGAGAACAAAGAGAGGGAGTAGAGATTGCCAAGTTGGTCTAGATTTGAGATGAGGTTGTTTGAACGAGGTTGGGAA  
CTTTAGAAAATAAGGACGCTGATGTTGAGTGGCAGTTGAGAAGATTCATAAGGACTGCCAATAAAAAAGACTATTTGTGA

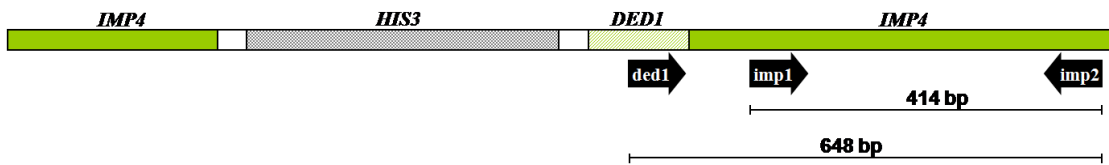
**FIGURA 22 – Estrutura de ScImp4 na linhagem mutante CRIMP4.** Sequência do gene ScIMP4, modificado na linhagem CRIMP4 por inserção de um cassete HIS. As bases correspondentes ao gene ScIMP4 estão marcadas em cinza. As bases correspondentes ao cassete HIS estão em itálico. A ORF de HIS3 está destacada em preto. Polipeptídeos truncados são supostamente codificados pelas bases sublinhadas com traço simples ou duplo. Os nucleotídeos em itálico sublinhados com traço duplo codificam os 112 primeiros aminoácidos de DED1 e estão em fase com a porção final do gene ScIMP4 (representada em cinza, grifada com traço duplo) (Número de acesso no Genbank: DQ423791).

Para confirmar a expressão do fragmento híbrido (aquele que contém a região C-terminal de *ScIMP4*) nas leveduras CRIMP4, realizamos RT-PCR utilizando o *primer forward* DED1, que se anela no gene DED1, e o *primer reverse* IMP2, que se anela na porção C-terminal de *ScIMP4*. Conforme indicado na figura 23, um fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 650 pb) foi amplificado em reações de PCR a partir de cDNA de leveduras CRIMP4, mas não foi amplificado a partir de cDNA de leveduras selvagens. Como controle, realizamos reações utilizando os iniciadores IMP1 e IMP2, que se anelam na porção final do gene IMP4 e vimos que um fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 400 pb) foi amplificado tanto a partir de leveduras selvagens quanto a partir de leveduras CRIMP4. Uma vez que a proteína Imp4p é essencial a leveduras, nossos resultados sugerem que a expressão deste putativo polipeptídeo híbrido (ou de ambos polipeptídeos putativos) foi suficiente para assegurar a sobrevivência das leveduras.

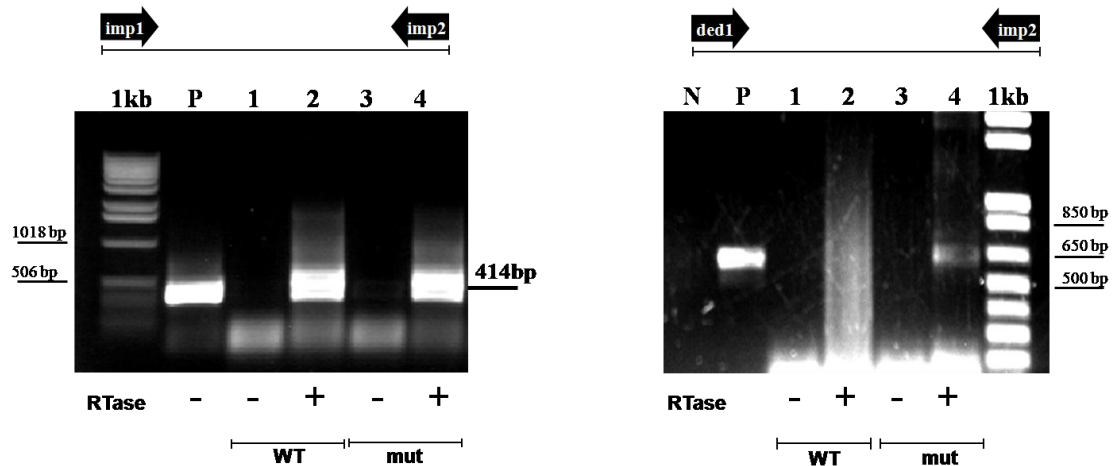
#### **4.1.7.A LEVEDURA CRIMP4 APRESENTA CRESCIMENTO LENTO EM RELAÇÃO À LINHAGEM SELVAGEM**

Para estudar o papel do gene *ScIMP4* na levedura, analisamos vários fenótipos da linhagem mutante CRIMP4. Inicialmente, verificamos que as leveduras CRIMP4 apresentam morfologia e brotamento normais (dado não mostrado). Também observamos que as células mutantes apresentam metabolismo de rRNA aparentemente normal. Quando analisamos em gel de agarose o RNA extraído dessas células, e o comparamos com o RNA extraído de células selvagens, vimos que a intensidade da banda correspondente ao rRNA 18S é semelhante entre as duas linhagens (Figura 24A), sugerindo que a expressão do fragmento híbrido, já mencionada, permite o processamento correto do pré-rRNA. Por outro lado, quando avaliamos o crescimento de células CRIMP4, percebemos que estas

A)



B)



**FIGURA 23 – Detecção de mRNA corresponde à porção C-terminal de ScIMP4 em leveduras mutantes CRIMP4.** (A) Esquema ilustrativo acerca da estrutura do gene SmIMP4 interrompido na linhagem mutante CRIMP, mostrando o local de anelamento dos iniciadores utilizados na RT-PCR. (B) Géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando o produto de reações de PCR a partir do cDNA (RTase +) ou RNA (RTase -) de leveduras selvagens (WT) ou CRIMP4 (mut). Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão indicados por setas em preto. (P): controles positivos feitos a partir de DNA genômico de leveduras selvagens (gel da esquerda) ou de leveduras CRIMP4 (gel da direita); (1kb): padrão de peso molecular.



apresentam crescimento retardado em relação às células selvagens (Figura 24B), o que poderia indicar uma deficiência no metabolismo de RNA

#### **4.1.8.O GENE *IMP4* DE *S. MANSONI* RESTAURA O CRESCIMENTO DA LEVEDURA CRIMP4 NA PRESENÇA DE GALACTOSE**

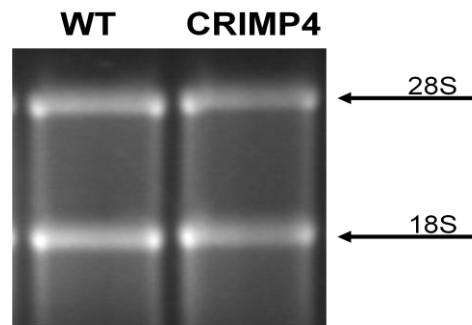
Para determinar se o gene *IMP4* de *S. mansoni* seria capaz de complementar possíveis fenótipos mutantes de CRIMP4, esta linhagem foi transformada com o vetor pYEDP carregando o gene do parasita (pYSmIMP4). A expressão de um fragmento clonado em pYEDP (Anexo 5) é garantida pela presença do promotor GAL e ocorre quando a levedura é crescida em meio contendo galactose como fonte de açúcar. Como controle positivo da complementação, estas leveduras foram também transformadas com o vetor pYEDP contendo o gene *IMP4* de *S. cerevisiae* (pYScIMP4). Como controle negativo, as leveduras CRIMP4 foram transformadas com o vetor pYEDP vazio.

Inicialmente, verificamos que a levedura CRIMP4 transformada com o vetor pYSmIMP4 apresenta o crescimento restabelecido na presença de galactose, ou seja, em condições de expressão do gene de *S. mansoni* (Figura 25). Por outro lado, na presença de glicose, o crescimento da levedura mutante é lento, conforme já havia sido verificado. O crescimento da cultura também foi restabelecido na presença do gene da levedura (pYScIMP4), mas não é alterado pelo vetor vazio (pYEDP).

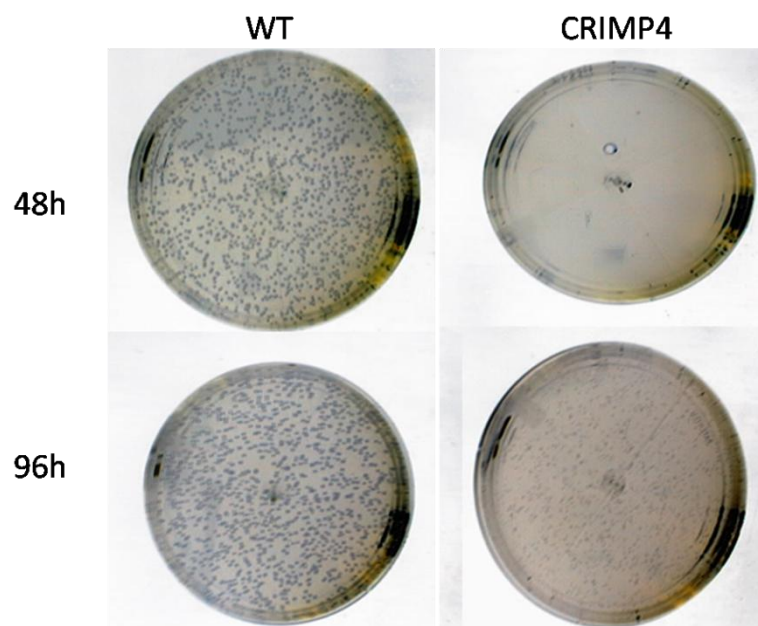
#### **4.1.9.LEVEDURAS CRIMP4 NÃO APRESENTAM SENSIBILIDADE ACENTUADA À HIDROXIURÉIA**

Partimos então para a verificação do envolvimento do gene *IMP4* no metabolismo de DNA, analisando a sensibilidade de leveduras CRIMP4 ao tratamento com diferentes agentes genotóxicos.

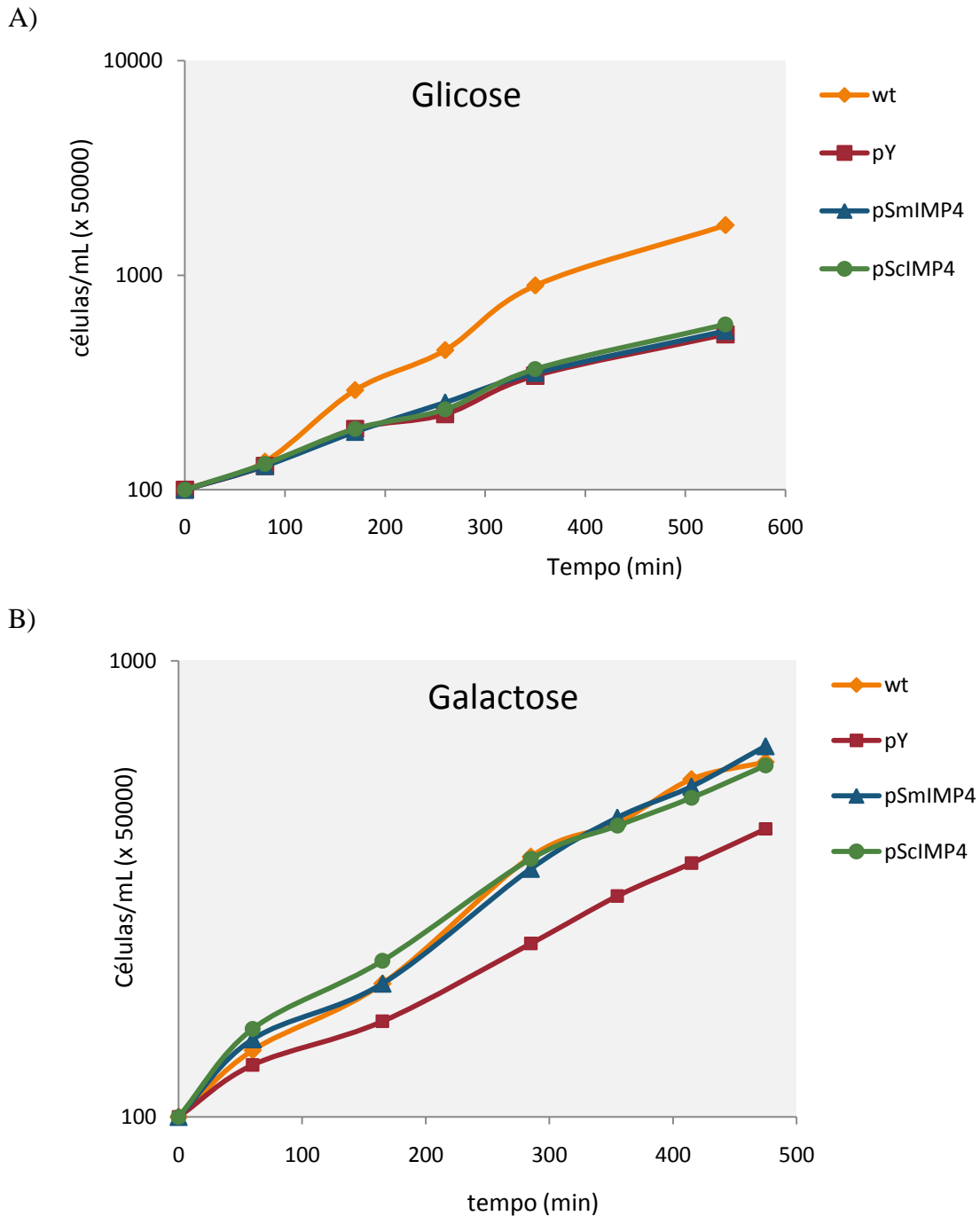
A)



B)



**FIGURA 24 – RNA total e crescimento de leveduras CRIMP4.** (A) Gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo, onde foi aplicado 1 $\mu$ L da amostra de RNA total extraído de  $2 \times 10^8$  leveduras selvagens (WT) ou mutantes (CRIMP4). (B) Placas de cultura mostrando a formação de colônias por leveduras selvagens (WT) ou mutantes (CRIMP4) após 48 ou 96 horas de crescimento em meio sólido. Cerca de 700 células foram espalhadas por placa.



**FIGURA 25 – Crescimento, em glicose ou galactose, de leveduras CRIMP4 carregando diferentes construções plasmídicas.** O crescimento de culturas de leveduras CRIMP4, transformadas com os vetores pYEDP vazio (■), pYSmIMP4 (▲) ou pYScIMP4 (●) foi comparado ao crescimento da cultura selvagem BY4735 (◆), na presença de glicose (A) ou galactose (B). A densidade celular das culturas foi avaliada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer, em intervalos de tempo regulares.

Inicialmente, avaliamos a sobrevivência das leveduras mutantes em diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU). A sensibilidade a HU, droga que causa interrupção na síntese de DNA, está associada a defeitos nos mecanismos de *checkpoint* de fase S. Nossos resultados (Figura 26) mostram que, em glicose ou galactose, os mutantes CRIMP4 são tão sensíveis a HU quanto células selvagens, sugerindo que IMP4 não está envolvida em *checkpoint* de fase S.

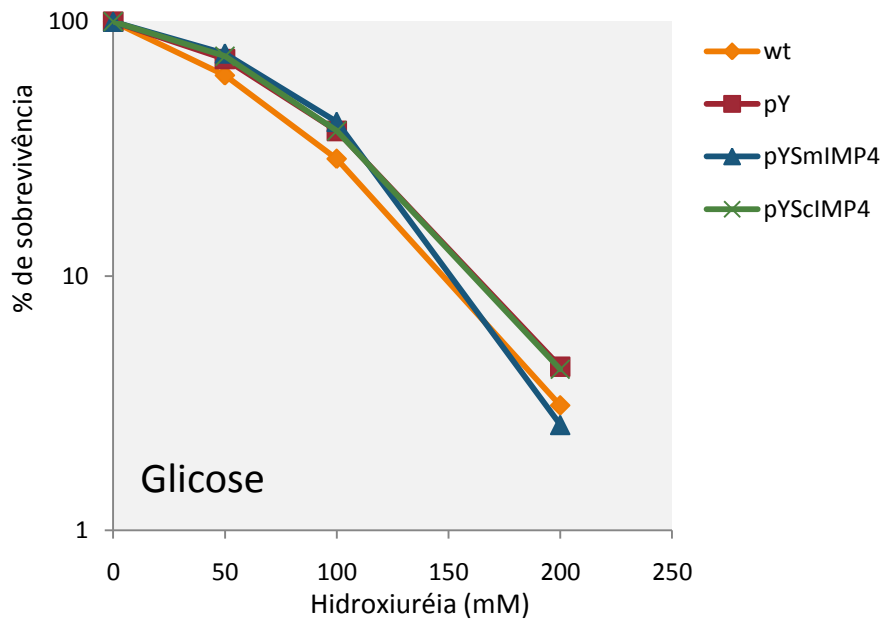
#### **4.1.10. LEVEDURAS CRIMP4 APRESENTAM SENSIBILIDADE ACENTUADA A MMS, A QUAL É REDUZIDA NA PRESENÇA DO GENE IMP4 DE *S. MANSONI***

Para avaliar o envolvimento de IMP4 no reparo de DNA em *S. cerevisiae*, estudamos a resposta de células mutantes ao tratamento com luz UV e MMS, agentes que causam lesões no DNA. A sensibilidade das células a esses agentes foi analisada através de testes de crescimento em placa.

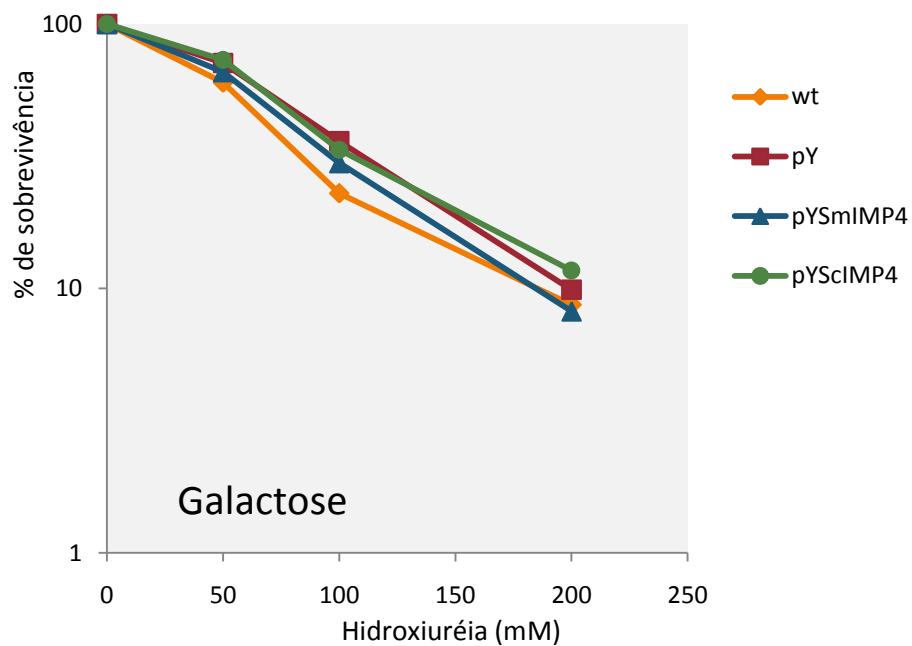
Inicialmente, verificamos que as células mutantes são tão sensíveis à luz UV quanto células selvagens, em glicose ou galactose (dado não mostrado). Este resultado está de acordo com aqueles obtidos com bactérias mutantes e indicam que o gene IMP4 não está envolvido na tolerância à luz UV ou no reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

Uma vez que o cDNA de *S. mansoni* foi capaz de complementar bactérias sensíveis a MMS, analisamos a sensibilidade das leveduras mutantes a este agente alquilante. Em conformidade com os dados gerados em bactérias, leveduras CRIMP4 são mais sensíveis a MMS que leveduras selvagens (dado não mostrado). De maneira interessante, nossos resultados mostram que, quando crescidas na presença de galactose, leveduras CRIMP4 carregando o vetor pYSmIMP4 apresentam menor sensibilidade a MMS em relação às leveduras mutantes carregando o vetor vazio (Figura 27). Vimos

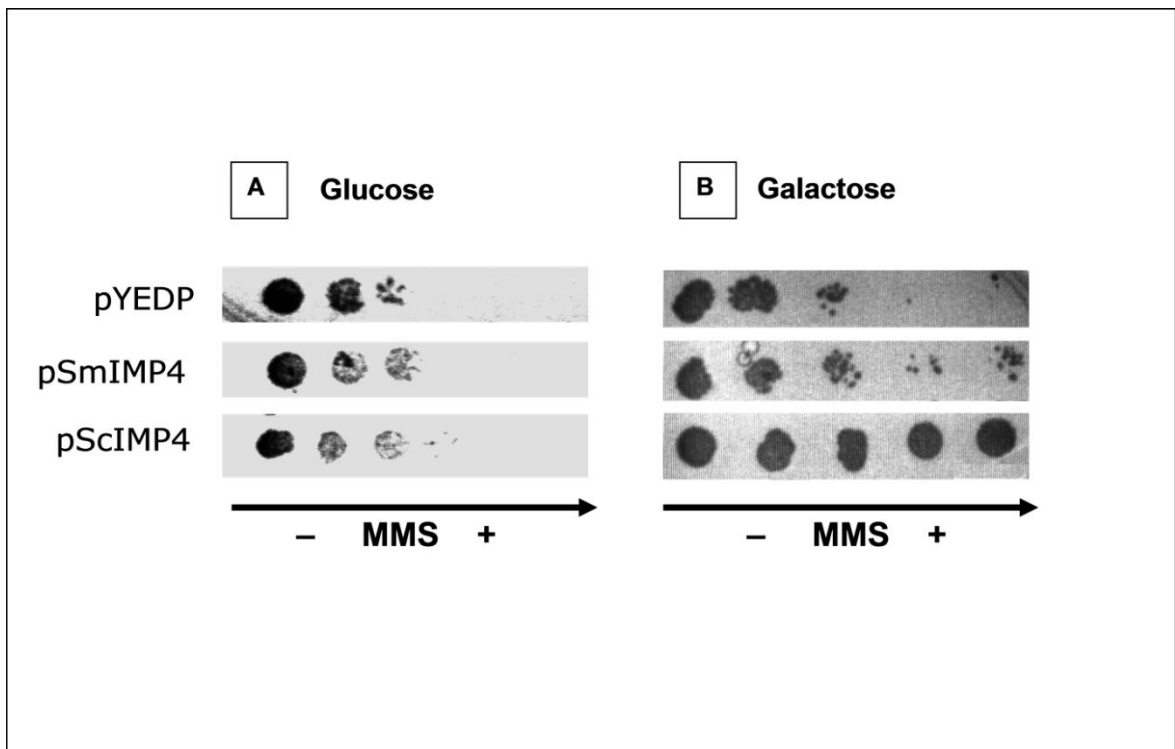
A)



B)



**FIGURA 26 – Sobrevivência de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em resposta ao tratamento com HU.** Sobrevivência após tratamento com 0, 50, 100 e 200 mM de hidroxiuréia, apresentada por culturas de leveduras CRIMP4 transformadas com os vetores pYEDP vazio (■), pYSmIMP4 (▲) ou pYScIMP4 (●) e culturas selvagens BY4735 (◆), na presença de glicose (A) ou galactose (B). A sobrevivência foi determinada pela medida da densidade óptica das culturas.



**FIGURA 27 – Crescimento de leveduras CRIMP4, carregando diferentes construções plasmídicas, em meio sólido contendo MMS.** Aliquotas de culturas de leveduras CRIMP4 transformadas com os vetores pYEDP, pYSmIMP4 ou pYScIMP4 foram gotejadas em placas de meio sólido contendo quantidades crescentes de MMS, na presença de glicose ou galactose como fonte de açúcar. O crescimento em MMS foi avaliado pela habilidade das células em formar colônias.

também que, conforme esperado, o gene de *S. cerevisiae*, quando expresso pelas células CRIMP4 (em galactose) foi capaz de reverter completamente este fenótipo. Estes dados reforçam nossa hipótese de que a proteína IMP4, além de participar do metabolismo de RNA, participa do reparo de lesões causadas por MMS no DNA ou de mecanismos de tolerância ao MMS ou às lesões geradas pela droga.

## **4.2. ANÁLISE DA RESPOSTA DE DIFERENTES CEPAS DE *T. CRUZI* A AGENTES GENOTÓXICOS**

Iniciamos o estudo dos fatores associados à geração de variabilidade genética em *T. cruzi* investigando a via de reparo de erros de pareamento (MMR), uma vez que essa via apresenta um papel crucial, evolutivamente conservado, na manutenção da fidelidade da replicação do DNA, além de influenciar outros processos geradores de diversidade genética, como a recombinação homóloga (revisado por Schofield & Hsieh, 2003 e por Waldman, 2008). Nossos estudos iniciais com *TcMSH2* de diferentes cepas de *T. cruzi* revelaram a existência de três isoformas dessa proteína que é um dos componentes chaves do MMR em eucariotos (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Algumas evidências nos levaram a propor uma hipótese sugerindo a existência de diferenças funcionais entre as isoformas de *TcMSH2* e que tais diferenças seriam refletidas em variações na eficiência do reparo de erros de pareamento (MMR) nas diferentes cepas do parasito e, como consequência, nos níveis de variabilidade genética entre elas (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006; Machado-Silva *et al.*, 2008).

Ensaio de tolerância à cisplatina e a MNNG (Campos *et al.*, artigo em preparação) utilizando quatro cepas de *T. cruzi*, indicam maior eficiência do MMR em cepas que codificam a isoforma A de *TcMSH2*. Esses ensaios foram feitos com a cepa JG e o clone Esmeraldo cl3, ambos da linhagem *T. cruzi* II, que codificam *TcMSH2C*, além

dos clones Col1.7G2 e Silvio X10, da linhagem *T. cruzi* I, que apresentam TcMSH2A (ver Figura 12 na sessão Introdução). Foi avaliada a sobrevivência das quatro cepas em resposta ao tratamento com diferentes doses de cisplatina ou MNNG. Como mostrado nas curvas de sobrevivência da figura 12B, cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I (Colombiana e Silvio) apresentaram maior sensibilidade em resposta ao tratamento por 48 horas com 20  $\mu$ M ou 30  $\mu$ M de cisplatina, quando comparadas às cepas de *T. cruzi* II (JG e Esmeraldo). Da mesma forma, as mesmas cepas de *T. cruzi* I foram mais sensíveis ao tratamento por 72 horas com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M do agente alquilante MNNG (Figura 12C). Esses resultados indicam, portanto, que parece haver uma maior eficiência do MMR em cepas codificando a isoforma A de TcMSH2, estando também de acordo com os dados obtidos através de análise *in vitro* da atividade ATPásica de TcMSH2 (Machado-Silva, 2008) e de análises de instabilidade de microssatélites após estresse oxidativo (Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

#### **4.2.1. O CÁDMIO MODIFICA A RESPOSTA DOS CLONES AO TRATAMENTO COM CISPLATINA E MNNG**

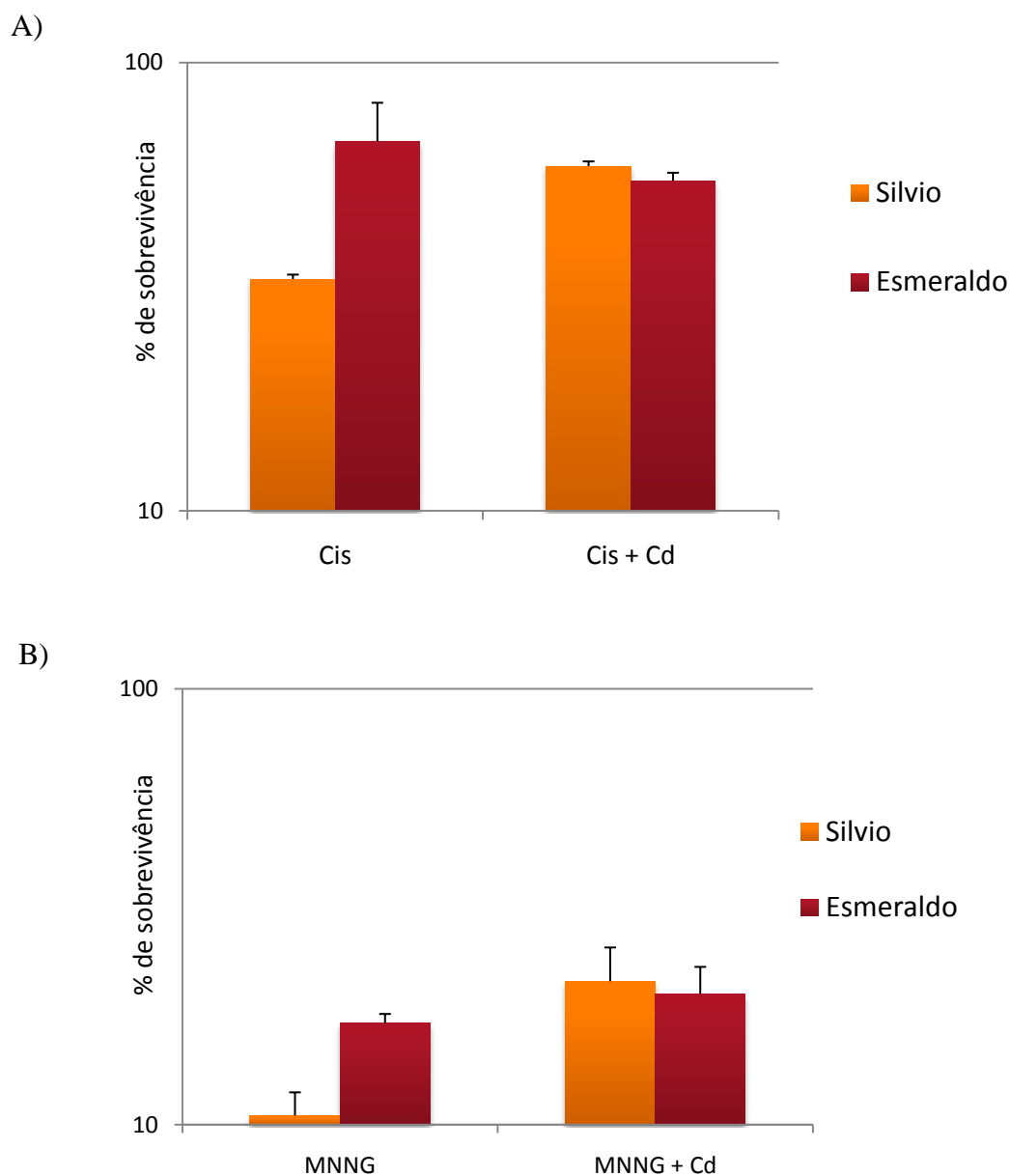
Para verificarmos se a resposta diferencial dos parasitos ao tratamento com cisplatina e MNNG seria realmente devida a diferenças na eficiência do MMR, comparamos a sobrevivência de culturas das cepas Silvio (*T. cruzi* I, TcMSH2A) e Esmeraldo (*T. cruzi* II, TcMSH2C) após o tratamento com esses agentes genotóxicos, na ausência e na presença de um inibidor específico do MMR, o cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ). Em leveduras e extratos de células humanas, baixas concentrações de cádmio (na ordem de micromolares) inibem o MMR através da inibição da atividade ATPásica de MSH2 (Jin *et al.*, 2003; Clark e Kunkel, 2004; Banerjee e Flores-Rozas, 2005). Trabalhos de Machado-Silva e colaboradores (2008) mostraram que ocorre diminuição da atividade ATPásica de TcMSH2 na presença de 10 $\mu$ M de  $\text{CdCl}_2$  (veja Figura 11 na sessão Introdução).



Culturas em fase exponencial de crescimento dos clones Silvio X10 c11 e Esmeraldo c13 foram tratadas com 30 $\mu$ M de cisplatina, na presença ou ausência de 3  $\mu$ M de cloreto de cádmio. Após 48 horas de crescimento, a sobrevivência das culturas foi avaliada através da contagem de células vivas em câmara de Neubauer. Conforme mostrado na figura 28A, a sensibilidade do clone Silvio X10 em resposta ao tratamento com 30  $\mu$ M de cisplatina (30% de sobrevivência em relação à cultura não tratada em condições normais) é diminuída na presença de 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, tornando-se semelhante à do clone Esmeraldo (cerca de 50% de sobrevivência em relação à cultura não tratada), que é naturalmente mais tolerante à droga. Estes resultados sugerem que a maior tolerância à cisplatina apresentada anteriormente pelas cepas JG e Esmeraldo (que codificam TcMSH2C) seria consequência de um MMR menos eficiente em relação às cepas Silvio e Colombiana (que codificam TcMSH2A).

De modo semelhante, as mesmas culturas foram tratadas com 100  $\mu$ M de MNNG, na presença ou ausência de 3  $\mu$ M de cloreto de cádmio. O crescimento das culturas tratadas foi analisado, após três dias de tratamento, em relação às culturas não-tratadas. Como mostrado na figura 28B, a diferença existente entre as respostas das populações clonais de Silvio e Esmeraldo ao tratamento por 72 horas com 100  $\mu$ M de MNNG é abolida na presença de 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. Estes resultados dão suporte à hipótese de que as diferenças na susceptibilidade a MNNG apresentadas por linhagens divergentes de *T. cruzi* devem-se a variações no MMR entre elas.

Juntos, os dados gerados através de ensaios *in vivo* utilizando cisplatina, MNNG e cloreto de cádmio reforçam a hipótese proposta de que o MMR (ou MSH2) pode ser um dos fatores responsáveis pela maior geração de variabilidade em linhagens *T. cruzi* II, quando comparada a cepas da linhagem *T. cruzi* I.



**FIGURA 28 – Efeito do cádmio na resposta de diferentes cepas de *T. cruzi* ao tratamento com cisplatina e MNNG.** Sobrevivência de culturas de Esmeraldo c13 (■) e Sílvio X10 c11 (■), em relação às culturas não tratadas correspondentes, após (A) 48 h de tratamento com 30  $\mu$ M de cisplatina na ausência de  $\text{CdCl}_2$  (*Cis*) ou 30  $\mu$ M de cisplatina na presença de 3 $\mu$ M de  $\text{CdCl}_2$  (*Cis+Cd*) ou após (B) 72h de tratamento com 100  $\mu$ M de MNNG, na ausência (MNNG) ou presença (MNNG+Cd) de 3 $\mu$ M de  $\text{CdCl}_2$ . A sobrevivência foi avaliada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer, na presença de corante vital. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.

#### **4.2.2. AS CEPAS SILVIO E COLOMBIANA APRESENTAM MAIOR SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Já é conhecida a participação de proteínas do MMR (especialmente de MSH2), desde bactérias até humanos, na resposta a danos oxidativos, em especial no reconhecimento e correção de erros de pareamento envolvendo 8-oxoG (Le Page *et al.*, 2000;. Pitsikas *et al.*, 2007). Caso o MMR (ou TcMSH2) esteja envolvido na prevenção de danos celulares gerados por ROS em *T. cruzi*, a existência de variantes de TcMSH2 (apresentam diferenças funcionais e possivelmente ocasionam variações na eficiência do MMR), prevê diferenças na resposta ao estresse oxidativo entre linhagens que codificam diferentes isoformas dessa proteína.

Dessa forma, Campos e colaboradores (artigo em preparação) analisaram também a sobrevivência das cepas JG, Esmeraldo, Silvio e Colombiana em resposta ao estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os resultados obtidos pelo tratamento das quatro cepas com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 48 horas (veja Figura 12 D na sessão Introdução) mostraram que as cepas Silvio e Colombiana, que apresentam a isoforma A de TcMSH2, apresentaram maior sobrevivência em resposta ao estresse oxidativo, quando comparadas às cepas que codificam a isoforma C da proteína (JG e Esmeraldo).

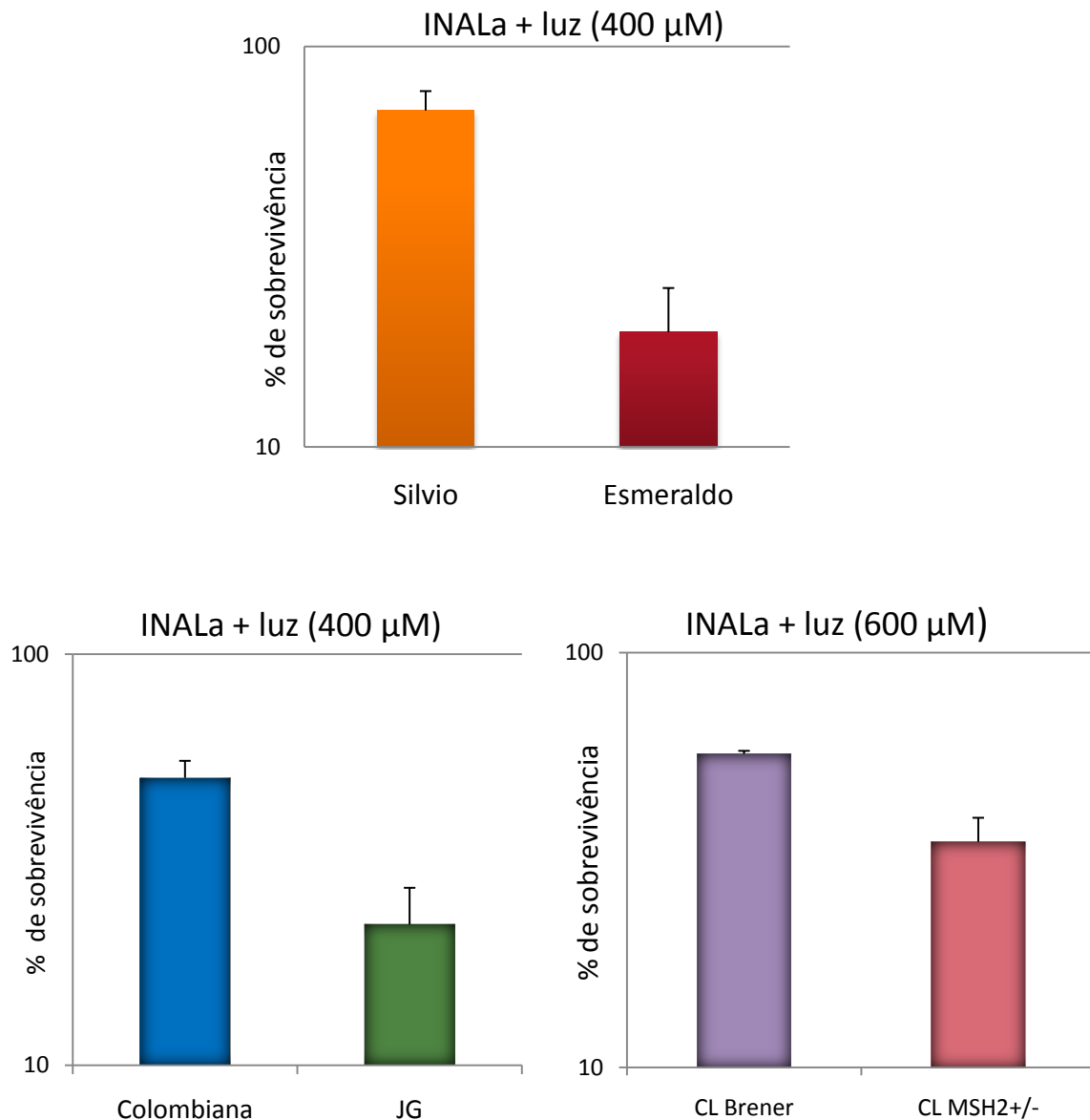
Analisamos separadamente a sensibilidade dos clones Silvio X10 cl1 e Esmeraldo cl3 e das cepas JG e Colombina ao composto INALa (2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) propionamida) (Figura 29). Essa substância fotosensibilizadora, depois de estimulada por luz em comprimentos de onda acima de 300nm promove danos oxidativos no DNA, havendo, inclusive a formação de 8-oxoG (Rogers *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2006). As culturas foram tratadas com 400 µM de INALa e em seguida, irradiadas por 30 minutos com a lâmpada apropriada. Após 72 horas, a sobrevivência das

células (em relação às culturas não tratadas correspondentes) foi medida após contagem de células vivas em câmara de Neubauer. Os resultados mostram que os clones Silvio e Colombiana (TcMSH2A) são também mais resistentes a INALa, assim como a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparadas às cepas JG e Esmeraldo (TcMSH2C). Realizamos ainda o mesmo ensaio com um clone da cepa CL Brener que contém um dos alelos de MSH2 deletado (Campos *et al.*, artigo em preparação) (CL Brener *TcMSH2*<sup>+/-</sup> clone RA2, construído pela aluna de doutorado Priscila Campos). A sobrevivência das células *TcMSH2*<sup>+/-</sup> após o tratamento com 600 µM de INALa (acompanhado por 30 minutos de estimulação por luz) foi comparada a de células selvagens do clone CL Brener. Nossos dados indicam que o clone heminocaute *TcMSH2*<sup>+/-</sup> RA2 é mais sensível aos danos causados por INALa, quando comparado à cepa selvagem (Figura 29).

Juntos, os dados mostram que as cepas analisadas de *T. cruzi* I apresentam maior sobrevivência em estresse oxidativo, quando comparadas às cepas de *T. cruzi* II, sugerem a participação do MMR (ou de TcMSH2) na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi* e estão de acordo com a maior eficiência no MMR supostamente apresentada por linhagens que codificam a isoforma A de TcMSH2.

#### **4.2.3.0 CÁDMIO NÃO MODIFICA A RESPOSTA DOS CLONES AO TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

O envolvimento de MSH2, de maneira independente de MLH1 (ou seja, independente do MMR), no reparo de 8-oxoG presente em sequências transcricionalmente ativas já foi relatado (Pitsikas *et al.*, 2007). Além disso, Machado-Silva e colaboradores (2008) verificaram, através de ensaios de complementação de linhagens de *T. brucei*



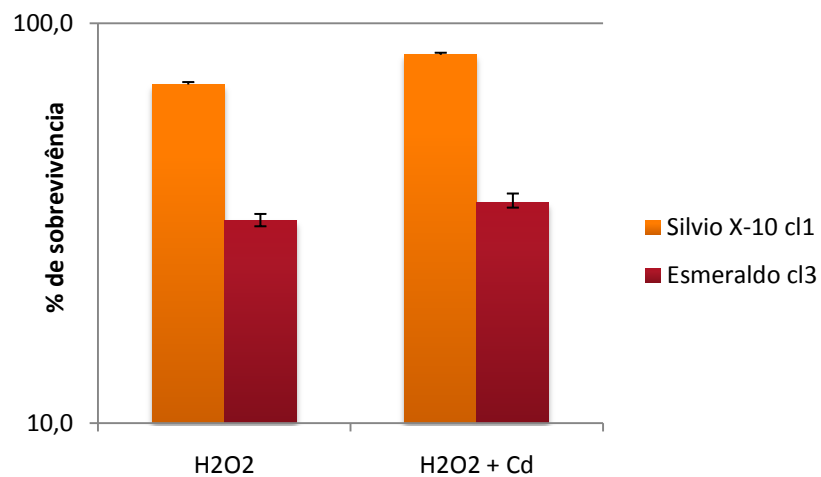
**FIGURA 29 – Sobrevivência de diferentes culturas de *T. cruzi* após tratamento com INALa ativada por luz.** Diferentes culturas de *T. cruzi* [JG (■), Esmeraldo cl3 (■), Colombiana (■), Sílvio X10 cl1 (■), CL Brener selvagem (■) ou CL MSH2+/- clone RA2 (■)] foram submetidas ao tratamento com 400 ou 600 μM de INALa ativada por 30 minutos de exposição à luz apropriada. Após 72 horas de crescimento, os parasitas vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. Os valores mostram a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação aos controles não tratados correspondentes. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.

deficientes em MSH2 (*TbMsh2* -/-), a participação de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo gerado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nestes parasitos.

Para verificar se a contribuição do TcMSH2 no controle de danos oxidativos em *T. cruzi* é realmente independente do MMR, como sugerido por esses dados, avaliamos a sobrevivência de populações clonais das cepas Silvio e Esmeraldo em resposta ao tratamento por 48 horas com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na presença de cádmio. De maneira interessante, a diferença observada entre as cepas quanto à sobrevivência após o estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é mantida na presença de 3 µM de CdCl<sub>2</sub> (Figura 30). Este resultado indica que a inibição do MMR por cádmio não afetou a eficiência da resposta celular de *T. cruzi* ao estresse oxidativo. Para excluir a possibilidade da concentração de CdCl<sub>2</sub> utilizada não ter sido suficiente para inibir a atividade ATPásica de TcMSH2 (ou qualquer outra atividade do MMR alvo do cádmio), realizamos o mesmo ensaio de sobrevivência com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém na presença de 5 µM e 10 µM de CdCl<sub>2</sub>. Nenhuma dessas doses, no entanto, alterou a sobrevivência das culturas de Silvio ou Esmeraldo em resposta ao tratamento com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dados não mostrados).

#### **4.2.4. ANÁLISE DA CAPACIDADE REDUTORA DAS CEPAS JG, SILVIO, COLOMBIANA E ESMERALDO**

A redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> por catalase e glutathiona peroxidase constitui a primeira linha de defesa celular contra essa espécie reativa em eucariotos superiores (revisado por Slupphaug *et al.*, 2003; Alzate *et al.*, 2007). Apesar de essas enzimas não estarem presentes em tripanosomatídeos (El Sayed *et al.*, 2005), estes possuem o sistema alternativo tripanotioana/tripanotiona redutase, essencial à manutenção de um ambiente redutor intracelular, que atua na detoxificação de hidroperóxidos (revisado em Schmidt *et al.*, 2002). Dessa forma, mecanismos de defesas antioxidantes presentes nas cepas de

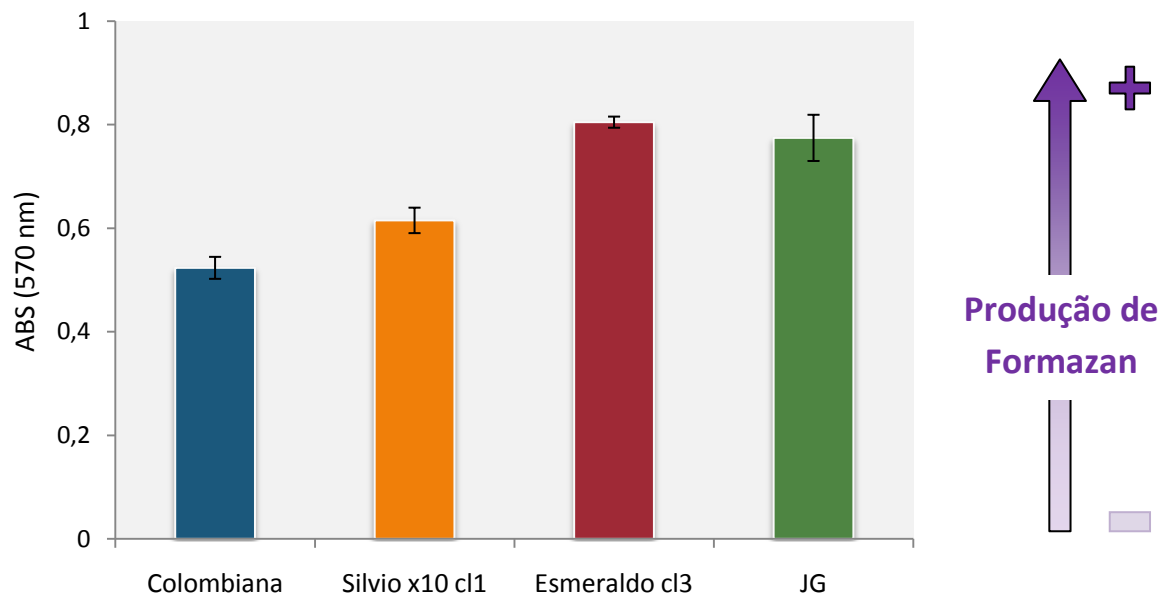


**FIGURA 30 – Efeito do cádmio na resposta de *T. cruzi* ao tratamento com  $H_2O_2$ .** Sobrevivência de culturas de Silvio X10 cl1 e Esmeraldo cl3, em relação às culturas não tratadas correspondentes, após 48h de tratamento com 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  ( $H_2O_2$ ) ou após 48 horas de tratamento com 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  na presença de 3 $\mu M$  de  $CdCl_2$  ( $H_2O_2+Cd$ ). A sobrevivência foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica, na presença de corante vital. Os resultados representam a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão

*T. cruzi* em estudo (como a atividade de enzimas que inativam ROS) poderiam determinar a maior sobrevivência de cepas *T. cruzi* I após estresse oxidativo.

Para investigar se a resposta diferencial ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentada pelas quatro cepas, foi devida a diferenças existentes quanto à capacidade celular de redução de espécies reativas potencialmente nocivas, avaliamos a eficiência das cepas JG, Esmeraldo, Silvio e Colombiana em reduzir o composto MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol brometo]. No ensaio *in vivo* de redução de MTT, este composto é convertido por enzimas da cadeia respiratória no composto insolúvel formazan, um sal de cor violeta cuja formação pode ser medida por espectrometria. Um número fixo de células provenientes de culturas exponenciais de JG, Esmeraldo, Silvio e Colombiana foram incubadas com MTT por 18 horas, em um volume também fixo. Após este período, as células foram lisadas e a produção de formazan por estas foi indiretamente acessada, pela medida da densidade óptica do sobrenadante, a 570 nm (Figura 31). Densidades maiores indicam maior formação do composto violeta, e assim, maior capacidade redutora das células. Nossos resultados indicam que as cepas do grupo *T. cruzi* I (Colombiana e Silvio) apresentam uma capacidade redutora um pouco menor do que as cepas analisadas de *T. cruzi* II (JG e Esmeraldo). Esses dados sugerem, portanto, que a diferença observada entre as linhagens I e II após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não seria devida a maior atividade nas cepas do grupo I das enzimas detoxificantes das células.





**FIGURA 31 – Capacidade de diferentes cepas e clones de *T. cruzi* em reduzir o composto MTT.** Culturas de JG (■), Esmeraldo cl3 (■), Colombiana (■) e Sílvia X10 cl1 (■) foram incubadas por 18 horas com com 0 e 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após este período, as células foram lisadas com isopropanol:HCl e a produção de formazan pelas células foi indiretamente medida pela leitura da densidade óptica do lisado (a 570 nm). Maiores densidades indicam maior redução de MTT a formazan. Os resultados representam a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.

### 4.3. ESTUDOS DA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM *T. CRUZI*

A participação de TcMSH2, supostamente independente do MMR, na resposta ao estresse oxidativo *T. cruzi* nos levou a questionar sobre a maneira como o parasito lida com danos oxidativos no DNA, especialmente com a lesão 8-oxoG (ou GO). O sistema GO, que inclui as glicosilases Fpg e MutY, além de MutT, uma 8-oxo-dGTPase que previne a incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA, é o principal responsável pelo controle do efeito mutagênico de 8-oxoG em *E. coli* (revisado por Nakabeppu *et al.*, 2004).

#### 4.3.1. *T. CRUZI* APRESENTA UM ORTÓLOGO DE OGG1

A DNA glicosilase Fpg realiza a excisão de 8-oxoG do par 8-oxoG:C no DNA, seguida pela clivagem do DNA a 3`do sitio AP (Boiteux *et al.*, 1987). O homólogo funcional de Fpg em eucariotos é a glicosilase Ogg1, também bifuncional (revisado por Boiteux e Radicella, 1999). Através de uma busca no banco de dados do genoma do *T. cruzi* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), foi observado que este organismo apresenta o ortólogo do gene *Ogg1* (Figura 32). No clone CL Brener, duas proteínas Ogg1 distintas são codificadas pelos alelos Tc00.1047053506559.170 e Tc00.1047053510229.20, cujas sequências diferem por uma inserção de 114 nt na extremidade 5` de um dos alelos, resultando em 38 aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal, além de pequenas variações, que geram treze substituições de aminoácidos distribuídas ao longo da proteína (Figura 33).

A caracterização do ortólogo de *Ogg1* em *T. cruzi* foi iniciada com a amplificação dos alelos Tc00.1047053506559.170 (o qual denominamos *TcOgg1A*) e Tc00.1047053510229.20 (o qual denominamos *TcOgg1B*) a partir do DNA genômico de CL Brener. O alelo *TcOgg1A*, que contém a inserção N-terminal, foi amplificado em reações de PCR utilizando os pares de iniciadores *OggA.XbaF* e *Ogg.HindR* ou

```

TcOgg1A      1 MHAWYALPSPAAVNLPMTLCGGQCFRWRRTPRGTWVGVERGAYELSDAHPPEFQAVHP
yeastOgg1    1 -----MSYKFGKLAINKSELCLANVLQAGCSFRW

TcOgg1A     61 RGEKRGMRSSLSHPDDLSDVFWFRCLHREPKNALDLSTEACFLRHYIALDVLCKLW
yeastOgg1   30 IWDEKLNQYSITMKIGQQEKYSVW---ILRQDEENEILEFVAVGDCGNQDAIKTHLMKYF

TcOgg1A    121 RRWTRDNPMDHPLVRYLTSNAGKGPSVNIRHLRQNIHETLLAFLCSNNNVQRITGLVE
yeastOgg1   87 RLDVSLKHLFDNVWIPSDKAFKLSPO-GIRILACEPWETLISFICSSNNNISRITRMCN

TcOgg1A    181 KLATSYGDLCDYNLETGDVRNVGYLNHTSTRPTKNAKRDDTGDGDWIPHTMPSMDEI-
yeastOgg1  146 SLCSNFGNLIITTI-----DGVAYHSEPTSEELT

TcOgg1A    240 ARRSEDELRTLGFGRYSKYIVQASIIQSSGATRRKKEGVNCFCSMSQYKWDLLDP
yeastOgg1  174 SRATEAKLRELGFGRYAKYIIEETARKLVNDKAEANITSD--TTYLQSI CKDAQYEDV---

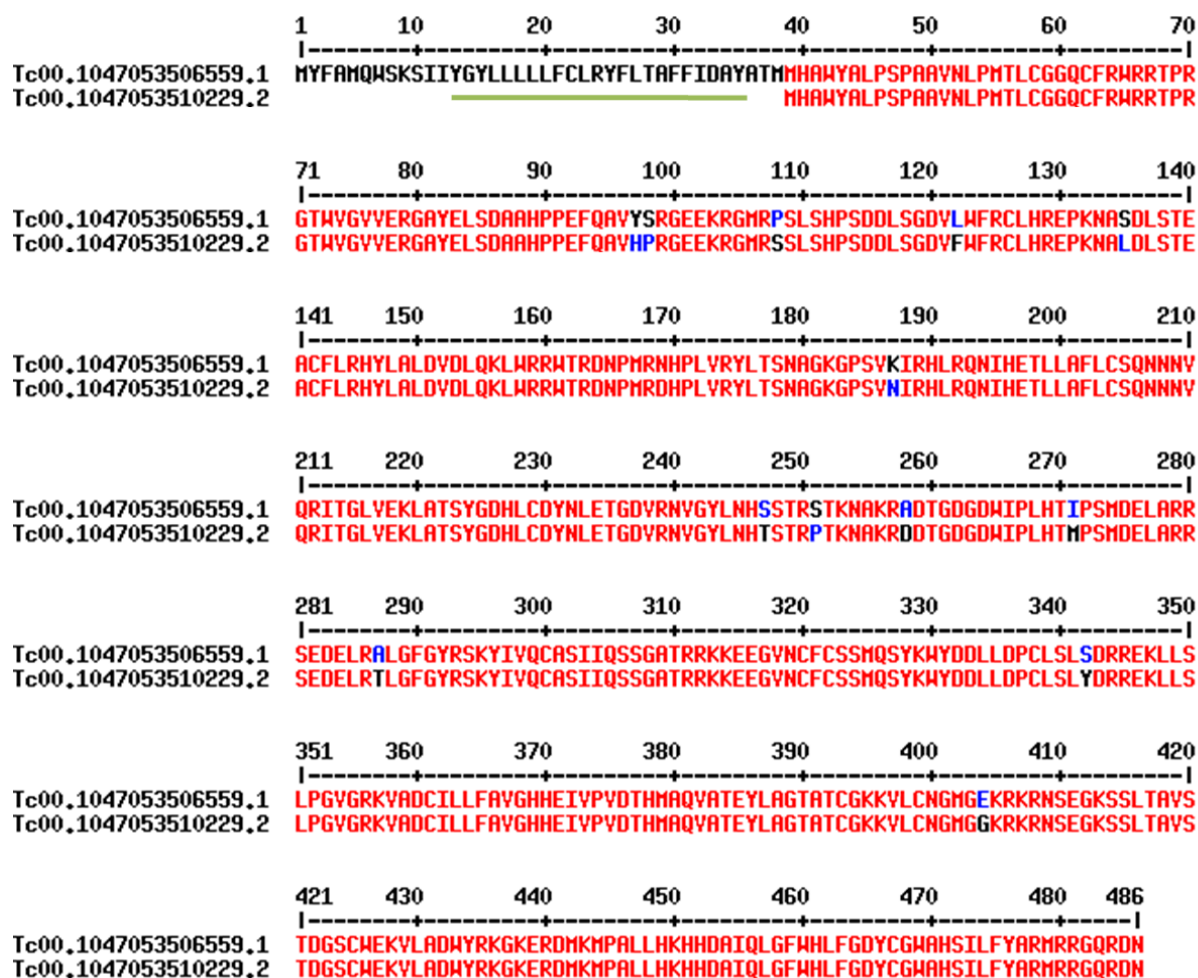
TcOgg1A    300 CLSLYDRREKLLSLPGVGRKVDACILLEAVGHHEIVPVDTHMAQVAT-EYLAGTATCGKK
yeastOgg1  229 -----REHLMSYNGVGPVKVADCVCLMGLHMDGIVPVDVHVSRIAKRDYQISANKNHLK
                                     *                               ***

TcOgg1A    359 VLCNGMGGKRKRNSEGKSSITAVSTDGSCWEKVLADWYRKGKERDMKMPALLHKHDAIQ
yeastOgg1  282 ELRTKYNALPISRKKINLELDHRLMLFKKWGSYAGWAQGVLFSSKEIGGTSGSTTTGTIK

TcOgg1A    419 LGFWHLFGDYCGWAHSIIFYARMRRGQDN-----
yeastOgg1  342 KRKWDMIKETEAIVTKQKLVKVELSDLHIKEAKID

```

**FIGURA 32 – Ortólogo de Ogg1 em *T. cruzi*.** Alinhamento das seqüências previstas de aminoácidos codificados pelo alelo Tc00.1047053506559.170 da cepa CL Brener (TcOgg1A) e pelo gene OGG1 de *S. cerevisiae* (yeastOgg1) (número de acesso no GenBank: U44855). Os resíduos conservados estão realçados em preto; as substituições conservativas estão realçadas em cinza. Os aminoácidos correspondentes ao domínio KPVD, conservado em glicosilases, estão marcados com um asterisco. O alinhamento das seqüências foi feito através do programa Multalin e os resíduos conservados e não conservados foram destacados utilizando o programa BOXSHADE3.21.

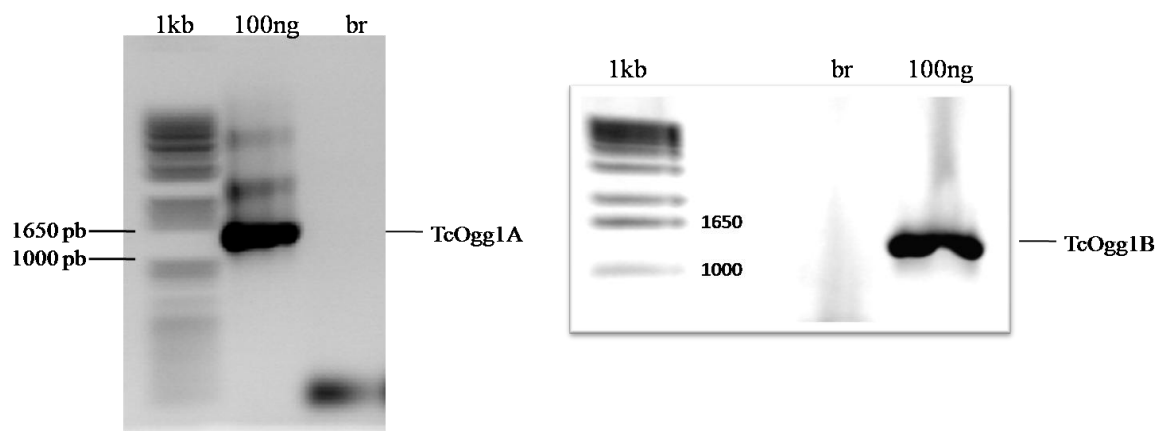


**FIGURA 33 - 8-oxoG DNA glicosilases putativas em *T. cruzi*.** Alinhamento das sequências preditas de aminoácidos codificados pelos alelos Tc00.1047053506559.170 (TcOgg1A) e Tc00.1047053510229.20 (TcOgg1B) de CL Brener, possíveis ortólogos de Ogg1. Resíduos idênticos entre as duas sequências estão em vermelho; inserções ou substituições estão em preto. O alinhamento foi feito através do programa Multalin. A região grifada de verde foi predita como domínio transmembrana.

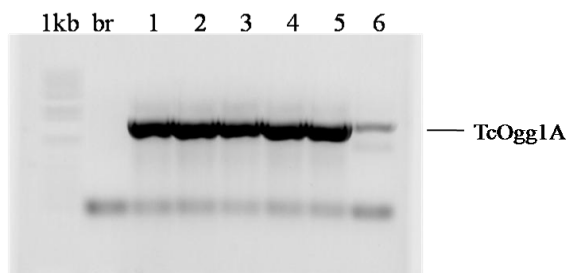
*OggA.XbaF* e *Ogg.XhoR*. Tais iniciadores amplificam exatamente a mesma região, porém apresentam caudas com sequências alvo para diferentes enzimas de restrição permitindo posteriormente a clonagem do fragmento em diferentes vetores (pMAL c2G e pROCK\_HIGRO, respectivamente). Da mesma forma, o alelo *TcOgg1B* foi amplificado com os pares de iniciadores *OggB.Xba-F* e *Ogg.Hind-R* ou *OggB.Xba-F* e *Ogg.Xho-R*. Fragmentos de tamanhos esperados (1450 pb e 1350 pb, aproximadamente), correspondentes aos alelos *TcOgg1A* e *TcOgg1B*, respectivamente, foram amplificados a partir de DNA genômico de CL Brener, conforme exemplificado na figura 34A. O fragmento *TcOgg1A* amplificado foi clonado no vetor pGEM T Easy. Clones positivos resultantes da transformação com o produto da clonagem foram selecionados através de PCR de colônia (Figura 34B) e utilizados para obtenção do DNA plasmidiano. Os plasmídeos foram então digeridos com endonucleases apropriadas (*XbaI/HindIII* ou *XbaI/XhoI*). Os insertos liberados dos vetores pGEM\_*Ogg1A* foram purificados de gel de agarose (Figura 34C) e subclonados nos vetores adequados, gerando as construções pMAL\_*Ogg1A*, de expressão indutível em bactérias e pROCK\_*Ogg1A*, para expressão constitutiva em *T. cruzi*. Por motivos desconhecidos, não foi possível clonar o fragmento *TcOgg1B* no vetor pGEM T Easy.

O sistema pMAL permite a expressão em larga escala, induzida por IPTG, de genes exógenos em bactérias. A proteína de interesse é produzida em fusão com MBP (Maltose Binding Protein), o que permite, posteriormente, sua purificação por cromatografia de afinidade em uma coluna de amilose. O fragmento *TcOgg1A* foi clonado em pMAL para que pudéssemos expressar a proteína *TcOgg1* em um sistema bacteriano, verificar sua habilidade em suprimir o fenótipo mutador espontâneo de bactérias deficientes em *fpg* (BH20) e confirmar, através de ensaios *in vitro* com a proteína recombinante, sua atividade glicosilásica/AP liásica

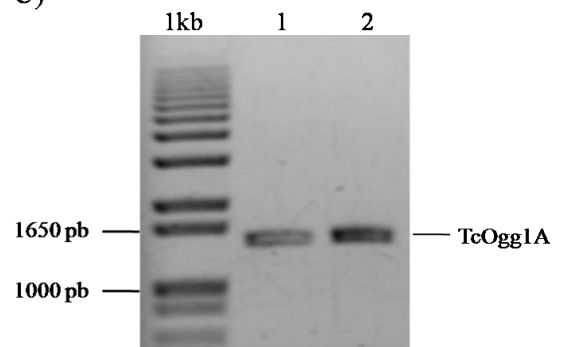
A)



B)



C)

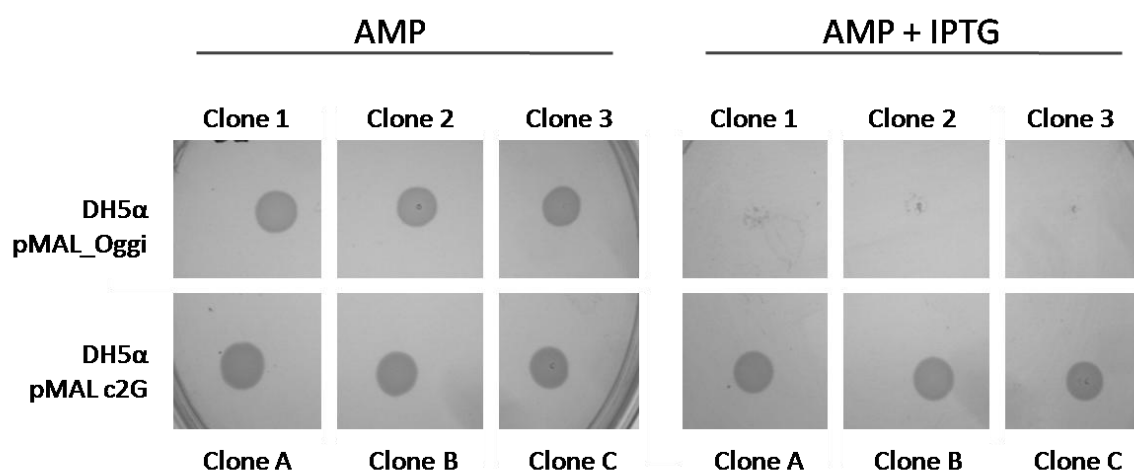


**FIGURA 34 - Amplificação e clonagem de TcOgg1A.** Imagem de géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando (A) fragmento de TcOgg1A ou TcOgg1B amplificado por PCR a partir de 100 ng de DNA genômico de CL Brener; (B) TcOgg1A amplificado por PCR de colônia a partir de seis clones de DH5 $\alpha$  resultantes da transformação com pGEM\_Ogg1A; e (C) fragmentos correspondentes a TcOgg1A liberados pela digestão de pGEM\_Ogg1A com *Xba*I e *Hind*III (linha 1) ou *Xba*I e *Xho*I (linha 2) e purificados a partir de gel de agarose. (1kb): Padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). (br): Controles negativos das reações de PCR feitos na ausência de DNA molde.

#### **4.3.2.A EXPRESSÃO DE TcOgg1A É TÓXICA EM BACTÉRIAS**

Bactérias DH5 $\alpha$  foram transformadas com o vetor pMAL\_Ogg1A, e clones positivos foram selecionados através de PCR de colônia. Várias tentativas de indução de expressão de TcOgg1A foram realizadas, através da adição de IPTG às culturas, com diferentes clones carregando o vetor recombinante. De modo surpreendente, a expressão desse gene mostrou-se extremamente tóxica em qualquer um dos clones. Imediatamente após a adição de IPTG ao meio de cultura, o crescimento das células era interrompido (em algumas tentativas, a DO<sub>600</sub> diminuiu após a indução da expressão) (dado não mostrado). Como retratado na figura 35, o crescimento de colônias de bactérias carregando o vetor pMAL\_Ogg1A foi completamente interrompido pela indução da expressão de TcOgg1A em placas de meio sólido contendo IPTG.

Alguns procedimentos foram realizados na tentativa de minimizar a citotoxicidade da proteína exógena, como redução da concentração de IPTG e diminuição da temperatura de crescimento das células, antes e após a indução, no entanto, não obtivemos sucesso. Além disso, tentamos detectar algum “vazamento” de expressão da proteína na ausência de IPTG: o extrato protéico total de alguns clones recombinantes foi analisado em gel de poliacrilamida e comparado aos extratos de células carregando o vetor pMAL c2G vazio ou células desprovidas de qualquer vetor. Uma banda correspondente a MBP foi visualizada no extrato de células com o vetor vazio; no entanto, nenhuma banda adicional foi detectada no extrato de clones carregando o vetor pMAL\_Ogg1A (dado não mostrado).

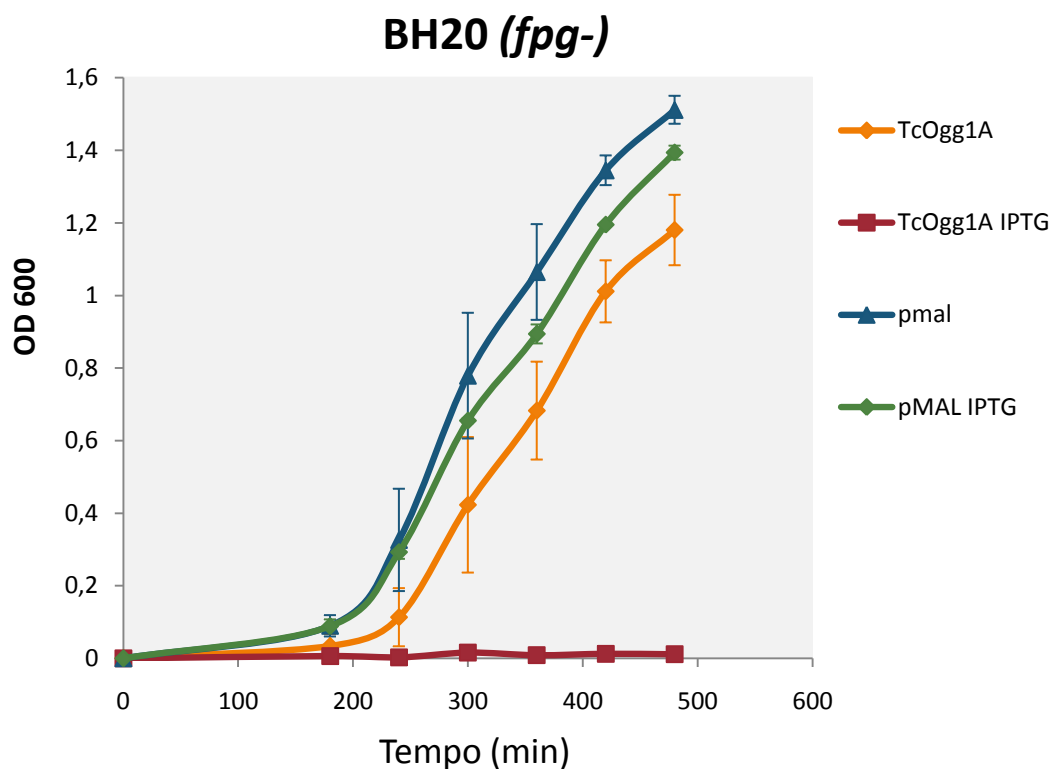


**FIGURA 35 - Toxicidade de TcOgg1A em células DH5α.** Fotografias de placas de meio 2xYT-ágar contendo apenas ampicilina (AMP) ou ampicilina e 0,1 mM de IPTG (AMP + IPTG), onde foram gotejadas alíquotas diluídas de culturas de três diferentes clones de bactérias DH5α carregando o vetor pMAL\_Ogg1A (clones 1, 2 e 3) e três diferentes clones de bactérias DH5α carregando o vetor pMAL c2G vazio (clones A, B e C).

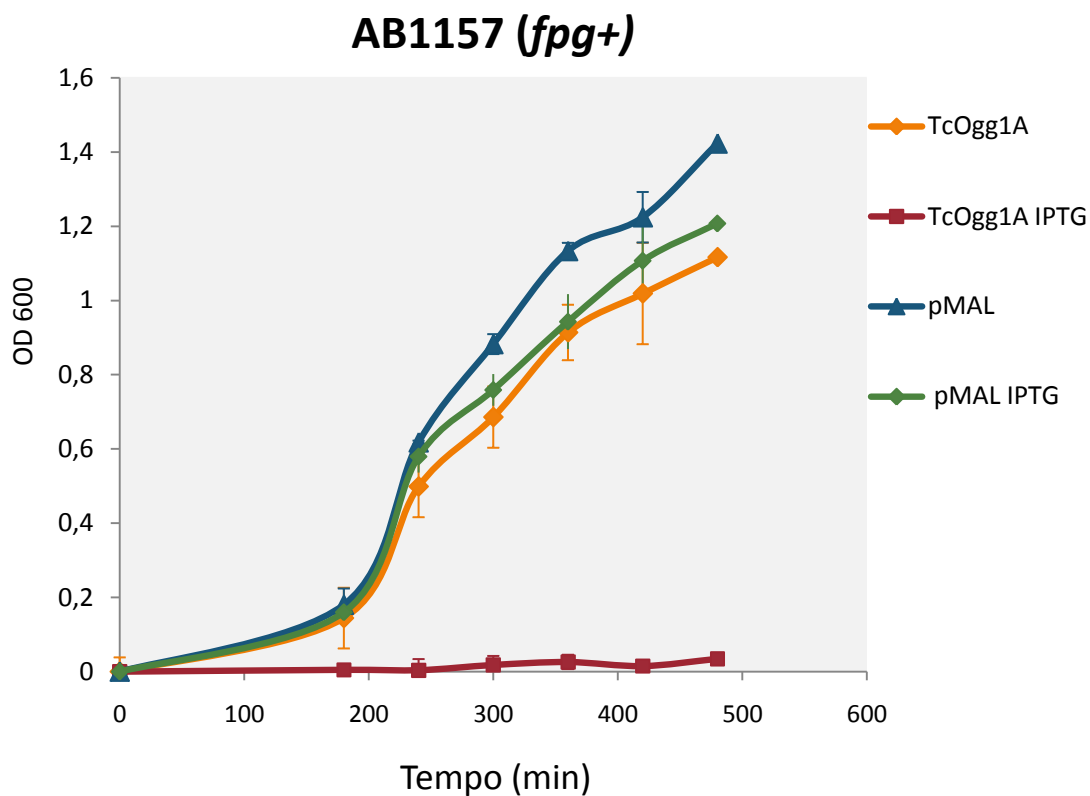


#### **4.3.3.A EXPRESSÃO DE TcOGG1A TAMBÉM É TÓXICA EM BACTÉRIAS DEFICIENTES EM FPG**

Diferentemente da nossa abordagem, diversos trabalhos que descrevem a superexpressão em bactérias de ortólogos de Ogg1 utilizam células deficientes em glicosilases endógenas, como Fpg e MutY (van der Kempt *et al.*, 1996; Radicella *et al.*, 1997; García-Ortiz *et al.*, 2001). Para verificar se o efeito citotóxico da superexpressão de *TcOgg1A* em bactérias foi acentuado pela presença de atividades glicosilásicas endógenas na célula, realizamos a transformação de bactérias mutantes deficientes em Fpg (linhagem BH20) com o vetor pMAL\_Ogg1A e analisamos a toxicidade da expressão do alelo TcOgg1 nessas células. Foi feito um acompanhamento do crescimento de células BH20 carregando o vetor pMAL\_Ogg1A em meio líquido, na presença ou ausência de IPTG. O crescimento foi comparado ao de bactérias BH20 carregando o vetor pMAL c2G vazio, sob as mesmas condições. O crescimento das bactérias foi analisado por 8 horas através de leituras da densidade óptica do meio, feitas a cada hora. Como controle, o mesmo procedimento foi feito com culturas de bactérias selvagens AB1157 (que apresentam o gene Fpg) carregando os vetores pMAL\_Ogg1A ou pMAL c2G. Conforme indicado por curvas de crescimento nas figuras 36 e 37, células AB1157 (*fpg+*) ou BH20 (*fpg-*) apresentam o crescimento completamente inibido pela expressão de TcOgg1A, induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura. Este resultado indica que a superexpressão de TcOgg1A é extremamente tóxica em bactérias, independentemente do nível de atividade 8-oxoG-DNA-glicosilásica endógena da célula.



**FIGURA 36 - Toxicidade de TcOgg1A em bactérias BH20 (*fpg*-).** Células *fpg*-carregando diferentes vetores foram crescidas, sob agitação (180 rpm), por 8 horas a 37 °C em meio 2xYT/ampicilina, na presença ou ausência de 0,1 mM de IPTG. O crescimento foi acompanhado por leituras da densidade óptica das culturas (OD<sub>600</sub>), feitas em espectrofotômetro após diferentes intervalos de tempo. (◆) vetor pMAL\_TcOgg1A, expressão não induzida; (■) vetor pMAL\_TcOgg1A, expressão induzida por IPTG; (▲) vetor pMAL c2G vazio, expressão não induzida; (◆) vetor pMAL c2G vazio, expressão induzida por IPTG.



**FIGURA 37 - Toxicidade de TcOgg1A em bactérias AB1157 (*fpg+*).** Células *fpg+* carregando diferentes vetores foram crescidas, sob agitação (180 rpm), por 8 horas a 37 °C em meio 2xYT/ampicilina, na presença ou ausência de 0,1 mM de IPTG. O crescimento foi acompanhado por leituras da densidade óptica das culturas (OD<sub>600</sub>), feitas em espectrofotômetro após diferentes intervalos de tempo. (◆) vetor pMAL\_TcOgg1A, expressão não induzida; (■) vetor pMAL\_TcOgg1A, expressão induzida por IPTG; (▲) vetor pMAL c2G vazio, expressão não induzida; (◆) vetor pMAL c2G vazio, expressão induzida por IPTG.

#### **4.3.4. A SUPOSTA SUPEREXPRESSION DE TcOGG1A SENSIBILIZA O CLONE CL BRENER AO TRATAMENTO COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Uma vez que não foi possível confirmar a atividade glicosilásica de *TcOgg1A* em bactérias, devido a citotoxicidade resultante da expressão do alelo TcOgg1A nessas células, decidimos investigar os efeitos da superexpressão desse alelo em *T. cruzi*.

Dessa forma, realizamos a transfecção do clone CL Brener com o vetor pROCK\_Ogg1AHIGRO. O vetor pROCK (DaRocha *et al.*, 2004, anexo 2) promove em *T. cruzi* a expressão estável de um gene, integrando-se por recombinação homóloga no *cluster* de  $\alpha/\beta$ -tubulina presente no genoma do parasito. O processamento correto do transcrito é garantido pela presença de sequências regulatórias no vetor. A superexpressão em *T. cruzi* de diversos genes relacionados ao metabolismo de DNA (TcRAD51, TcPol $\beta$ , TcPol $\kappa$ , TcPol $\eta$  e TcRev1-like) já foi obtida em nosso laboratório, utilizando o vetor pROCK (Régis-da-Silva *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2008; Rajão *et al.*, 2009; de Moura *et al.*, 2009; João P. V. da Rocha, 2008 – Dissertação de Mestrado).

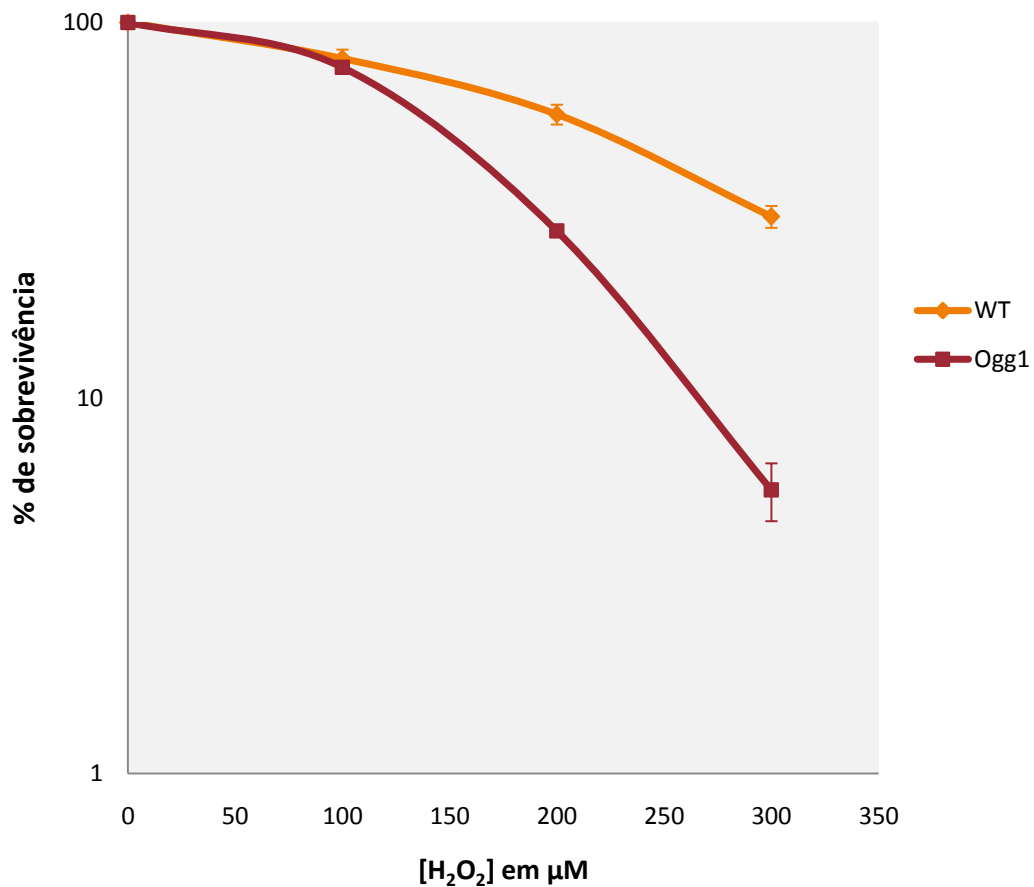
Transfectantes estáveis de pROCK\_Ogg1A foram selecionados em meio líquido acrescido de higromicina. Sob condições normais de cultivo (na ausência de tratamento genotóxico), as células transfectadas apresentam crescimento semelhante ao da população selvagem e não apresentam nenhuma alteração visível em sua morfologia (dados não mostrados).

Apesar de ainda não termos confirmado a superexpressão de TcOgg1A na cultura transfectada com pROCK\_Ogg1A, verificamos a sensibilidade desta ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que o aumento de sensibilidade a agentes genotóxicos é comum em células que superexpressam glicosilases (Kaasen *et al.*, 1986; Coquerelle *et al.*, 1995; Hollenbach *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Éot-Houllier *et al.*, 2007).

Uma cultura do clone CL Brener transfectada com o vetor pROCK\_HIGRO, e a cultura transfectada com pROCK\_Ogg1A foram tratadas com 0, 100, 200 e 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 72 horas, a densidade celular das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer. A sobrevivência em resposta ao tratamento foi estimada por comparação da densidade celular entre as culturas tratadas e não tratadas correspondentes. Como indicado pela curva de sobrevivência na figura 38, as células transfectadas, possivelmente superexpressoras de TcOgg1A, apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo gerado pelo tratamento com água oxigenada quando comparadas à população selvagem. Este resultado está de acordo com dados da literatura acerca da citotoxicidade causada pela superexpressão de Ogg1 em condições de estresse oxidativo (Hollenbach *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Éot-Houllier *et al.*, 2007) e é um indício de que a superexpressão de uma glicosilase que remove danos oxidativos está ocorrendo no clone CL Brener transfectado com pROCK\_Ogg1A.

#### **4.3.5.A EXISTÊNCIA DE UM ORTÓLOGO DE MUTY EM *T. CRUZI* PRESSUPÕE A PRESENÇA DE UM ORTÓGOLO DE MUTT NO PARASITO**

Continuamos a caracterização do sistema GO em *T. cruzi* com os ortólogos de MutY e MutT nesse parasita. A glicosilase MutY remove adeninas pareadas a 8-oxoG, introduzidas quando 8-oxoguaninas permanecem no DNA molde durante a replicação. MutT e seus homólogos (MTH1) hidrolisam 8-oxo-dGTPs a 8-oxo-dGMPs, prevenindo que sejam incorporados durante a replicação (Nakabeppu, 2001). O sequenciamento do genoma completo de CL Brener indicou a ausência de ORFs com homologia predita à MutT, embora ortólogos de MutY tenham sido identificados (Sayed *et al.*, 2005).



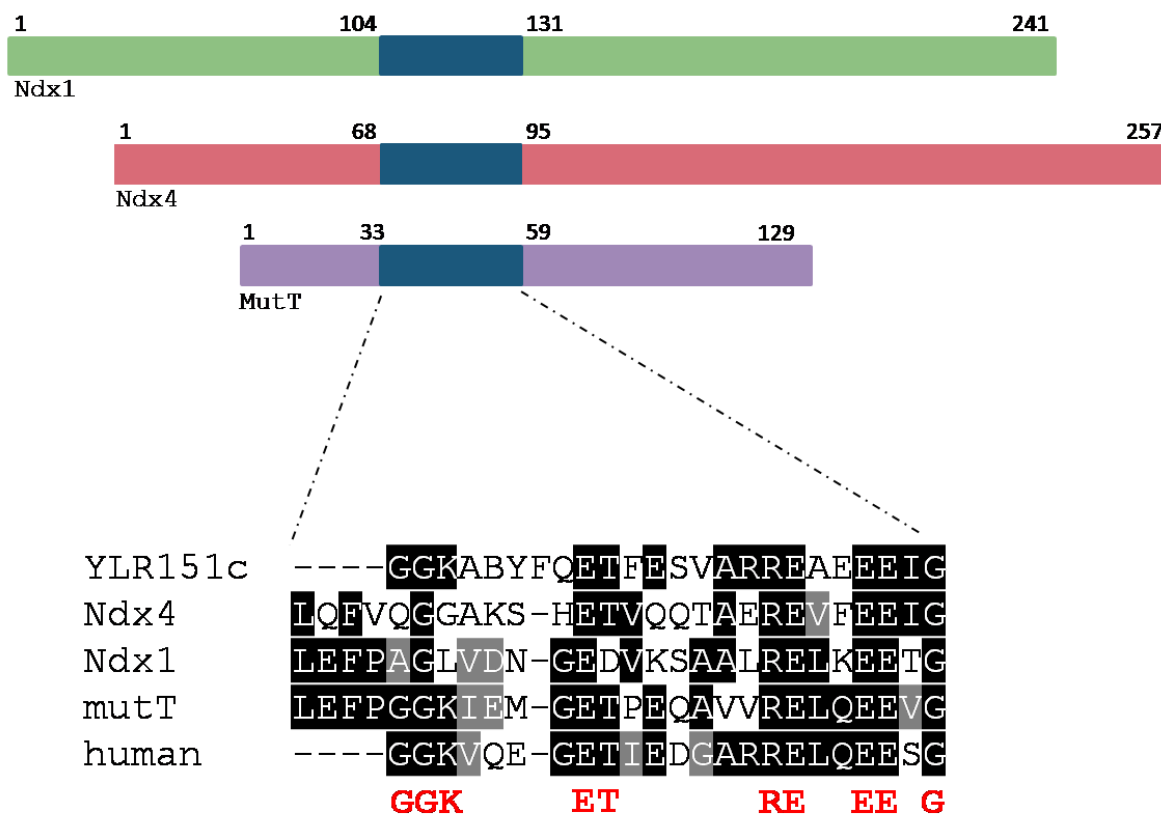
**FIGURA 38 – Curva de sobrevivência do clone CL Brener transfectado com pROCK\_Ogg1A em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio.** Culturas de CL Brener selvagem (◆) ou transfectadas com pROCK\_Ogg1A (■) foram submetidas ao tratamento com 0, 100, 200 e 300 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 72h, os parasitas vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.

Iniciamos a busca por homólogos funcionais de MutT em *T. cruzi* através de análises no banco de dados do genoma do parasito ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) identificando ORFs contendo o domínio Nudix, uma curta sequência de aminoácidos conservada entre as enzimas MutT de *E. coli* e *Pseudomonas vulgaris*, e MTH1 humana, de camundongo e de rato (Bessman *et al.*, 1996). Foram encontradas várias ORFs de hidrolases contendo domínios Nudix, e destas, selecionamos para estudos iniciais *in vivo* as duas ORFs cujos domínios Nudix apresentavam maior homologia ao de *mutT*: Tc00.1047053511233.100 e Tc00.1047053511499.30, as quais denominamos Ndx1 e Ndx4, respectivamente (Figura 39).

#### 4.3.6. NDX1 E NDX4 NÃO COMPLEMENTAM BACTÉRIAS DEFICIENTES EM MUTT

Para verificar a existência de homologia funcional entre os produtos das ORFs Ndx1 e Ndx4 e a proteína MutT, analisamos, por meio de ensaios de mutação em rifampicina, a habilidade dessas ORFs em suprimir o acentuado fenótipo mutador de uma linhagem de bactérias deficiente em MutT (linhagem BH600). Por isso, os fragmentos de Ndx1 e Ndx4 foram clonados no vetor bacteriano pMAL c2G, de expressão indutível por IPTG. Como controle, o gene *mutT* também foi clonado em pMAL.

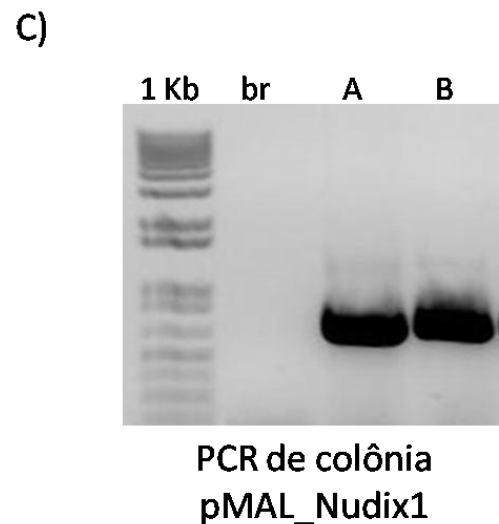
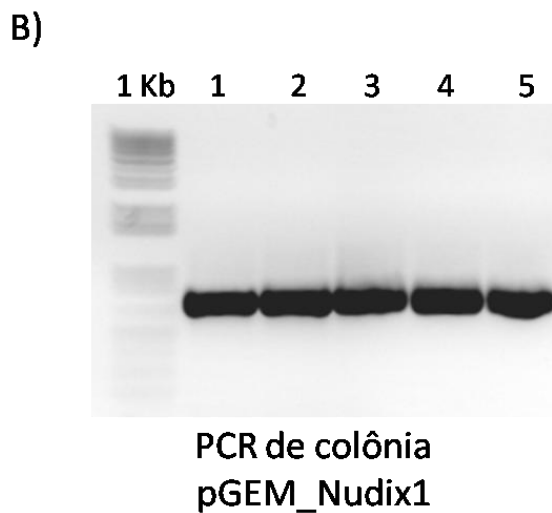
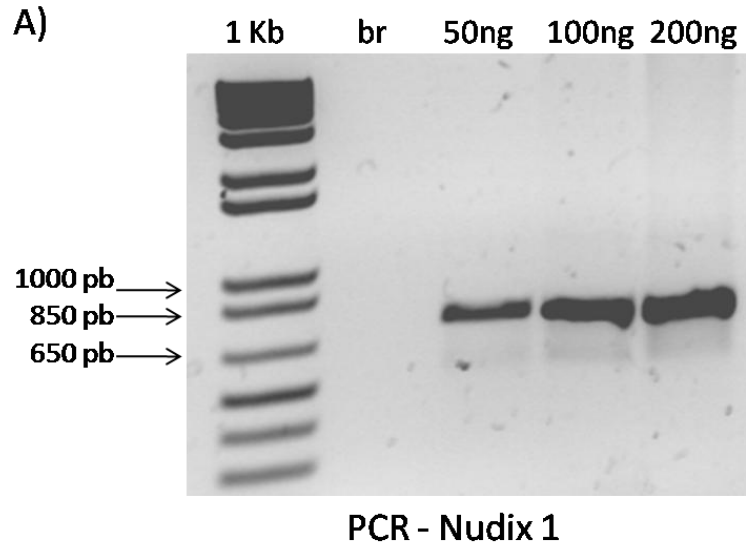
Inicialmente, os fragmentos Ndx1 e Ndx4, ambos com aproximadamente 700 pares de bases, foram amplificados a partir de DNA genômico do clone CL Brener com os pares de iniciadores apropriados (par *Ndx1BamF* e *Ndx1HindR* ou par *Ndx4BamF* e *Ndx4HindR*, respectivamente) (figuras 40A e 41A) e isoladamente clonados no vetor pGEM T Easy



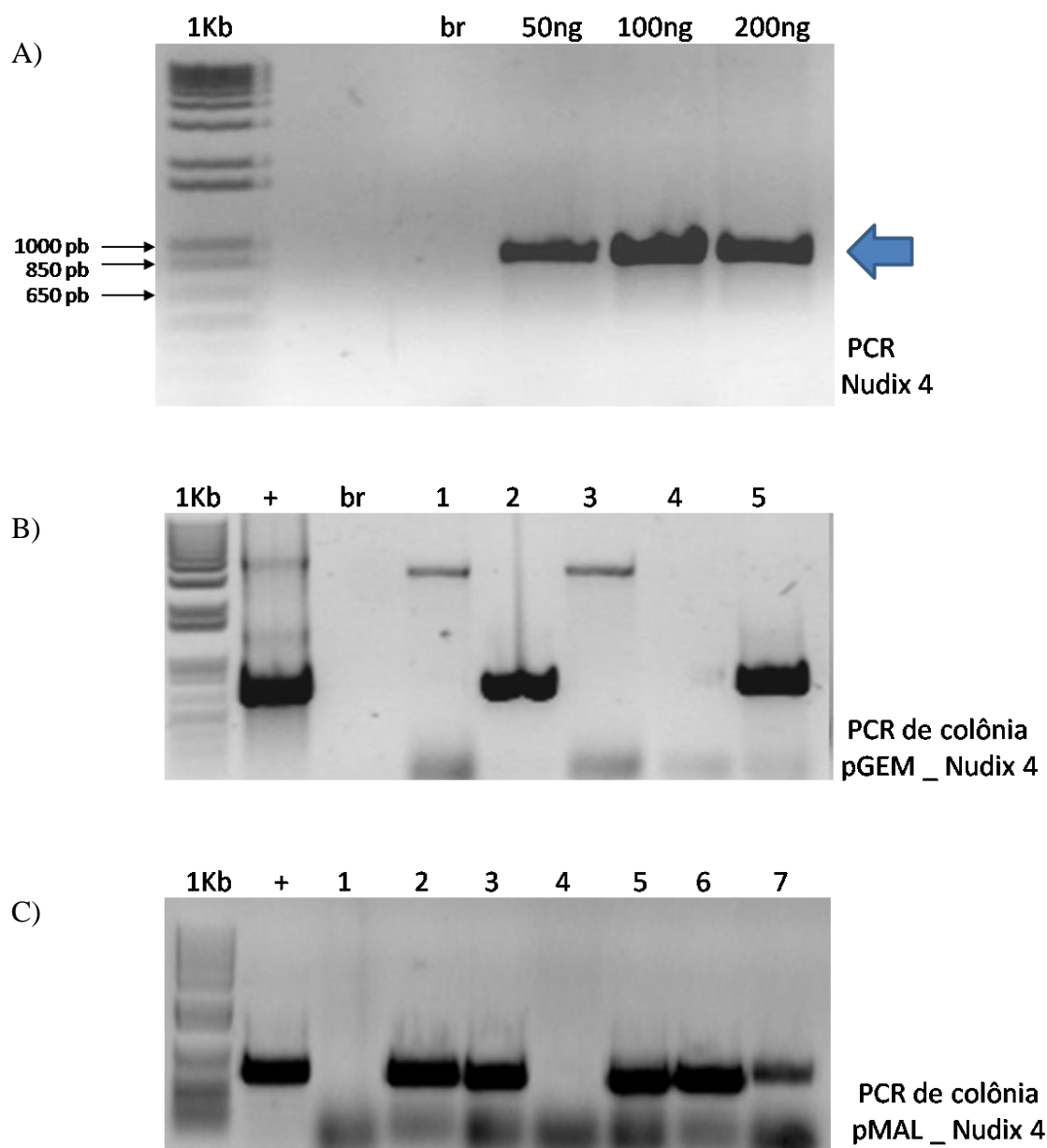
**FIGURA 39- Alinhamento das regiões conservadas entre Nudix1, Nudix 4 e MutT.**

Desenho esquemático mostrando a posição da região conservada (representada em azul) entre a proteína MutT de *E. coli* (em roxo) e os polipeptídeos codificados pelos alelos Tc00.1047053511233.100 (Nudix 1, em verde) e Tc00.1047053511499.30 (Nudix 4, em rosa) de CL Brener. Na porção inferior da figura, estão representadas as sequências das regiões conservadas entre YLR151c, de *S. cerevisiae*, Ndx1 e Ndx4, de *T. cruzi*, mutT, de *E. coli* e MTH (human), de *Homo sapiens*. Os resíduos conservados estão realçados em preto; as substituições conservativas estão realçadas em cinza. Os aminoácidos correspondentes ao domínio Nudix estão grafados em vermelho. O alinhamento foi feito pelo programa Multalin e os resíduos conservados e não conservados foram destacados utilizando o programa BOXSHADE3.21.





**FIGURA 40 - Amplificação e clonagem de Ndx1.** Imagem negativa de géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando (A) Ndx1 amplificada por PCR a partir de 50, 100 e 200 ng de DNA genômico de CL Brener; (B) Ndx1 amplificada por PCR de colônia a partir de cinco clones de DH5 $\alpha$  resultantes da transformação com pGEM\_Ndx1 e (C) a partir de dois clones resultantes da transformação com pMAL\_Ndx1. (1kb): Padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). (br): Controles negativos das reações de PCR feitos na ausência de DNA genômico ou bactérias.



**FIGURA 41 - Amplificação e clonagem de Ndx4.** Imagem negativa de géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando (A) Ndx4 amplificada por PCR a partir de 50, 100 e 200 ng de DNA genômico de CL Brener; (B) Ndx4 amplificada por PCR de colônia a partir de cinco clones de DH5 $\alpha$  resultantes da transformação com pGEM\_ Ndx4 e (C) a partir de sete clones resultantes da transformação com pMAL\_ Ndx4. (1kb): Padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). (br): Controles negativos das reações de PCR feitos na ausência de DNA genômico ou bactérias. (+): Controles positivos feitos na presença de DNA plasmidiano (pGEM\_Ndx4).

O produto das clonagens foi utilizado na transformação de bactérias e clones positivos foram selecionados através de PCR de colônia (Figuras 40B e 41B). Os vetores pGEM\_Ndx1 e pGEM\_Ndx4, obtidos a partir de clones positivos, foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *HindIII* para a liberação dos fragmentos Ndx1 e Ndx4. Então, estes foram subclonados no vetor pMAL c2G, digerido com as mesmas enzimas, gerando as construções pMAL\_Ndx1 e pMAL\_Ndx4 (Figuras 40C e 41C). Da mesma forma, o gene *mutT* (de aproximadamente 400 pares de bases) foi amplificado com o par de iniciadores *muttXbaF* e *muttPstR*, a partir de bactérias da linhagem AB1157, clonado em pGEM-T Easy e subclonado nos sítios de *XbaI* e *EcoRI* do vetor pMAL c2G, gerando a construção pMAL-*mutT* (dado não mostrado). As construções pMAL\_Ndx1, pMAL\_Ndx4 e pMAL-*mutT*, além do vetor pMAL c2G vazio, foram então utilizadas na transformação de bactérias da linhagem mutante BH600, que possui o gene *mutT* deletado (a linhagem mutante BH600 é derivada da linhagem selvagem AB1157).

Ensaio de mutação em rifampicina foram realizados com culturas das linhagens BH600 e AB1157 carregando diferentes construções plasmídicas (Tabela 3). Conforme descrito em Material e Métodos (item 3.21.4), a média de frequência de mutantes *rpoB* ( $M_{RIF}$ ) nessas culturas foi obtida após plaqueamento das células em meio sólido seletivo (contendo rifampicina) e não seletivo, e determinação (i) do número de colônias resistentes ao antibiótico, formadas nas placas com rifampicina durante crescimento *overnight*, (ii) do número total de colônias crescidas na ausência do antibiótico e (iii) da razão entre estes, levando em consideração o volume das alíquotas e as diluições realizadas.

Através dos ensaios de mutação observamos que, conforme esperado, a média da frequência de mutantes Rif<sup>R</sup> ( $M_{RIF}$ ) em culturas de células BH600 (*mutT*<sup>-</sup>) carregando o

**TABELA 3** - Média da frequência de mutantes Rif<sup>R</sup> em populações de bactérias BH600 e AB1157 carregando diferentes construções plasmídicas

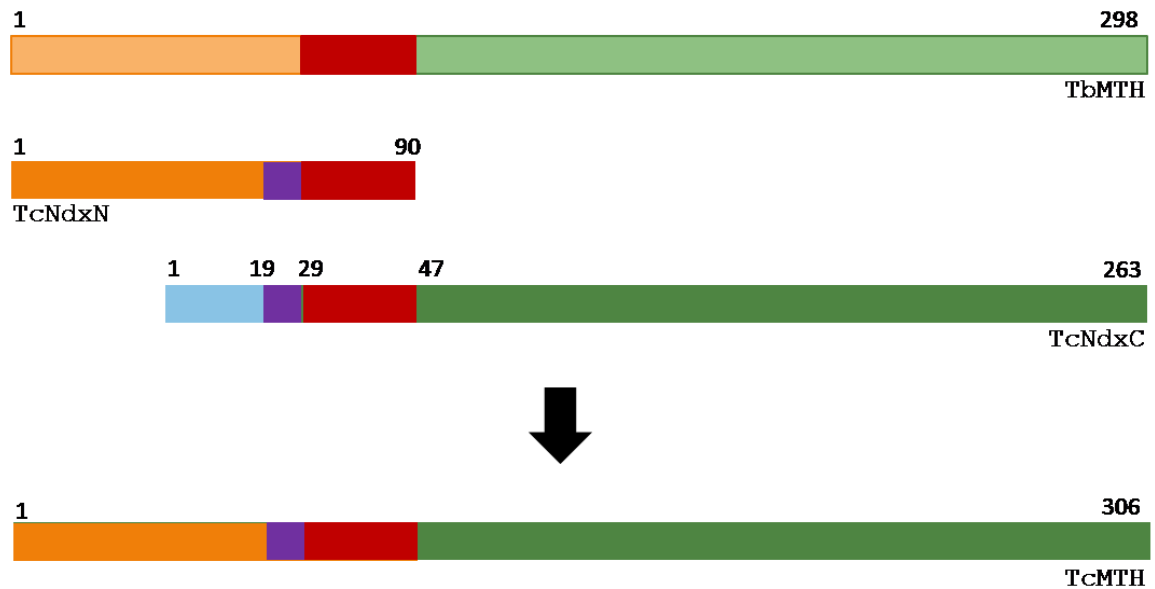
Célula	Vetor	M <sub>RIF</sub> <sup>(1)</sup> ± dp <sup>(2)</sup>
AB1157	pMAL_c2G	0,3 ± 0,5
BH600	pMAL_c2G	428 ± 213
	pMAL_Ndx1	1213 ± 64
	pMAL_Ndx4	1268 ± 152
	pMAL_mutT	0,1 ± 0,04

(1) Média da frequência de mutantes *rpoB* nas culturas e (2) desvio padrão.

vetor pMAL c2G vazio é cerca de 1500 vezes maior que a média da frequência de mutantes Rif<sup>R</sup> em populações de células selvagens (AB1157) carregando o mesmo vetor (Tabela 3). Além disso, verificamos que a média da frequência de mutantes Rif<sup>R</sup> em linhagens BH600 não é diminuída pela expressão heteróloga de Ndx1 ou Ndx4 nessas células, induzida por IPTG, sendo drasticamente reduzida pela expressão de *mutT* (Tabela 3). Esses dados indicam que os produtos dos alelos Ndx1 e Ndx4 não são homólogos funcionais à proteína MutT de *E. coli*, apesar de apresentarem domínios Nudix com homologia significativa ao desta hidrolase.

#### **4.3.7. UM POSSÍVEL ORTÓLOGO DE MTH FOI AMPLIFICADO A PARTIR DO DNA GENÔMICO DO CLONE CL BRENER**

Recentemente, analisando o banco de dados de *T. cruzi* encontramos um alelo de CL Brener que apresenta homologia de sequência a MTH de *T. brucei*. Atualmente anotadas como “possível Nudix hidrolase, incompleta” (Tc00.1047053510287.4) e “possível Nudix hidrolase, pseudogene” (Tc00.1047053506581.69), essas sequências codificam polipeptídeos que apresentam, respectivamente, alta homologia com a região N-terminal (49% de identidade, 62% de similaridade) e alta homologia com as porções média e C terminal (53% de identidade, 64% de similaridade) do produto do alelo Tb10.70.2530, caracterizado como homólogo de *mutT* em *T. brucei* (Figura 42). O alinhamento dessas sequências sugere a existência de um alelo em CL Brener, homólogo a MTH de *T. brucei*, contendo uma pequena inserção em relação a este, formado pela justaposição dos fragmentos Tc00.1047053510287.4 e Tc00.1047053506581.69 (Figura 42). Foram então construídos iniciadores para a amplificação desse provável alelo (*mthEcoF* e *mthHindR*). Na reação de PCR utilizando tais iniciadores, um fragmento de aproximadamente 900 pb foi amplificado a partir de DNA genômico de CL Brener



**FIGURA 42 - Possível ortólogo de MTH em *T. cruzi*.** Desenho esquemático mostrando o alinhamento entre a proteína MTH de *T. brucei* (**TbMTH**) e os polipeptídeos codificados pelos alelos Tc00.1047053510287.4 (**TcNdxN**) e Tc00.1047053506581.69 (**TcNdxC**) de *T. cruzi* (CL Brener). O alinhamento sugere a existência de uma proteína em *T. cruzi* (**TcMTH**), homóloga à MTH de *T. brucei*, formada pela sobreposição dos dois polipeptídeos, excluído a porção N terminal (em azul) de TcNdxC. Cores idênticas representam sequências idênticas. O mesmo tom de cor indica que as regiões são homólogas.

(Figura 43), o que reforça a hipótese da existência do alelo em *T. cruzi* homólogo a MTH de *T. brucei*, como sugerido por nós.

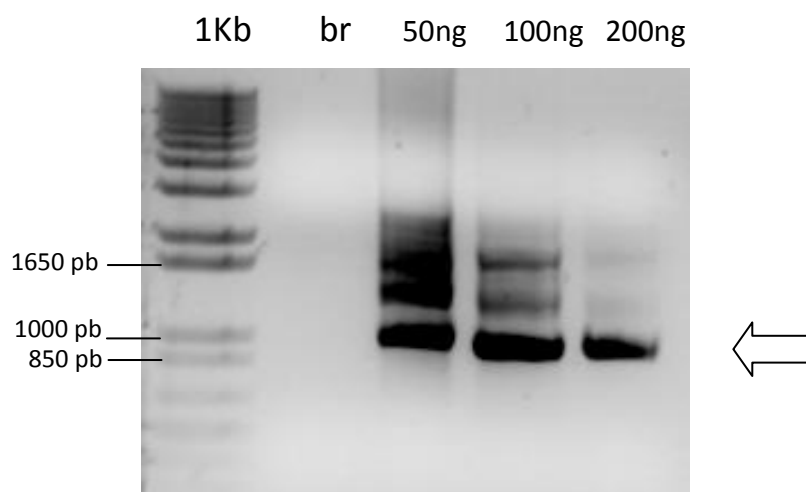
#### **4.3.8.A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MUTT EM *T. CRUZI* AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Para verificar os efeitos da expressão do gene *mutT* de *E. coli* em *T. cruzi*, este gene foi clonado no vetor pROCK\_HIGRO e utilizado na transfecção de uma população selvagem do clone CL Brener.

Inicialmente, o gene *mutT* foi amplificado a partir de bactérias AB1157 (GeneID: 5590913) com os iniciadores *muttXbaF* e *muttXhoR* e clonado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, gerando o vetor pGEM\_ *mutT*. O fragmento clonado foi liberado pela digestão do vetor com as endonucleases *XbaI* e *XhoI* e então subclonado no vetor pROCK\_HIGRO digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pROCK\_ *mutT*.

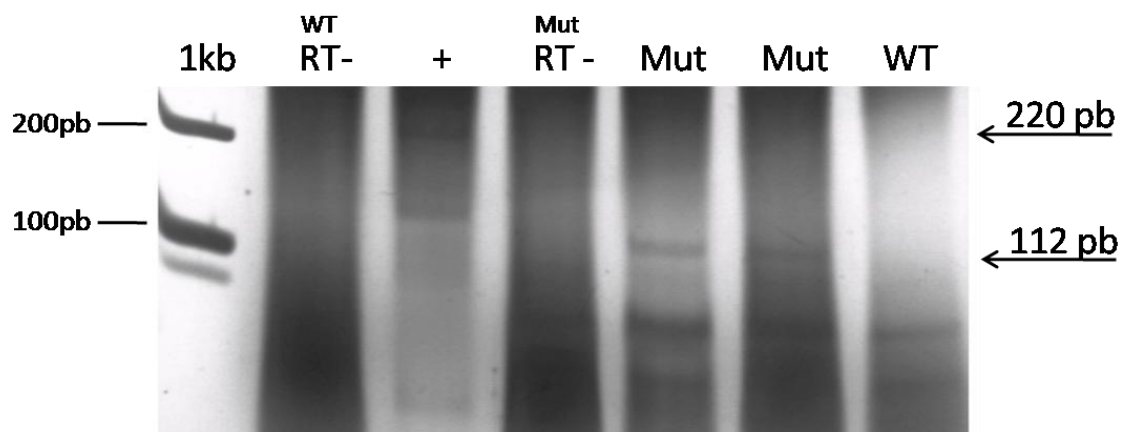
A expressão de *mutT* no clone CL Brener transfectado com pROCK\_ *mutT* foi verificada por RT-PCR (Figura 44). Para tanto, o RNA total de 10<sup>7</sup> células de uma cultura selvagem do clone CL Brener ou de 10<sup>7</sup> células da cultura transfectada com pROCK\_ *mutT* foi extraído e utilizado em reações de síntese de cDNA por uma transcriptase reversa. Em seguida, o cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR com iniciadores específicos para uma região interna do gene *mutT*. Conforme esperado, esta região não foi amplificada a partir do cDNA da cultura de CL Brener selvagem, mas foi amplificada a partir do cDNA da cultura transfectada, indicando a expressão do gene bacteriano.

As células transfectadas foram então submetidas a estresse oxidativo através do tratamento com 0, 150, 200 e 250 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conforme indicado pela figura 45, a expressão de MutT exógena conferiu à população transfectada uma excepcional resistência

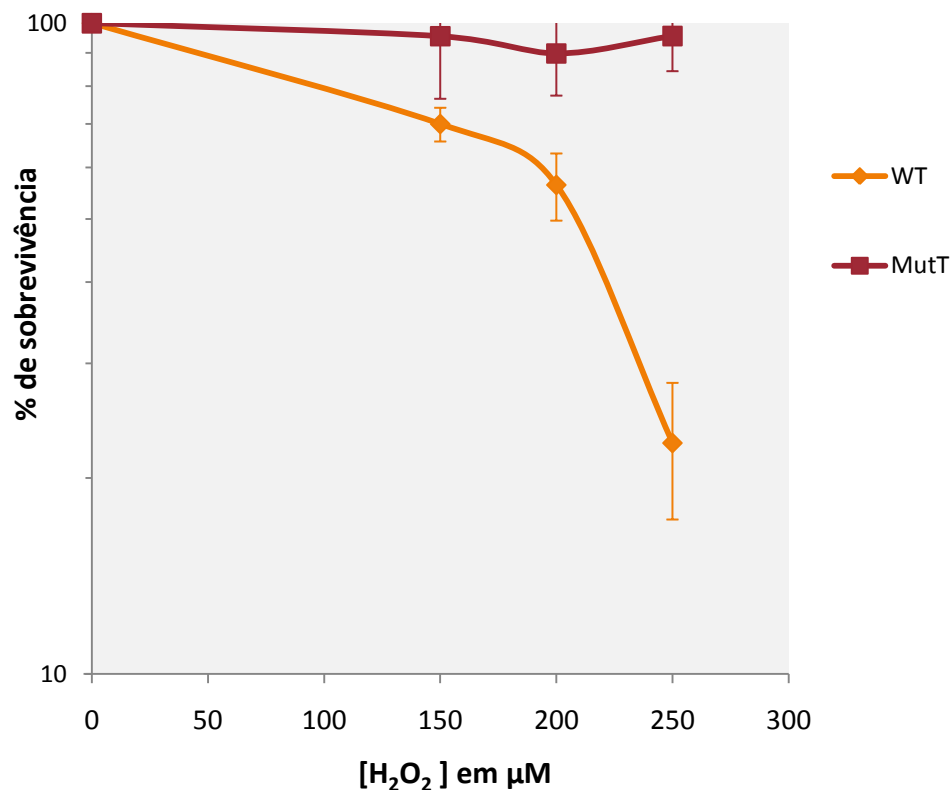


**FIGURA 43 – Amplificação do ortólogo de MTH em *T. cruzi*.** Imagem negativa de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação de um possível homólogo de MTH (seta) em *T. cruzi*, a partir de 50 ng, 100 ng ou 200 ng de DNA genômico de CL Brener. O *primer forward* foi construído a partir da sequência do alelo Tc00.1047053510287.4 (TcNdxN) e o *primer reverse*, a partir do alelo Tc00.1047053506581.69 (TcNdxC). (*1kb*): Padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). (*br*): Controle negativos das reações de PCR feito na ausência de DNA genômico.





**FIGURA 44 - Expressão heteróloga de *mutT* em CL Brener.** Gel de acrilamida 20%, corado por prata, mostrando o produto da RT-PCR feita a partir de RNA total extraído da cultura de CL Brener transfectada com o vetor pROCK\_mut, selecionada em higromicina (Mut). A PCR foi feita utilizando iniciadores específicos que amplificam uma região interna do gene *mutT*, de 112 pb. A mesma reação de RT-PCR foi feita a partir de RNA extraído de uma cultura de CL Brener selvagem (WT). O controle negativo foi realizado na presença de RNA, porém na ausência de transcriptase reversa (<sup>WT</sup>RT- e <sup>Mut</sup>RT-). Como controle positivo, foi utilizado RNA de globina e *primers* específicos, que amplificam uma região de 550 pb do cDNA correspondente (+).



**FIGURA 45 - Aumento da sobrevivência em resposta ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promovido pela expressão de *mutT* em CL Brener.** Curva de sobrevivência de células CL Brener selvagens (WT,  $\blacklozenge$ ) ou expressando *mutT* de *E. coli* (MutT,  $\blacksquare$ ) em resposta ao tratamento com diferentes doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As culturas foram submetidas ao tratamento com 0, 100, 150 e 250 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 72h de crescimento a 28 °C, os parasitas vivos foram contados em câmara citométrica, na presença de corante vital. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.

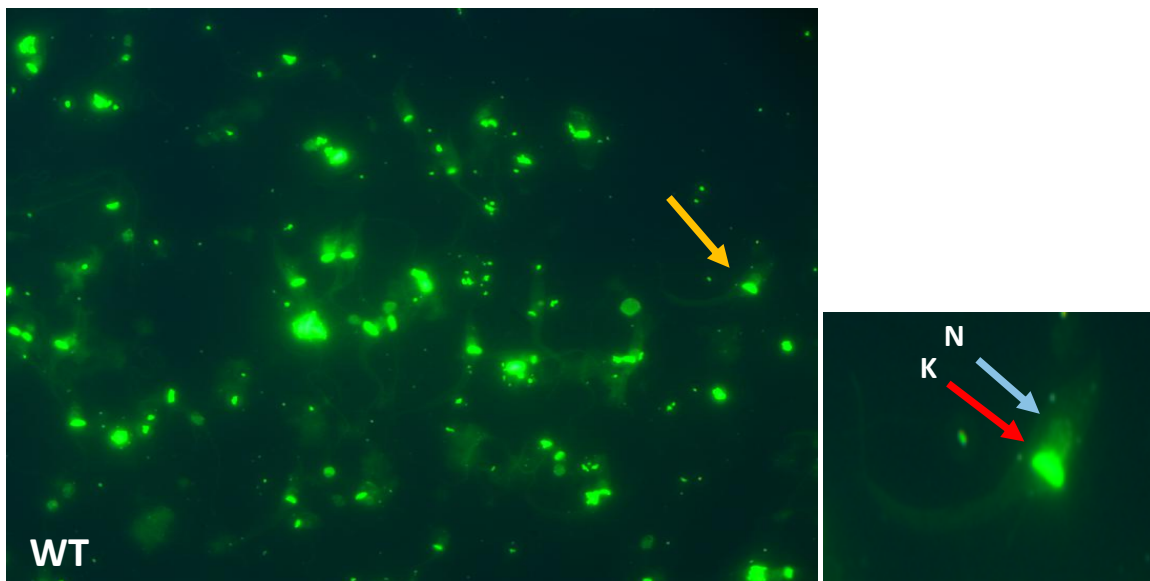
ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparada à cultura selvagem. Este resultado sugere que a citotoxicidade causada pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *T. cruzi* é principalmente devida a 8-oxoG incorporada no DNA por DNA polimerases.

#### **4.3.9.A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MUTT EM *T. CRUZI* DIMINUI OS NÍVEIS CELULARES DE 8-OXOG APÓS TRATAMENTO COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

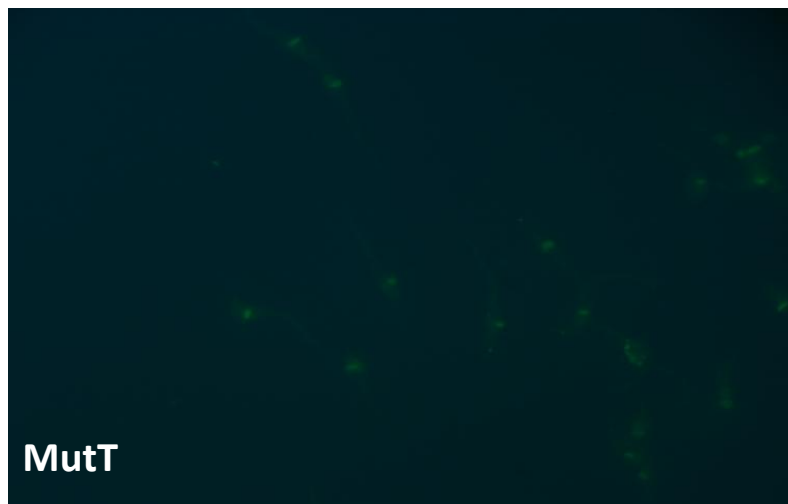
A superexpressão de hMTH1, homólogo humano de *mutT*, reduz para menos da metade os níveis basais de 8-oxoG em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) (Russo *et al.*, 2004). Para verificar se expressão de *mutT* em *T. cruzi* reduz os níveis intracelulares de 8-oxoG após estresse oxidativo, comparamos os níveis da lesão presentes em uma população selvagem do clone CL Brener e a população que expressa o gene bacteriano, após tratamento com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os níveis de 8-oxoG foram acessados através de ensaios de marcação desta lesão com avidina conjugada a FITC. Neste ensaio, os níveis de 8-oxoG são indicados pela intensidade da fluorescência verde emitida pelas células após a ligação específica de FITC-avidina a essa lesão. As imagens retratadas na figura 46 indicam que, de fato, os níveis intracelulares de 8-oxoG após exposição por 20 minutos a 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são muito menores na população que expressa o gene exógeno (Figura 46B), quando comparados aos da população selvagem (Figura 46A), indicando maior controle da incorporação de nucleotídeos oxidados em células que expressam MutT e evidenciando a importância da hidrólise de 8-oxodGTP. Este dado está de acordo com estudos de Speina e colaboradores (2005), que mostram que o principal mecanismo de controle dos níveis de 8-oxoG no DNA em humanos é a atividade de MTH1.

A)



B)



**FIGURA 46 - Redução dos níveis de 8-oxoG após estresse oxidativo em células expressando o gene *mutT* exógeno.** Fotografia em microscópio de fluorescência mostrando (A) CL Brener selvagem e (B) CL Brener transfectada com pROCK\_ *mutT* submetidas ao ensaio de marcação de 8-oxoG com avidina-FITC após tratamento com 200  $\mu$ M de  $H_2O_2$ . A emissão de fluorescência verde indica a presença de 8-oxoG. A suposta predominância da lesão no cinetoplasto das células selvagens pode ser facilmente vista na célula indicada seta amarela. A imagem ampliada desta célula é apresentada no canto direito. O cinetoplasto (K) está indicado pela seta vermelha e o núcleo (N), pela seta azul.

Através da fotografia da figura 46A, também é possível perceber a maior emissão de fluorescência no cinetoplasto das células selvagens (indicado por uma seta vermelha), quando comparada à emissão no núcleo das mesmas (indicado por uma seta azul), sugerindo a presença de altos níveis de lesão no DNA mitocondrial dos parasitas após estresse oxidativo.

#### **4.4. ESTUDOS DA TAXA DE MUTAÇÃO EM *T. CRUZI***

Uma vez que ainda não há descrito na literatura um método que permita determinar a taxa de mutação em *T. cruzi*, elaboramos uma metodologia potencialmente capaz de avaliar a frequência de mutantes presentes em uma população do parasito, baseada na reversão de uma mutação introduzida no gene *neo* integrado ao genoma do parasito, conforme apresentado a seguir.

##### **4.4.1. O GENE *NEO* E SEU VARIANTE *NEOSTOP***

O gene *neo* codifica a proteína APH (aminoglicosídeo 3` fosfotransferase), contendo 267 aminoácidos, que confere à célula resistência a diferentes antibióticos aminoglicosídeos (neomicina, kanamicina, gentamicina, dentre outros), através da inativação destes por fosforilação. A sequência de *neo* e APH estão indicadas na figura 47. Um esquema ilustrativo, mostrando a localização de importantes resíduos de APH, componentes do sítio ativo ou envolvidos na ligação a ATP e ao antibiótico, está indicado na figura 48A.

De posse de um plasmídeo contendo o gene *neo* selvagem (pROCK\_gfpNEO, DaRocha *et al.*, 2004), utilizado como molde nas reações de PCR, o desenvolvimento do ensaio de mutação para *T. cruzi* começou com a introdução de uma mutação de ponto

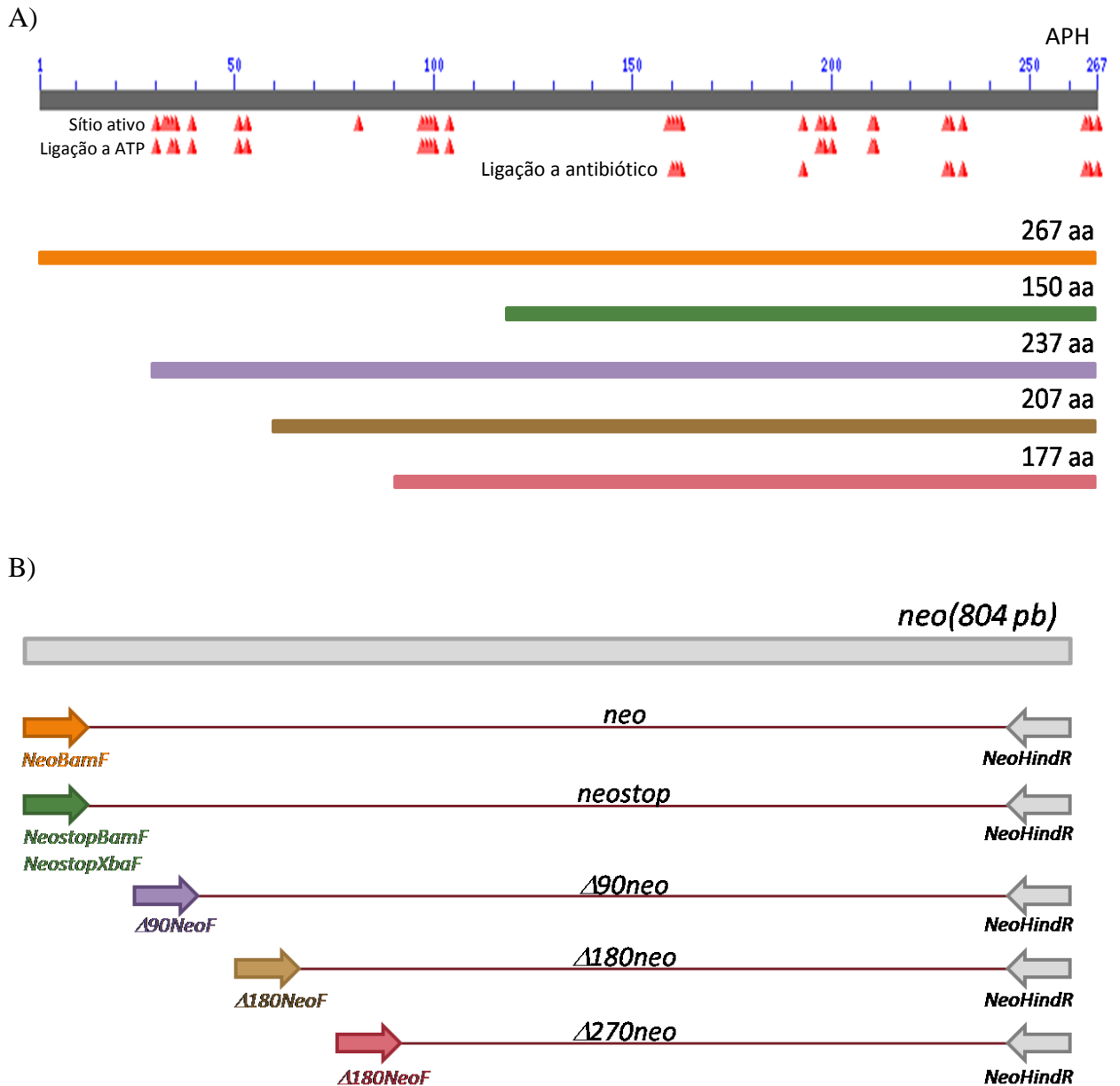
A)

ATG<sup>T</sup>**GGA**TCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG  
GCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTCCGGC  
TGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA  
CTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGT  
GCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG  
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAAGTATCCATC**ATGGCTGATGCAATGCGG**  
**CGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA**  
**GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC**  
**AGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGAT**  
**CTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTC**  
**TGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTA**  
**CCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCGGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTCGTCTTTACGGT**  
**ATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA**

B)

MGSAIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQTIGCSDAAVFRLSAQGRPVLFVKTDLSGALNELQDEAARL  
SWLATTGVPCAAVLDVVTEAGRDWLLLGEVPGQDLLSSHLAPAEEKVSI**MADAMRRLHTLDPATCPFDHQA**  
**KHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQGLAPAELEFARLKARMPDGEDLVVTHGDACLPNIMVENGRFSGFI**  
**DCGRLGVADRYQDIALATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF**

**FIGURA 47 - O gene *neo*.** (A): Sequência de nucleotídeos do gene *neo* presente no vetor pROCK\_gfpNEO. A base destacada em amarelo corresponde à base substituída através da amplificação do gene com iniciadores *forward Neostop*. O gene *Neostop* apresenta uma timina na posição 4, que forma um códon de terminação com as duas bases seguintes (TGA, em azul). A maior ORF presente em *neostop* (se mantivermos a mesma fase de leitura de *neo*) está marcada em negrito. O início da ORF está destacado em vermelho. (B): Sequência de aminoácidos codificados por *neo*. Em negrito estão realçados os aminoácidos que constituem a suposta proteína truncada codificada por *neostop*, cuja metionina inicial está destacada em vermelho.



**FIGURA 48- Variantes do gene *neo* utilizados neste trabalho.** (A): Parte superior: representação esquemática da estrutura primária de APH (em cinza escura), destacando resíduos ( $\blacktriangle$ ) componentes do sítio ativo (linha superior) ou dos domínios de ligação a ATP (linha do meio) e ligação ao antibiótico (linha inferior). Parte inferior: esquema ilustrativo mostrando o alinhamento da proteína APH (laranja) e suas formas mutantes truncadas, codificadas por *neostop* (verde),  $\Delta 90neo$  (roxo),  $\Delta 180neo$  (marrom) e  $\Delta 270neo$  (rosa). (B): Representação esquemática das amplificações realizadas neste trabalho (*neo*, *neostop*,  $\Delta 90neo$ ,  $\Delta 180neo$  e  $\Delta 270neo$ ), utilizando como molde (barra cinza) o gene *neo* presente no vetor pROCK\_gfpNEO. Os iniciadores, cujos nomes estão em itálico, estão representados por setas de diferentes cores. As seqüências correspondentes a cada iniciador estão indicadas na tabela 1 em Materiais e Métodos.

nesse gene, através de sua amplificação com os iniciadores *NeostopBamF* e *NeoHindR* (Figura 48B). Esses iniciadores possuem caudas com sítios de restrição de *BamHI* e *HindIII*, respectivamente, que permitem que o gene amplificado seja posteriormente clonado no vetor bacteriano pMAL c2G.

O *primer forward* possui uma timina em sua posição 10, o que resulta em uma substituição GC→TA na quarta base do gene amplificado, gerando um códon de parada precoce na fase correta de leitura do gene (Figura 47). Análises *in silico* sugerem que o gene mutado, denominado *neostop*, codificaria uma proteína truncada, não funcional, contendo apenas 150 aminoácidos (Figura 48A). Isso aconteceria caso o próximo ATG em fase (Figura 47A, em vermelho) fosse utilizado como códon de iniciação pela maquinaria de tradução da célula. Essa proteína truncada seria desprovida de vários resíduos importantes, componentes do sítio ativo ou do sítio de ligação a ATP, conforme ilustrado na figura 48A.

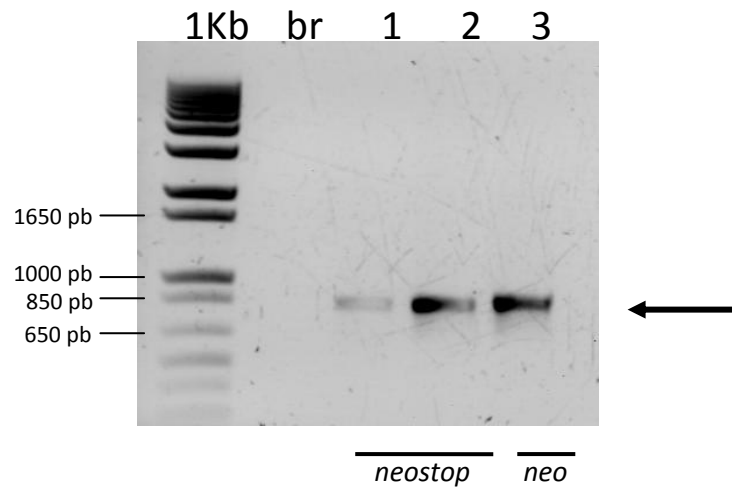
#### **4.4.2.O GENE NEOSTOP NÃO CONFERE RESISTÊNCIA À KANAMICINA A BACTÉRIAS**

O produto da amplificação com os iniciadores *NeostopBamF* e *NeoHindR* (Figura 49A, linhas 1 e 2), supostamente contendo a mutação GC→TA na quarta base de *neo*, apresentou tamanho próximo ao esperado (cerca de 800 pb) e foi clonado em pGEM-T<sup>®</sup> Easy, gerando o vetor pGEM\_neostop (Figura 49B). Esta construção foi submetida à digestão com *BamHI* e *HindIII* para liberação de um fragmento contendo *neostop*, posteriormente clonado no vetor pMAL c2G digerido com o mesmo par de enzimas.

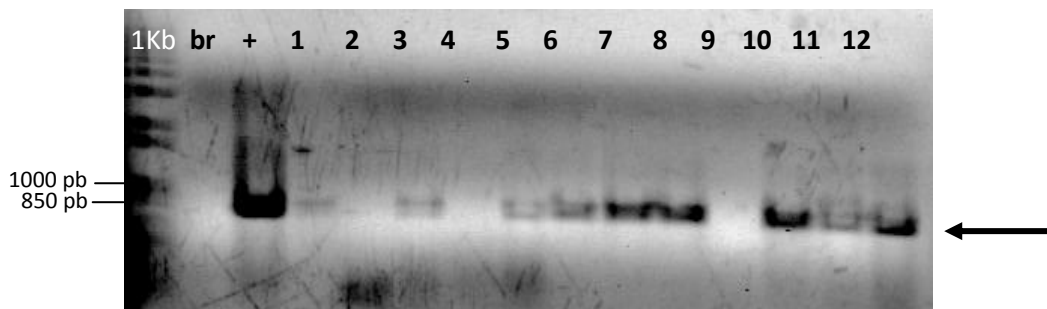
A clonagem de *neostop* em pMAL c2G teve o objetivo de verificar, em um sistema bacteriano, se a mutação introduzida em *neo* foi capaz de causar a inativação deste



A)



B)

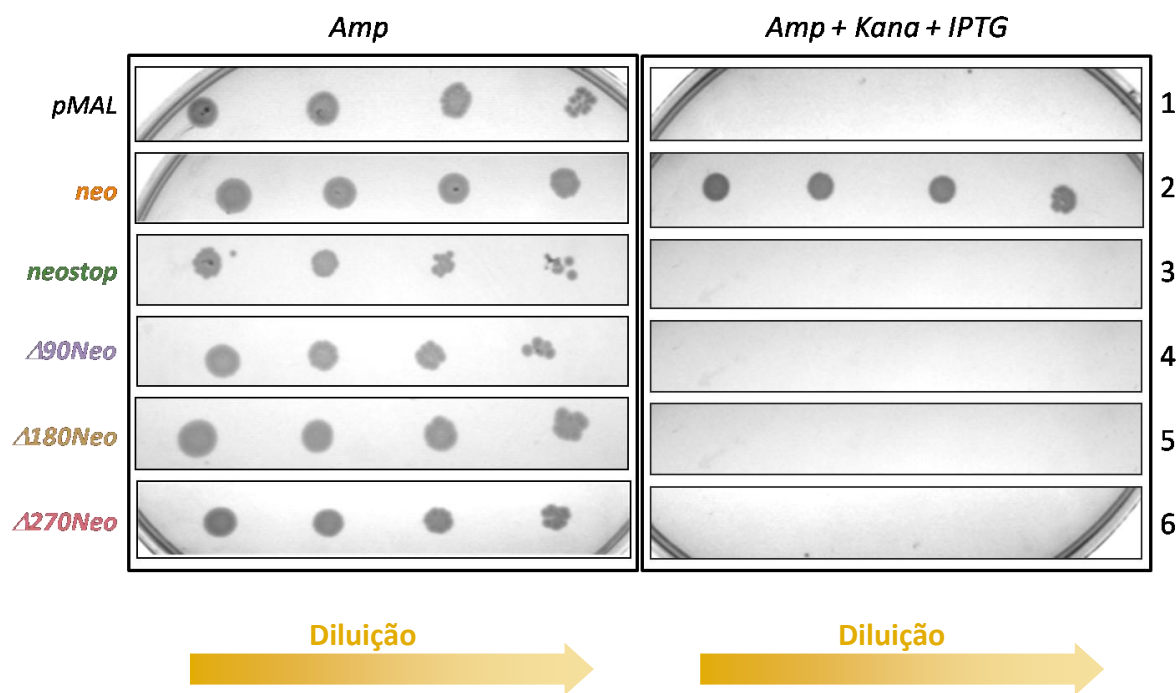


**FIGURA 49 - Amplificação e clonagem de *neo* e *neostop*.** Imagem negativa de géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando (A) os fragmentos *neostop* (linhas 1 e 2) e *neo* (linha 3) amplificados por PCR a partir de pROCK\_gfpNEO e (B) amplificação de *neo* através de PCR de colônia de clones transformados com o vetor pGEM\_neostop (linhas 1 a 8) ou pGEM\_neo (linhas 9 a 12). (1Kb): Padrão de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder*; (br): Controles negativos das reações de PCR feitos na ausência de DNA plasmidiano; (+) Controle positivo da PCR de colônia feito na presença de DNA plasmidiano (3 ng de pROCK\_gfpNEO). As setas indicam o tamanho esperado do gene *neo*.

gene. Dessa forma, testamos a capacidade do gene *neostop* em conferir resistência à kanamicina a bactérias transformadas com o vetor pMAL\_*neostop*. Como controle, o gene *neo* selvagem foi amplificado a partir de pROCK\_gfpNEO com os iniciadores *NeoBamF* e *NeoHindR* (Figura 48) e clonado em pGEM-T<sup>®</sup> Easy, para a realização dos procedimentos subsequentes (digestão, clonagem em pMAL c2G, transformação de bactérias).

Clones de bactérias DH5 $\alpha$  carregando os vetores pMAL c2G, pMAL\_*neo* ou pMAL\_*neostop* foram crescidos por 18 horas em meio 2xYT líquido contendo ampicilina e então incubados em meio 2xYT sólido contendo kanamicina e IPTG. Conforme retratado na figura 50, as células expressando o gene selvagem (*neo*) são resistentes a kanamicina (linha 2), enquanto aquelas carregando o vetor vazio ou o gene mutado (*neostop*) são sensíveis a esse antibiótico (linhas 1 e 3, respectivamente). Esse resultado foi reproduzido em diversos ensaios, e confirma que a proteína truncada codificada pelo gene *neostop* não apresenta atividade.

Uma vez confirmado que o gene *neostop* não era funcional em bactérias, ele foi utilizado para o desenvolvimento dos ensaios para determinação de taxas de mutação entre diferentes linhagens de *T. cruzi*. O gene *neostop* foi amplificado com os iniciadores *NeostopXbaF* e *NeoXhoR* (Figura 48B), clonado em pGEM-T Easy e então subclonado nos sítios de *XbaI* e *XhoI* do vetor pROCK\_HIGRO. O gene *neostop*, integrado no genoma dos parasitos através de recombinação homóloga veiculada pelo vetor pROCK\_HIGRO, possibilitará a identificação de parasitos mutantes revertentes, resistentes à neomicina, surgidos nas populações (espontaneamente ou por indução em ambiente mutagênico), os quais serão selecionados em placas de ágar sangue contendo este antibiótico.

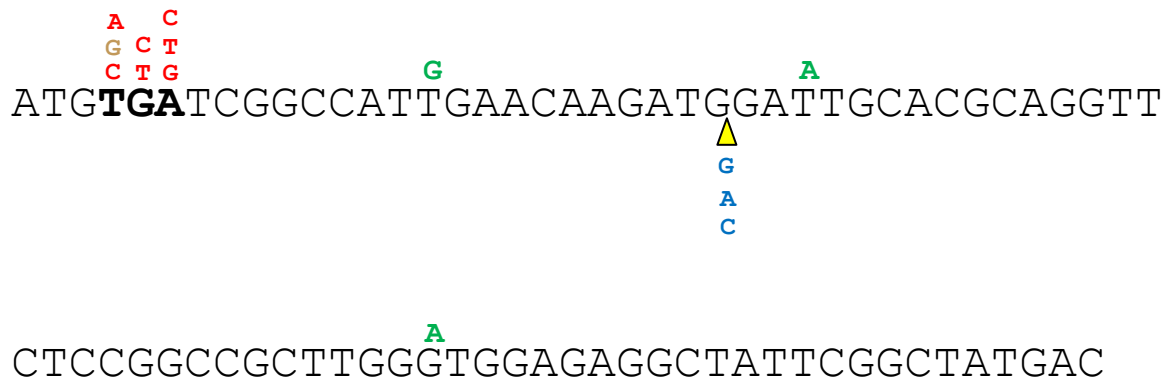


**Figura 50 - Teste de resistência a kanamicina em linhagens de bactérias expressando variantes do gene *neo*.** Fotografias de placas de meio 2xYT-ágar contendo apenas ampicilina (*Amp*) ou ampicilina ,  $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de kanamicina e 0,1 mM de IPTG (*Amp+Kana+ IPTG*), onde foram gotejadas alíquotas de diluições sucessivas de culturas de clones de DH5 $\alpha$  carregando os vetores pMAL c2G vazio (linha1), pMAL\_ neo (linha 2), pMAL\_neostop (linha3), pMAL\_90neo (linha 4), pMAL\_180neo (linha 5), ou pMAL\_270neo (linha 6). As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas.

#### **4.4.3.A MUTAÇÃO REVERTENTE EM NEOSTOP DEVE ESTAR SITUADA NOS PRIMEIROS 90 PB DO GENE**

A reversão do fenótipo de sensibilidade à neomicina poderia ser adquirida através de diferentes eventos mutacionais em *neo* (Figura 51), como substituição simples de bases, inserção ou deleção, que restabelecessem a ORF original (através da reversão do códon de parada precoce) ou que criassem novas ORFs (através da formação de novos códons de iniciação a 3' da mutação introduzida), capazes de transcrever variantes funcionais da proteína APH apresentando pequenas alterações na região N-terminal, porém contendo os principais resíduos da proteína (destacados na Figura 48A). Alternativamente, a resistência à neomicina poderia ser adquirida por mutações supressoras em genes de tRNA, que permitiriam a incorporação de algum aminoácido frente ao códon TGA.

Para verificarmos o quanto da região N-terminal de APH poderia ser perdida pelas proteínas variantes, sem resultar em perda de funcionalidade, realizamos a amplificação de fragmentos do gene *neo* apresentando deleções sucessivas de 90 pb, 180 pb ou 270 pb em sua porção 5' (Figura 48). Os fragmentos foram denominados  $\Delta 90neo$ ,  $\Delta 180neo$  e  $\Delta 270neo$  e transcrevem proteínas APH truncadas, desprovidas de 30, 60 ou 90 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal (Figura 48). Esses fragmentos foram clonados em pGEM-T<sup>®</sup> Easy, subclonados em pMAL c2G e utilizados no ensaio bacteriano de resistência a kanamicina (Figura 50). De modo semelhante ao ensaio realizado com as construções pMAL\_ neo e pMALneostop, culturas de células DH5 $\alpha$  carregando os vetores pMAL\_90neo, pMAL\_180neo e pMAL\_270neo foram crescidas na presença de kanamicina e IPTG. Conforme exemplificado na figura 50, apenas a ORF completa de *neo* foi capaz de conferir resistência à kanamicina aos clones recombinantes testados.



**FIGURA 51 - Eventos mutacionais simples (substituição ou inserção) supostamente capazes de restabelecer a funcionalidade do gene neo.** Esquema ilustrativo mostrando exemplos de possíveis eventos mutacionais simples localizados na porção inicial do gene *neostop*, capazes de restaurar a ORF original de *neo* ou de gerar novas ORFs, possivelmente funcionais, uma vez que codificariam variantes de APH contendo todos os resíduos de ligação ao ATP, ligação ao antibiótico, além dos resíduos do sítio ativo. As primeiras 80 bases de *neostop* estão representadas em preto. O códon de terminação precoce está destacado em negrito. As substituições (transversões ou transições) estão representadas por bases localizadas acima da sequência de *neostop*, no local da possível mutação. A mutação que restaura o gene selvagem está em marrom, as mutações que revertem o códon de parada estão em vermelho, as que criam novos códons de iniciação estão em verde. O triângulo amarelo aponta um local onde a inserção de G, A ou C também poderia restituir uma ORF funcional.

Dessa forma, nossos resultados indicam que a deleção dos 30 primeiros aminoácidos da proteína APH é suficiente para comprometer sua funcionalidade. Com base nessa observação, inferimos que, para restaurar a funcionalidade do gene *neostop*, as eventuais mutações revertentes que resultem em geração de códons de iniciação alternativos devem estar situadas na porção inicial do gene, antes da posição 90 (Esta informação nos orienta quanto a procedimentos posteriores de sequenciamento do gene *neostop* em clones revertentes).

#### **4.4.4. POPULAÇÕES DO CLONE CL BRENER TRANSFECTADAS COM NEOSTOP SÃO SENSÍVEIS À NEOMICINA**

Com o objetivo de testar a viabilidade dessa estratégia em *T. cruzi* e padronizar procedimentos como expansão da população em análise, seleção e confirmação de mutantes revertentes e quantificação da frequência de mutação, realizamos inicialmente a transfecção de apenas uma cepa de *T. cruzi* com o vetor pROCK\_neostop (clone CL Brener). Epimastigotas de CL Brener em fase exponencial de crescimento foram transfectados com o vetor previamente linearizado com a enzima *NotI*, o que favorece sua integração em uma região específica do genoma do parasito (locus de  $\beta$ -tubulina). Os transfectantes estáveis foram selecionados pelo cultivo na presença de higromicina ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), por cerca de seis semanas. Em seguida, a população selecionada (a qual denominamos CL\_neostop) foi cultivada na presença de G418 (genérico de Geneticina<sup>®</sup>, um análogo de neomicina), em placas de ágar sangue contendo  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  deste antibiótico. Como controle, esta população também foi plaqueada em meio ágar sangue contendo apenas higromicina ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Ainda, como controle positivo de crescimento em G418, utilizamos uma população estável de CL Brener transfectada com pROCK\_Rad51NEO (CL\_Rad51), selecionada e mantida na presença de G418. As placas foram incubadas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por seis semanas, e após este período verificamos que, ao

contrário de CL\_Rad51, que possui o gene *neo* selvagem, as células que carregam o gene *neostop* não formaram nenhuma colônia em placas com G418, conforme indicado na tabela 4. Este resultado sugere que o gene mutado (*neostop*) não é funcional em *T. cruzi*, assim como em bactérias.

#### **4.4.5.A MUTAÇÃO NA QUARTA BASE DE NEOSTOP ESTÁ PRESENTE EM CLONES TRANSFECTADOS DE CL BRENER**

Colônias isoladas de CL\_*neostop* formadas nas placas de ágar sangue com higromicina foram analisadas através de “PCR de colônia”, utilizando o par de iniciadores que amplifica *neostop* (*NeostopXbaF* e *NeoXhoR*). Conforme retratado na figura 52A, um fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 800 pb) foi amplificado a partir de cada um dos doze clones CL\_*neostop* testados (H1 a H12), mas não foi amplificado de populações selvagens das cepas JG ou CL Brener.

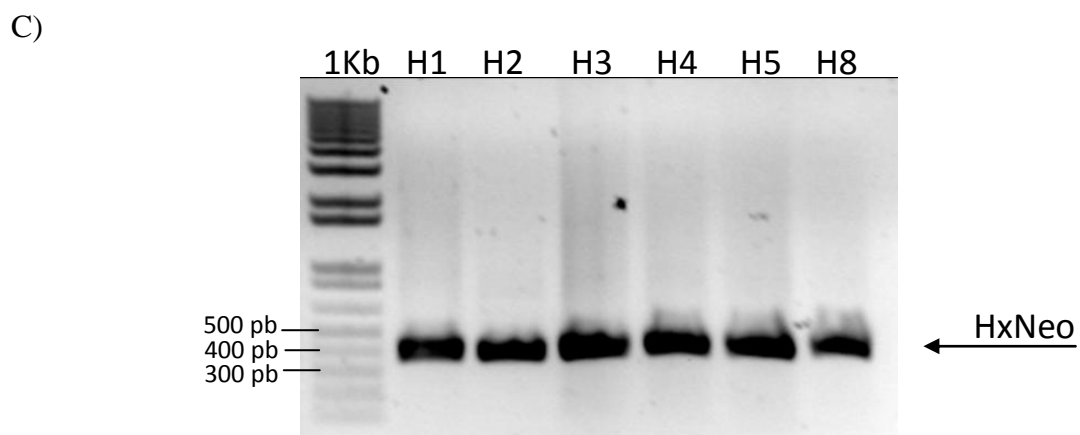
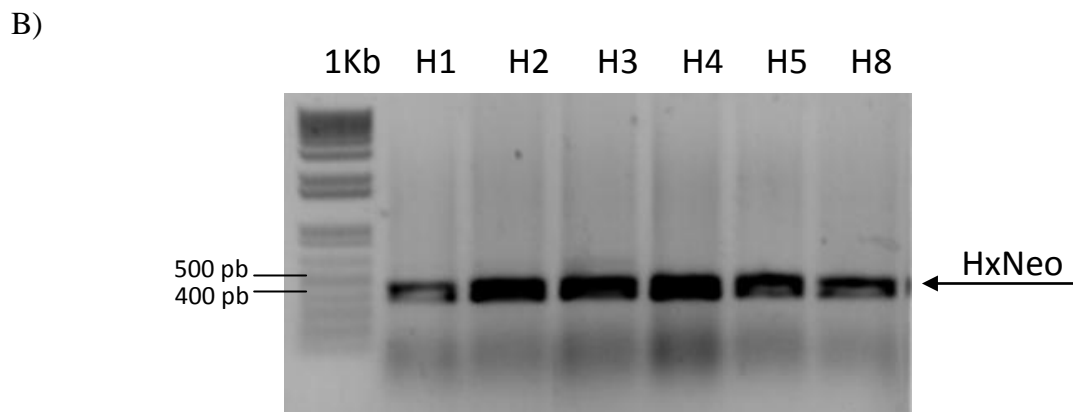
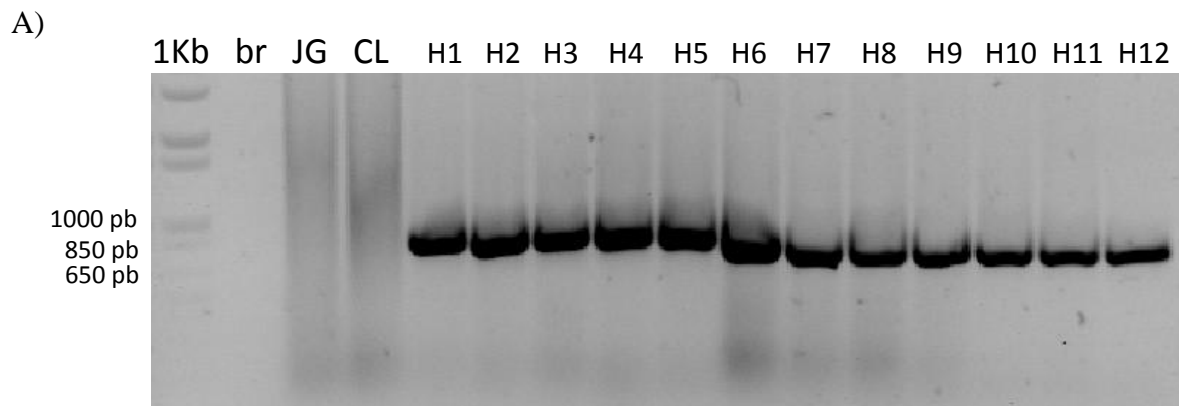
Em seguida, alguns clones tiveram a porção inicial de *neostop* sequenciada para confirmar a presença da mutação na quarta base do gene integrado ao genoma do parasito, além de excluir a presença improvável (porém possível) de alguma nova mutação. Cabe ressaltar que as células haviam sofrido várias passagens desde que receberam o gene exógeno - pelo menos 120 dias de cultivo, cerca de 50 duplicações - e eventualmente o gene *neostop* poderia ter sofrido alguma modificação. Com os iniciadores *Hx10* e *Neoseq21*, um fragmento de aproximadamente 400 pb (Figura 52B e 52C), o qual denominamos HxNeo, contendo as primeiras 160 bases de *neostop*, além de parte da sequência existente acima do gene (região Hx1, presente no vetor pROCK) foi amplificado e sequenciado.

**TABELA 4** - Clonagem preliminar de CL\_neostop em ágar sangue

População	Quantidade de células espalhadas por placa (número de placas)	Ágar sangue	
		Higromicina	G418
CL_neostop	10 <sup>4</sup> (2)	+	-
	10 <sup>6</sup> (2)	+	-
	10 <sup>7</sup> (2)	++	-
	10 <sup>8</sup> (2)	++	-
CL_Rad51	10 <sup>4</sup> (1)	-	+
	10 <sup>6</sup> (1)	-	+
CL_wt	10 <sup>4</sup> (1)	-	-
	10 <sup>6</sup> (1)	-	-

Nota: O símbolo “+” indica o crescimento de até 100 clones por placa, “++” indica o crescimento de mais de 100 clones por placa e “-” indica a ausência de clones, em placas de ágar sangue contendo 200 µg.mL<sup>-1</sup> de higromicina ou 200 µg.mL<sup>-1</sup> de G418. (CL\_wt): CL Brener selvagem, (CL\_neostop): CL Brener transfectada com pROCK\_neostop e (CL\_Rad51): CL Brener transfectada com pROCK\_Rad51NEO .



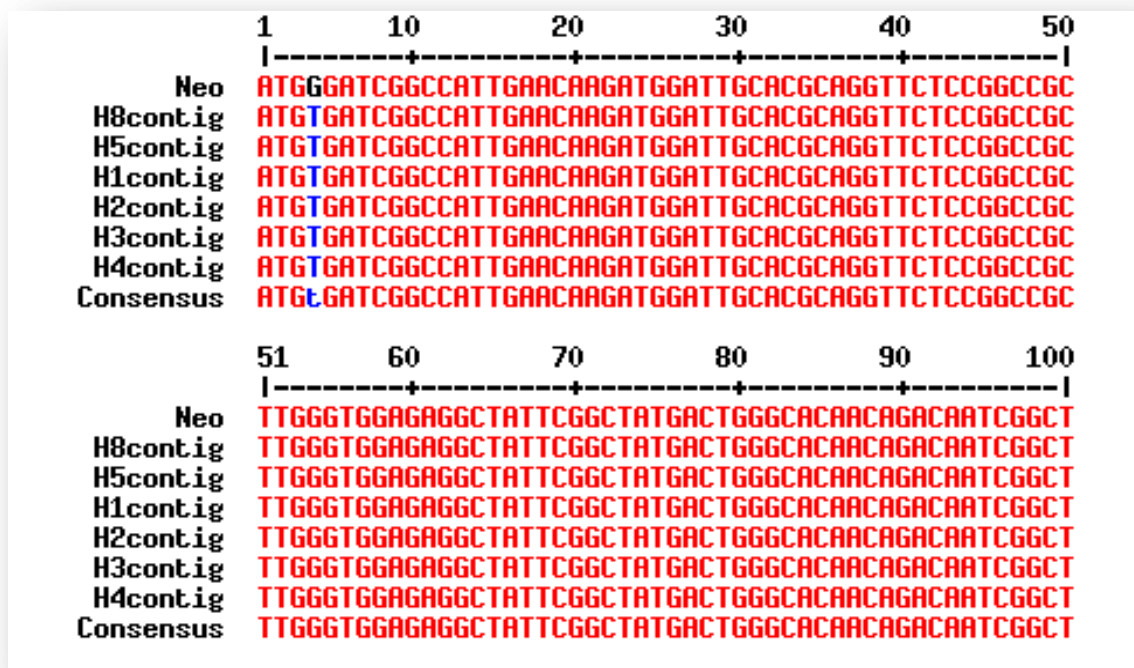


**FIGURA 52 - PCR de colônia de clones CL\_neostop.** (A) Imagem negativa de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, mostrando gene *neostop* amplificado por PCR de colônia a partir de diferentes clones de CL\_neostop mantidos em meio líquido (H1 a H12). Reações controle foram feitas na ausência de DNA (*br*) ou na presença de DNA genômico das cepas JG (*JG*) ou CL Brener selvagem (*CL*). (B) Amplificação de fragmentos HxNeo por PCR de colônia a partir de seis clones CL\_neostop. (C) Fragmentos HxNeo purificados por PEG25%, como etapa preparatória à reação de sequenciamento.

Para cada clone, foram realizadas três reações de sequenciamento na direção reversa, utilizando o iniciador *Neoseq21*, e um sequenciamento na direção *forward*, com o iniciador *Hx10*. As sequências obtidas foram analisadas através do programa Phred (Ewing *et al*, 1998), com o qual verificamos a qualidade do sequenciamento, analisamos os eletrofluorogramas, obtivemos um *contig* de cada clone (a partir das quatro sequências geradas para o mesmo clone) e então deduzimos a sequência original de cada clone. A sequência predita de cada clone foi alinhada à sequência de *neo* (Figura 53) através do programa Multalin (Corpet, 1988). O sequenciamento mostrou a presença da mutação GC→TA no local correto em todos os seis clones testados (Figura 53) e a ausência de qualquer nova mutação em *neostop* que pudesse conferir funcionalidade ao gene (conforme já mencionado, esta deveria estar localizada entre as primeiras 90 bases de *neostop*).

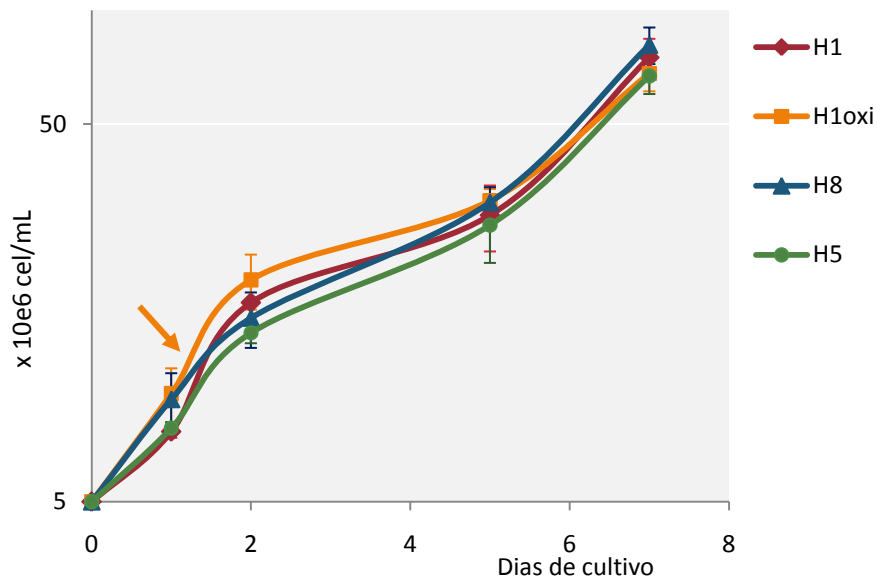
#### **4.4.6. OS CLONES SELECIONADOS PARA O ENSAIO DE MUTAÇÃO APRESENTAM CRESCIMENTO SEMELHANTE E SÃO SENSÍVEIS À NEOMICINA**

Três clones (H1, H5 e H8) foram selecionados para os ensaios de mutação preliminares, que avaliaram a frequência de mutantes surgidos na população após sucessivas passagens em meio líquido, na ausência ou presença de estresse oxidativo. Antes, verificamos se os clones apresentavam crescimento semelhante em meio líquido, sob condições normais de cultivo. Culturas dos clones H1, H5 e H8 foram diluídas a uma mesma densidade inicial e então incubadas a 28 °C por sete dias. A densidade celular de cada cultura foi determinada nos dias 1, 2, 5 e 7, por contagem de parasitas vivos em câmara de Neubauer. Como indicado na figura 54A, o crescimento dos clones foi similar neste período. Ainda, verificamos o crescimento do clone H1 na presença de 50 µM de

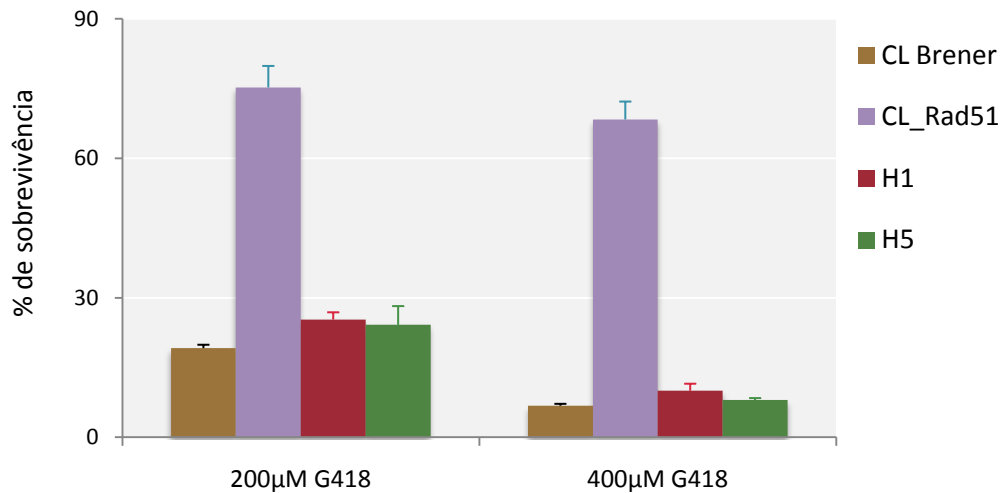


**FIGURA 53 - Sequenciamento da porção inicial do gene *neostop* em diferentes clones CL\_ *neostop*.** Alinhamento, gerado pelo programa Multalin, de *contigs* correspondentes às sequências da porção inicial do gene *neostop* nos clones H1, H2, H3, H4, H5 ou H8. Os *contigs* foram gerados pelo programa Phred, após análise do sequenciamento (três reações reversas e uma reação direta) de fragmentos HxNeo amplificados a partir de cada um dos clones. A sequência das 100 primeiras bases do gene *neo* também foi confrontada às sequências dos *contigs*. O sequenciamento confirma a presença da mutação na quarta base em *neostop* em todos os clones.

A)



B)



**FIGURA 54 - Crescimento de clones CL\_neostop e sensibilidade a G418.** (A) Curva de crescimento de clones H1 (◆), H5 (●) e H8 (▲) em meio LIT, na ausência de tratamento, por sete dias a 28°C e crescimento do clone H1 em meio LIT adicionado de 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■). A seta indica o momento de adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O crescimento foi determinado por contagem de células vivas em câmara de Neubauer. (B) Sobrevivência de clones H1 (■) e H5(■), após cinco dias de cultivos na presença de 200 μM e 400 μM de G418. Como controles, foram utilizadas uma cultura selvagem da cepa CL Brener (■) e uma população de CL Brener transfectada com o vetor pROCK\_rad51NEO (■). Os ensaios foram feitos em triplicatas. Cada ponto representa a média dos três experimentos; as barras representam o desvio padrão.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adicionado à cultura 24 horas após o início da curva (dia 1) e observamos que o tratamento não atrasou o crescimento deste clone no período avaliado (Figura 43A).

Além disso, avaliamos a sensibilidade a G418 dos clones H1 e H5, analisando a sua sobrevivência na presença deste antibiótico (0, 200 µg.mL<sup>-1</sup> e 400 µg.mL<sup>-1</sup>) (Figura 54B). Culturas com ou sem a droga foram iniciadas a uma mesma densidade celular (5 x 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>). Após cinco dias de cultivo, a densidade das culturas foi determinada por contagem de células. A densidade daquelas crescidas na ausência de G418 foi considerada como “100% de sobrevivência”. A sobrevivência das culturas crescidas na presença de G418 foi então estabelecida por comparação a este valor. Como controles, foram utilizadas culturas sabidamente sensíveis ou resistentes a G418 (CL Brener selvagem e CL\_Rad51). Conforme indicado na figura 54B, os clones H1 e H5 mostraram-se sensíveis à neomicina, assim como o controle selvagem.

#### **4.4.7.A FREQUÊNCIA DE MUTANTES RESISTENTES À NEOMICINA AUMENTA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO E CONFORME O TEMPO DE CULTIVO**

Os clones H1, H5 e H8 foram cultivados por seis semanas, em condições normais ou sob estresse oxidativo (gerado pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às culturas, a uma concentração final de 50 µM). Os repiques eram feitos a cada sete dias e a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às culturas sob tratamento era feita no dia seguinte ao repique. Após o sexto repique, a densidade celular de cada cultura (H1, H5, H8, H1oxi, H5oxi e H8oxi) era acompanhada por contagens diárias. Quando as culturas alcançavam a densidade de 3 x 10<sup>7</sup> células/mL (cerca de três dias após o repique), as células eram plaqueadas em meio ágar sangue contendo 200 µg.mL<sup>-1</sup> de G418, para a seleção de mutantes revertentes. Para cada uma das culturas, foram feitas 10 placas com G418 sendo que em cada placa foram espalhadas 10<sup>7</sup> células (cerca de 300 µL da cultura). Como controle negativo, utilizamos uma cultura

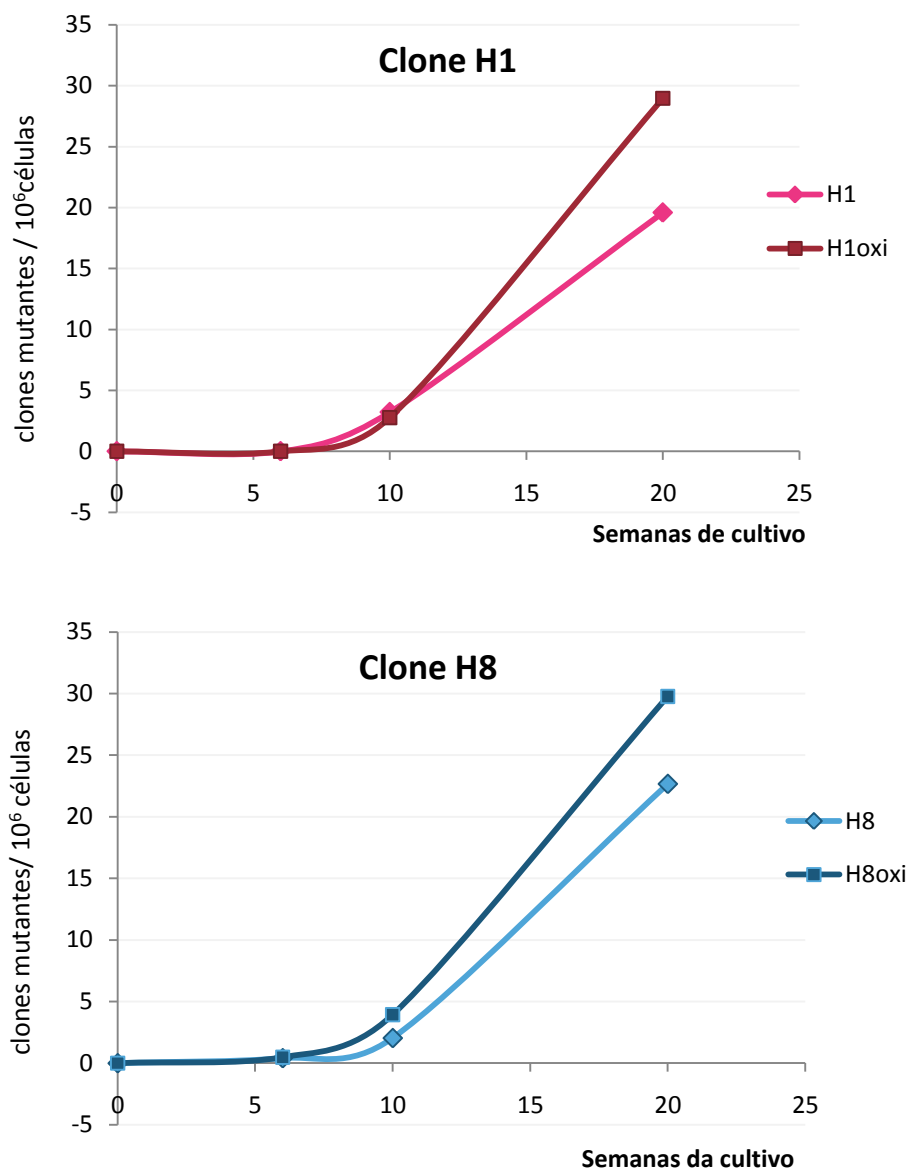
selvagem da cepa CL Brener. Para verificarmos a eficiência do plaqueamento, as culturas também foram plaqueadas em meio ágar sangue contendo apenas higromicina (200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Para cada cultura, foram utilizadas cinco placas com higromicina, e  $10^3$  células foram plaqueadas em cada uma delas. As placas foram embaladas e mantidas em estufa a 28°C por 60 dias, após o que foram abertas e as colônias de cada placa contadas. Na tabela 5, estão apresentados os resultados obtidos neste primeiro ensaio. Paralelamente, as culturas continuaram a ser mantidas e repicadas semanalmente. Então, após outras quatro semanas (ou seja, após o décimo repique), as células foram novamente plaqueadas, sob as mesmas condições. O mesmo foi feito após o vigésimo repique. Os resultados obtidos a partir dos três ensaios (6, 10 ou 20 semanas) estão apresentados sob forma de gráficos, que mostram a frequência de mutantes resistentes a G418 presentes em cada população ao longo do período de cultivo (Figura 55). Os dados nos mostram que, conforme esperado, a frequência de mutantes aumenta com o tempo de cultivo e sob condições de estresse oxidativo, sugerindo a viabilidade do ensaio proposto.

#### **4.4.8. MUTAÇÕES REVERTENTES NO GENE NEOSTOP ESTÃO PRESENTES EM CERCA DE 10% DOS CLONES SELECIONADOS EM NEOMICINA**

Alguns clones considerados “revertentes” crescidos nas placas com G418 foram transferidos para o meio líquido e cultivados por algumas semanas para que realizássemos posteriormente a confirmação do fenótipo de resistência a G418, o sequenciamento da porção inicial do gene *neostop* e a verificação de possíveis mutações revertentes nestes clones. Fragmentos HxNeo foram amplificados a partir de diferentes clones revertentes selecionados em G418 e aproximadamente 70 clones foram sequenciados (3 reações diretas e 1 reação reversa para cada fragmento). A análise do

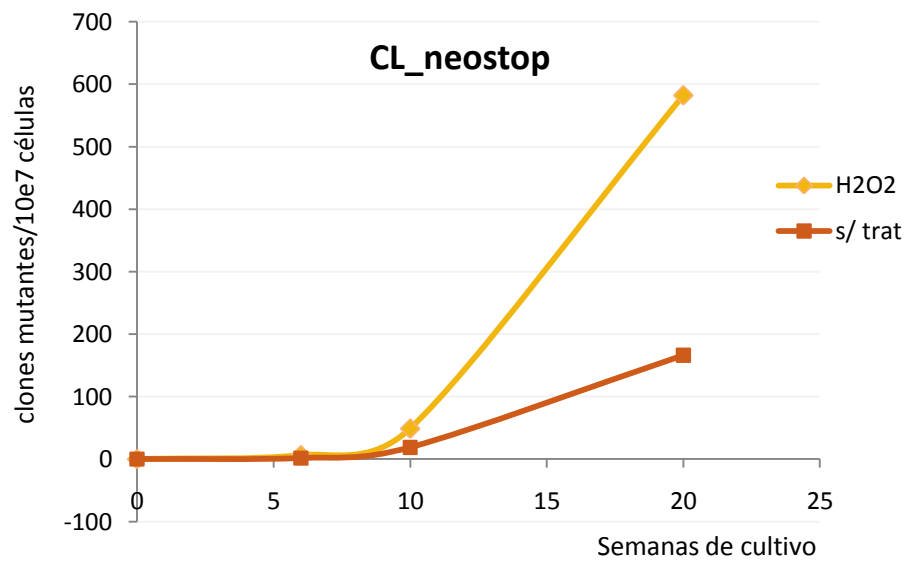
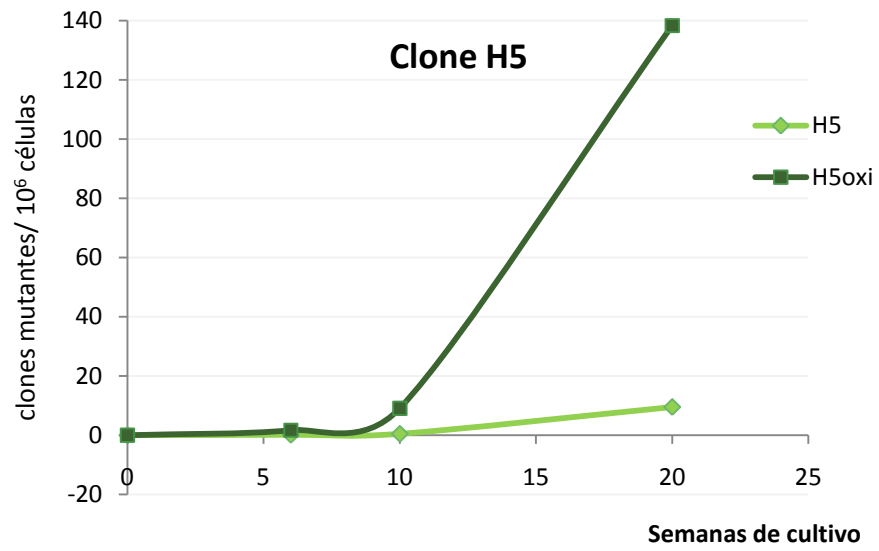
**TABELA 5** – Frequência de mutantes resistentes a G418 em diferentes populações celulares, expandidas por seis semanas de crescimento em meio líquido

<b>Cultura</b>	<b>Total de clones crescidos em 10 placas com G418 (<i>G</i>)</b>	<b>Total de clones crescidos em 5 placas com Higromicina (<i>H</i>)</b>	<b>Frequência de mutantes (<math>10^{-4} \times 5G / 10H</math>)</b>
H1	0	346	>1,45E-07
H1oxi	0	200	>2,52E-07
H5	1	355	1,41E-07
H5oxi	5	146	1,71E-06
H8	2	245	4,08E-07
H8oxi	2	207	4,84E-07
CL Brener	0	255	>2E-07



**FIGURA 55 – Frequência de mutantes resistentes a G418 em diferentes populações celulares de CL\_neostop.** Resultado dos três plaqueamentos do ensaio de detecção de mutantes revertentes em populações clonais de CL\_neostop [clones H1 (◆), H5 (◇) e H8 (◆)]. As populações foram expandidas por crescimento em meio líquido não seletivo, por seis, dez ou vinte semanas, sob condições normais ou de estresse oxidativo [H1oxi (■), H5oxi (■), H8oxi (■)] e então plaqueadas em meio contendo G418 ou higromicina. A frequência de mutantes em cada população foi obtida pelo produto  $10^{-4} Gh/Hg$ , sendo **G** o número total de clones crescidos em **g** placas com G418, e **H** o número total de clones crescidos em **h** placas com higromicina. Determinamos ainda a frequência de mutantes em uma população fictícia, formada pelos três clones [CL\_neostop s/trat (■) e H2O2(◆)].



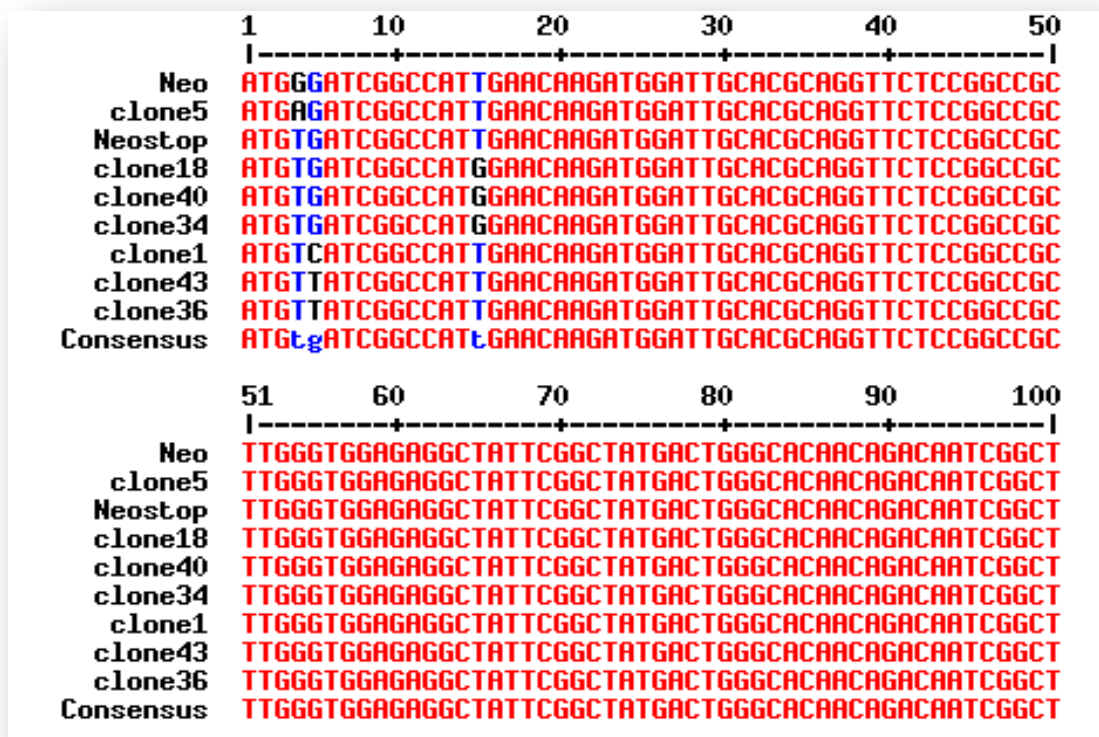


**FIGURA 55-** Continuação.

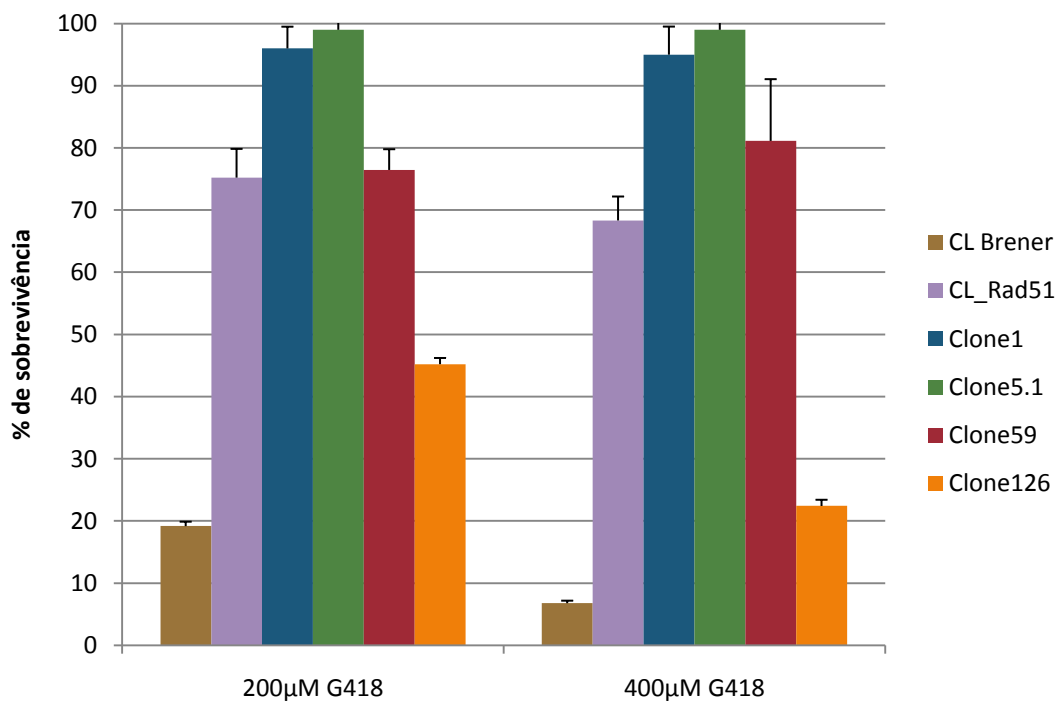
sequenciamento mostrou a presença de mutações revertentes em apenas sete desses clones (todas elas transversões), cujas sequências estão apresentadas na figura 56. Dos sete clones com mutação revertente em *neostop*, cinco eram provenientes de culturas sob estresse oxidativo (clones 18, 34, 36, 40 e 43) e dois clones eram provenientes de culturas sem tratamento (clones 1 e 5). É interessante notar a presença das transversões AT→CG e GC→TA nos clones sob tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que estas são mutações induzidas por estresse oxidativo, especialmente pela presença de 8-oxoG no *pool* de nucleotídeos ou no DNA genômico, respectivamente.

#### **4.4.9. ALGUNS CLONES QUE NÃO APRESENTAM MUTAÇÃO EM NEOSTOP SÃO RESISTENTES À NEOMICINA**

Para a confirmação em meio líquido do fenótipo de resistência a G418, selecionamos quatro dos cinquenta clones revertentes sequenciados: dois clones que apresentaram mutação em *neostop* (clones 1 e 5) e dois clones que não apresentaram mutação em *neostop* (clones 59 e 126). Como controles, utilizamos uma cultura de CL Brener selvagem e uma de CL\_Rad51. A resistência a G418 foi testada conforme descrito anteriormente, por cinco dias cultivo em meio líquido na presença de 0, 200 ou 400 µg.mL<sup>-1</sup> do antibiótico, sendo a sobrevivência avaliada através da determinação da densidade celular das culturas. Os resultados gerados pela curva de sobrevivência (Figura 57) mostram que os clones cujas mutações revertentes foram confirmadas por sequenciamento (clone 1 e clone 5) apresentaram, de fato, as maiores sobrevivências em G418, próximas de 100%. Ainda, vimos que o clone 126, apesar de apresentar maior sobrevivência que a célula selvagem em meio líquido contendo G418, apresentou menor sobrevivência em relação aos outros clones, aparentando ser um falso positivo. No entanto, verificamos que o clone 59, selecionado em placas de meio sólido contendo G418, mas que



**FIGURA 56** – Sequenciamento da porção inicial do gene *neostop* em clones CL\_ *neostop* revertentes. Alinhamento, gerado pelo programa Multalin, de *contigs* correspondentes às sequências da porção inicial do gene *neostop* em diferentes clones revertentes (1, 5, 18, 34, 36, 40 e 43) selecionados em placas de água sangue com G418. Os *contigs* foram gerados pelo programa Phred, após análise do sequenciamento de fragmentos HxNeo amplificados a partir de cada um dos clones. Cada fragmento foi sequenciado quatro vezes. A sequência das 100 primeiras bases do gene *neo* e do gene *neostop* foram confrontadas às sequências dos *contigs*.



**FIGURA 57 - Resistência de clones revertentes a G418 em meio líquido.** Sobrevivência de clones revertentes 1 (■), 5 (■), 59 (■) e 126 (■), pós cinco dias de cultivos na presença de 200 μM e 400 μM de G418. Como controles, foram utilizadas uma cultura selvagem da cepa CL Brener (■) e uma população de CL Brener transfectada com o vetor pROCK\_rad51NEO (■). Os ensaios foram feitos em triplicatas. Cada ponto representa a média dos três experimentos; as barras representam o desvio padrão.

aparentemente não apresenta mutação revertente em *neostop* mostra a mesma sobrevivência em G418 que o controle positivo CL\_Rad51.

Os dados obtidos nos ensaios preliminares de detecção de mutantes revertentes resistentes à neomicina indicam a viabilidade da metodologia proposta para análise da frequência de mutação em *T. cruzi*, utilizando como repórter o gene *neostop*.

## 5. Discussão

Na primeira etapa deste trabalho, voltamos nossas atenções para o trematódeo *S. mansoni*, principal agente causador da esquistossomose, uma das principais doenças endêmicas do nosso tempo (van der Werf *et al.*, 2002). O principal objetivo deste estudo foi a identificação, nesse parasito, de genes envolvidos no reparo ou tolerância a danos no DNA, especialmente aqueles causados por metilação das bases.

O *S. mansoni* apresenta um complexo ciclo de vida, onde se alternam estágios envolvendo um hospedeiro definitivo vertebrado, um hospedeiro invertebrado intermediário e fases de vida livre em ambiente aquático. Para que se acomodem a ambientes tão diferentes, numerosas adaptações devem ser feitas pelos parasitos, incluindo aquelas relativas à manutenção da estabilidade do DNA. De fato, ao longo do ciclo biológico, o parasito é exposto a diferentes agentes que danificam seu DNA e, portanto, deve apresentar mecanismos de reparo e/ou tolerância a esses danos. Dessa forma, o entendimento das vias de reparo de DNA em *S. mansoni* pode auxiliar uma melhor compreensão das bases biológicas da interação adaptativa que ocorre entre o parasito e os diversos ambientes onde vive. Também pode contribuir para a elucidação de mecanismos envolvidos na resistência do parasito a drogas, geração de diversidade antigênica, dentre outros.

O reparo de DNA em *S. mansoni* é pouco conhecido. Sabe-se, por dados gerados pelo projeto Genoma de Schistosoma, que essa espécie apresenta proteínas das principais vias de reparo de DNA (revisto em Oliveira, 2007). No entanto, são escassos os estudos específicos acerca dessas vias ou proteínas, nas diversas fases do parasito (Silva *et al.*, 2007; Ruelas *et al.*, 2007). Por outro lado, a alta conservação dos mecanismos enzimáticos de reparo facilita o entendimento dessas vias em organismos menos estudados. Ainda, permite a utilização de ensaios de complementação de linhagens celulares

heterólogas deficientes nas diferentes vias de reparo como uma eficiente estratégia de clonagem de genes envolvidos nestes processos (Memisoglu e Samson, 1996; Augusto-Pinto *et al.*, 2003a).

Em busca de genes de *S. mansoni* envolvidos no mecanismo de reparo e/ou tolerância a danos no DNA, selecionamos, a partir de uma biblioteca de cDNA do verme adulto, uma sequência capaz de complementar linhagens de bactérias deficientes em genes da via de reparo por excisão de bases (BER), as quais apresentam sensibilidade acentuada à droga MMS. A escolha por bactérias deficientes no BER ocorreu por ser esta a via mais conservada entre procariotos e eucariotos. Conforme apresentado anteriormente, o BER é a principal via de processamento de pequenas lesões de bases geradas por agentes alquilantes (Lindahl e Wood, 1999). O metilmetano sulfonato (MMS), é um agente alquilante do tipo  $S_N2$ , que reage com bases no DNA, provocando sua metilação, principalmente em átomos de nitrogênio. O principal dano causado por MMS é a lesão 3-meA, altamente citotóxica por causar bloqueio na replicação, resultando em parada de ciclo celular na fase S, aberrações cromossômicas, apoptose, entre outros (Engelward *et al.*, 1998). Em *E. coli*, essa lesão é reconhecida e excisada do DNA pelas glicosilases AlkA e Tag. Enquanto Tag (3meA DNA glicosilase I) é expressa constitutivamente, AlkA (3meA DNA glicosilase II) é uma proteína indutível, que participa da resposta adaptativa de bactérias a agentes alquilantes (resposta Ada, revisada por Kleibl, 2002). A linhagem bacteriana GC4803, utilizada na varredura da biblioteca de *S. mansoni* é especialmente sensível a MMS por ser deficiente nas duas glicosilases, AlkA e Tag.

Apenas um clone (clone SGC3) da biblioteca de cDNA utilizada foi capaz de reverter parcialmente o fenótipo de hipersensibilidade a MMS apresentado por bactérias GC4803. O cDNA selecionado também foi capaz de complementar parcialmente a



sensibilidade a MMS de bactérias da linhagem BW535. Por serem deficientes em três endonucleases (exonuclease III, endonuclease IV e endonuclease III), que realizam a segunda etapa do BER (clivagem do sítio AP), essas bactérias são mais sensíveis a agentes alquilantes ou a estresse oxidativo, quando comparadas a linhagens bacterianas selvagens. Por outro lado, SGC3 não foi capaz de complementar linhagens deficientes em diferentes enzimas do NER, como AB1886 ou AB2463 (dado não mostrado).

O cDNA selecionado foi sequenciado (número no GenBank: DQ060567) e a análise da sequência mostrou que maior ORF presente no fragmento transcreve um polipeptídeo com alta similaridade a proteínas IMP4 de diferentes organismos. A proteína IMP4 é componente do complexo eucariótico U3snoRNP, um complexo nucleolar formado por uma pequena molécula de RNA (U3 snoRNA) e dezenas de proteínas (como Imp4p, Imp3p, Mpp10, dentre outras) (Lee e Baserga, 1999; Dragon *et al.*, 2002). Esse complexo direciona e promove a clivagem da molécula precursora de rRNA (denominada pré-rRNA) em rRNA18S, durante o processo de formação da subunidade pequena do ribossomo (Hughes e Ares, 1991; Kass *et al.*, 1990; Savino e Gerbi, 1990). Em *S. cerevisiae*, a proteína Imp4p mostrou-se necessária à atividade do complexo U3 snoRNP, durante as etapas de clivagem do pré-rRNA nos sítios A0, A1 e A2 (Lee e Baserga, 1999). Um evento essencial durante o processamento do pré-rRNA é a hibridização que ocorre entre esta molécula precursora e o U3 snoRNA, formando RNA de dupla fita. A dupla fita de RNA direciona os locais corretos de clivagem do RNA precursor. Acredita-se que a proteína Imp4p atue na estabilização da interação entre as moléculas de RNA (Gerczei e Correll, 2003). As proteínas IMP4 apresentam um domínio conservado em sua porção C-terminal, envolvido na biogênese de RNA (Wehner e Baserga, 2002).

O gene *IMP4* é altamente conservado entre diferentes eucariotos como *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Arabidopsis thaliana* e, em todos estes organismos, *IMP4* apresenta papel conservado no metabolismo de RNA. Nossos dados sugeriam, no entanto, que o gene *IMP4* de *S. mansoni* estivesse também envolvido no reparo/tolerância a danos no DNA causados por MMS, uma vez que complementou parcialmente bactérias hipersensíveis a MMS

Para confirmar o envolvimento de *IMP4* de *S. mansoni* no reparo de DNA, realizamos ensaios de complementação funcional em leveduras deficientes nesse gene. O sistema de complementação funcional em leveduras é utilizado para verificar se proteínas de organismos diferentes estão envolvidas no mesmo processo biológico, possuindo a mesma função. Para isso é necessário fazer a disruptura do gene alvo da levedura, transformá-la com o cDNA codificador da proteína de interesse, possivelmente homóloga, e posteriormente verificar a reativação da função defectiva.

Para a construção de uma linhagem de leveduras deficientes em *IMP4* (linhagem CRIMP4), interrompemos o gene *ScImp4* através da inserção de um cassete *HIS3*, que confere prototrofia para o aminoácido histidina e, assim, permite a seleção das leveduras modificadas. Embora a deleção completa do gene *ScIMP4* não seja possível, uma vez que é letal em leveduras (Lee e Baserga, 1999), fomos capazes de obter uma linhagem deficiente em *IMP4*, construindo um gene *ScIMP4* truncado. O sequenciamento do gene *ScIMP4* na linhagem mutante mostrou ser possível a expressão de duas proteínas truncadas na levedura CRIMP4: uma proteína menor, contendo 86 resíduos N-terminais de *Imp4p* e outra maior, híbrida, contendo 112 aminoácidos de *DED1* e 204 aminoácidos C-terminais de *Imp4p*, incluindo aqueles conservados, que participam da biogênese de RNA (Wehner e Baserga, 2002). De fato, experimentos de RT-PCR comprovaram a expressão do fragmento híbrido na levedura mutante, o qual parece ser suficiente para

assegurar a sobrevivência das células, uma vez que a proteína Imp4p é essencial a leveduras.

Análises fenotípicas da linhagem CRIMP4 deixaram dúvidas sobre o metabolismo de RNA nas células mutantes: se por um lado elas apresentam morfologia e brotamento normais, além de níveis de RNA 18S aparentemente inalterados, por outro lado apresentam crescimento retardado, quando comparadas à linhagem selvagem. Em relação ao metabolismo de DNA, as células não apresentaram modificações detectáveis quanto à sensibilidade à hidroxiuréia (HU) ou à luz UV. Por outro lado, apresentaram sensibilidade acentuada a MMS, o que sugere que o gene *IMP4* de *S. cerevisiae* também participe do reparo ou tolerância a lesões causadas por esse agente alquilante no DNA.

Para determinar se o gene *IMP4* de *S. mansoni* seria capaz de complementar os fenótipos mutantes de CRIMP4, esta linhagem foi transformada com o vetor pYEDP carregando o gene do parasita (pYSmIMP4). O fragmento clonado em pYEDP é expresso quando a levedura transformada é crescida em meio contendo galactose como fonte de açúcar. Como controle positivo, foi utilizado o vetor pYScIMP4, contendo o gene *IMP4* de *S. cerevisiae*. Conforme esperado, a expressão do gene de *S. cerevisiae*, na presença de galactose, reverteu o crescimento lento e a sensibilidade acentuada a MMS das leveduras CRIMP4. Além disso, vimos que a expressão do gene de *S. mansoni* complementa parcialmente a sensibilidade das mutantes a essa droga. Esses dados reforçam a hipótese da participação do gene *IMP4* de *S. mansoni* e de *S. cerevisiae* no reparo ou tolerância a lesões causadas por MMS no DNA. Acreditamos que a maior eficiência de expressão de genes nativos em relação a genes exógenos seja o principal fator responsável pela complementação mais eficiente alcançada pelo gene *ScIMP4* em leveduras, em relação a gene heterólogo de *S. mansoni*.

É interessante notar que este não é o primeiro gene de *S. cerevisiae* envolvido com o metabolismo de RNA e DNA. O gene PRP19 codifica uma proteína associada ao spliceossomo, que também está envolvida no reparo/tolerância a lesões causadas por radiação UVC no DNA (Brendel *et al.*, 2003). No entanto, ainda não é claro como uma proteína de metabolismo de RNA pode estar associada ao reparo ou tolerância de lesões no DNA. Uma vez que o gene IMP4 de *S. mansoni* complementa bactérias deficientes em diferentes etapas do BER (remoção da base e atividade APendonucleásica), e a levedura mutante CRIMP4 apresenta sensibilidade a MMS mesmo na presença de todos os genes do BER, especulamos que esta proteína esteja envolvida na remoção do grupamento metil das bases lesionadas. A proteína MGMT, por exemplo, apresenta esta atividade, porém em um substrato diferente daquele reconhecido pelas 3-meA DNA glicosilases. Apesar disso, pretendemos investigar se o gene SmIMP4 é capaz de complementar bactérias deficientes em MGMT.

Já é conhecido o mecanismo de reparo de danos de metilação em *E. coli* pela enzima AlkB, um possível membro da família de dioxigenases ferro-dependentes, o qual consiste na desmetilação oxidativa de 3-metil citosina (3-meC) e 1-metil adenina (1-meA) presentes no DNA (Aas *et al.*, 2003; Begley and Samson, 2003). É interessante lembrar que a proteína AlkB também atua na desmetilação de RNA. Apesar de IMP4 não apresentar homologia com AlkB, o fato das duas enzimas participarem do metabolismo de RNA e reparo/tolerância de lesões de metilação é bastante sugestivo. Talvez estas proteínas (IMP4 e AlkB) apresentem um mecanismo catalítico que permita a desmetilação de DNA e RNA.

Em resumo, nesta etapa do nosso trabalho caracterizamos parcialmente um dos primeiros genes de reparo ou tolerância a lesões no DNA de *S. mansoni* e mostramos sua

homologia a genes *IMP4* de diferentes organismos. Apesar de a proteína IMP4 ser conhecida por seu papel no metabolismo de RNA, sugerimos que ela esteja também envolvida, ao menos em *S. cerevisiae* e *S. mansoni*, no reparo ou tolerância a lesões induzidas por MMS. A caracterização parcial do gene *IMP4* de *S. mansoni* resultou na publicação do manuscrito “*Schistosoma mansoni: the IMP4 gene is involved in DNA repair/tolerance after treatment with alkylating agent methyl methane sulfonate*” na revista *Experimental Parasitology* (Furtado *et al.*, 2007) (Anexo 6).

Com a conclusão dos trabalhos com o gene *SmIMP4* e a publicação de um artigo sobre seu papel na tolerância a MMS em *S. mansoni*, em uma segunda etapa deste trabalho focalizamos o estudo do reparo de DNA em *T. cruzi* e de sua possível influência sobre a taxa de mutação e geração de variabilidade na espécie.

Nosso estudo acerca do reparo de DNA em *T. cruzi* foi iniciado com caracterização do gene *TcMSH2*, principal componente da via de reparo de erros de pareamento (MMR) em eucariotos (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). A escolha dessa via como alvo inicial na busca por fatores associados à geração de variabilidade genética em *T. cruzi* foi devida ao papel conservado do MMR na promoção de estabilidade genômica em diferentes organismos. A fidelidade genômica é promovida pelo MMR através da correção de erros de pareamento e alças de inserção e deleção, surgidos durante a replicação de DNA, assim como o reparo de *heteroduplexes* que surgem durante a recombinação (revisado por Schofield & Hsieh, 2003). De fato, a inativação do MMR parece ser o maior responsável pelo aumento de variabilidade genética em bactérias (Tenailon *et al.*, 2001; LeClerc *et al.*, 1996). Células deficientes nessa via apresentam um fenótipo mutador, caracterizado por elevadas taxas de mutação espontânea (Drotschmann *et al.*, 1999;

Drotschmann *et al.*, 2000), e frequentemente exibem instabilidade de microssatélites em repetições de mono- e dinucleotídeos (Boland *et al.*, 1998).

Os estudos iniciais com *TcMSH2* de diferentes cepas de *T. cruzi* revelaram a existência de três isoformas (A, B e C) dessa proteína na espécie (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Algumas evidências nos levaram a sugerir que existam pequenas diferenças funcionais entre as isoformas de MSH2 em *T. cruzi* e que tais diferenças seriam refletidas em variações na eficiência do MMR nas diferentes cepas do parasito e, conseqüentemente, nos níveis de variabilidade genética entre elas (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006; Machado-Silva *et al.*, 2008): (i) existem pequenas divergências na sequência de aminoácidos entre as isoformas analisadas de *TcMSH2*; algumas das substituições estão presentes em importantes domínios funcionais da proteína, como os responsáveis pela ligação ao *mismatch* e pela atividade ATPásica (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado-Silva, 2008); (ii) cada isoforma (A, B ou C) é codificada por genes presentes em uma das três linhagens principais de *T. cruzi* (I, III e II, respectivamente) (Figura 10); (iii) o nível de variabilidade genética difere entre as três linhagens, sendo menor nas linhagens *T. cruzi* I, que apresentam *TcMSH2* do tipo A (Buscaglia e DiNoia, 2003; Mathieu-Daude *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008) e (iv) foi observada instabilidade de microssatélites após estresse oxidativo somente em cepas que codificam as isoformas B ou C de *TcMSH2*, presentes nas linhagens de *T. cruzi* com maior variabilidade genética ou em linhagens nocautes (*TbMsh2*<sup>-/-</sup>) de *Trypanosoma brucei* complementadas com um alelo de *T. cruzi* (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado-Silva *et al.*, 2008).

Dessa forma, as evidências apontavam uma maior estabilidade genética em linhagens que codificavam a isoforma A de *TcMSH2*. É interessante ressaltar que linhagens *T. cruzi* II, que apresentam a isoforma C de *TcMSH2*, são responsáveis pelos

casos crônicos da Doença de Chagas no Brasil e em outros países do cone sul (Fernandes *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2005). O homem é um hospedeiro relativamente recente para o *T. cruzi* e a maior variabilidade genética em linhagens do grupo II poderia ser um dos fatores responsáveis pela adaptação dessas cepas ao ciclo doméstico do parasita.

Ensaio posteriores reforçaram a hipótese de que linhagens de *T. cruzi* I (TcMSH2A) apresentariam um MMR mais eficiente, em relação a linhagens de *T. cruzi* II, quando mostraram que: (i) a proteína TcMSH2A recombinante apresenta maior eficiência de atividade ATPásica, quando comparada a TcMSH2C recombinante e (ii) cepas que codificam a isoforma A são mais sensíveis a cisplatina ou MNNG. Nesses ensaios, utilizamos nas análises *in vivo* a cepa JG e o clone Esmeraldo cl3, ambos da linhagem *T. cruzi* II, além dos clones Col1.7G2, da cepa Colombiana, e Silvio X10 cl1, da linhagem *T. cruzi* I (Figura 12) (Campos *et al.*, artigo em preparação). Nas análises *in vitro*, utilizamos as proteínas recombinantes TcMSH2 isoformas A e C produzidas em nosso laboratório (Campos *et al.*, artigo em preparação). A isoforma B não foi utilizada uma vez que não foram detectadas variações na resposta a agentes genotóxicos entre os haplogrupos B e C (*T. cruzi* II) (Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

As diferenças observadas *in vitro* entre a atividade ATPásica das isoformas A e C de TcMSH2 confirmam a importância das substituições de aminoácidos detectadas anteriormente entre essas proteínas (Machado Silva, 2008). Ainda que substituições não tenham sido encontradas em domínios descritos como necessários para atividade ATPásica, os resultados *in vitro* não destoam daqueles obtidos pela comparação de sequências: devemos ter em mente que a estrutura de MSH2 é complexa, compreendendo seis domínios, com diferentes funções, onde se encontram sítios de ligação a DNA, ATP, ADP e Mg<sup>+2</sup>. Tais domínios interagem entre si e entre outros seis domínios da segunda

proteína homóloga a MutS que compõe o dímero funcional, modulando a função deste no MMR (Wang e Qin, 2003; Salsbury *et al.*, 2006; Jun *et al.*, 2006). Sendo assim, alterações estruturais na proteína ou em sítios responsáveis pela interação entre os domínios ou entre os monômeros poderiam modificar outras funções da proteína, como ligação a ATP/ADP, hidrólise de ATP, reconhecimento de *mismatches*, dentre outras.

A cisplatina ou cis-Diamminedichloroplatinum (II) é uma droga amplamente utilizada como agente quimioterápico devido à sua citotoxicidade. Essa droga age principalmente através da formação de adutos no DNA genômico, especialmente em guaninas adjacentes (Jamieson & Lippard, 1999; Ramachandran *et al.*, 2009). Os adutos causam paradas na replicação, ativação de *checkpoints* de ciclo celular com parada prolongada em G<sub>2</sub> e, em casos de danos severos, morte celular (revisado por O'Brien & Brown, 2006; Ramachandran *et al.*, 2009). Diversos trabalhos associam a citotoxicidade da cisplatina ao funcionamento correto do sistema de reparo de erros de pareamento, uma vez que várias proteínas desta via reconhecem, diretamente ou através de interações proteína-proteína, as distorções no DNA causadas pela droga e, ao invés de repará-las, sinalizam para a ativação de respostas citotóxicas (revisado por Kartalou & Essigmann, 2001, O'Brien & Brown, 2006 e Martin *et al.*, 2008). Estudos mostram que a deficiência no MMR aumenta em até quatro vezes a resistência à cisplatina (Fink *et al.*, 1996; Papouli *et al.*, 2004). Além da ausência do efeito citotóxico agudo, a perda ou deficiência do MMR causa aumento dos processos de síntese translesão e recombinação após exposições sucessivas a cisplatina, o que resulta em resistência secundária (ou adquirida) à droga (Ramachandran *et al.*, 2009). De modo inverso, a tolerância à cisplatina pode ser associada à deficiência em mecanismos de reparo de DNA, em especial, à deficiência no MMR.



Outro fenótipo que pode ser associado à deficiência no MMR é a tolerância ao agente alquilante MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina). O MNNG causa metilação na posição O<sup>6</sup> de guaninas, gerando a lesão O<sup>6</sup>-metilguanina (ou O<sup>6</sup>-meG), altamente mutagênica por formar pareamento com timina. A lesão pode ser inativada pela enzima O<sup>6</sup>-meG metiltransferase (MGMT), em uma reação onde essa enzima é consumida. No entanto, quando acumulada no DNA, a O<sup>6</sup>-meG torna-se citotóxica, e essa toxicidade é mediada pelo MMR. A observação de que células deficientes em MMR eram tolerantes a MNNG (Branch *et al.*, 1993; Kat *et al.*, 1993) instigou a realização de estudos que mostraram que o complexo MutS $\alpha$  reconhece O<sup>6</sup>-meG, principalmente quando pareada a timina, e induz parada de ciclo celular em G2 e eventual morte celular em células proficientes em MMR (revisado por Karran, 2001, O'Brien & Brown, 2006 e Casorelli *et al.*, 2008). Esse efeito possivelmente ocorre após tentativas de reparo repetidas ou aberrantes, que acabam criando quebras no DNA e bloqueio na replicação. Relatos na literatura indicam que até mesmo pequenas alterações nos níveis de proteínas do MMR, insuficientes para causar instabilidade de microsatélites, modificam a sensibilidade das células a drogas alquilantes (Shin & Park, 2000; Marra *et al.*, 2001; Claij & Te Riele, 2002; Elez *et al.*, 2007), o que justifica o uso do MNNG neste trabalho.

Para verificarmos se as diferenças observadas entre as cepas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II nos ensaios com cisplatina e MNNG foram realmente devidas a diferenças na eficiência do MMR, analisamos a sensibilidade dos clones a essas drogas na presença de um inibidor específico dessa via de reparo, o cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>). O cádmio, um conhecido carcinógeno humano, quando presente em baixas concentrações (na ordem de micromolares), é um inibidor específico da via de reparo de erros de pareamento em leveduras e em extratos de células humanas (Jin *et al.*, 2003), e esse efeito também foi visto em linhagens celulares derivadas de fibrosarcoma humano (Slebos *et al.*, 2006). Em

altas concentrações, é também inibidor de outras vias de reparo, como BER e NER, possivelmente por deslocamento de íons zinco nos motivos “dedos de zinco” de proteínas como *fpg*, OGG1, XPA e PARP (revisado por Hartwig e Schwerdtle, 2002 e Beyersmann e Hartwig, 2008). Além disso, altos níveis intracelulares deste metal causam um aumento nas espécies reativas de oxigênios (ROS) através da inibição de enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase (Stohs *et al*, 2001; Valko *et al*, 2006). O mecanismo através do qual baixas concentrações de cádmio inibem especificamente o MMR ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, estudos sugerem que o efeito do cádmio ocorra por inibição da ligação e hidrólise de ATP pelos complexos MSH2/MSH3 e MSH2/MSH6 (Clark e Kunkel, 2004; Banerjee e Flores-Rozas, 2005). A quebra do ATP é essencial à atividade dos homólogos de MutS e parece estar associada ao deslocamento do complexo pela fita de DNA, reconhecimento dos *mismatches* e alças de fita simples e recrutamento do restante das proteínas da via, que darão prosseguimento ao reparo (Blackwell *et al*, 1998; Drotschmann *et al*, 2002; Antony e Hingorani, 2003).

Nosso grupo mostrou que a atividade ATPásica de TcMSH2 é praticamente abolida por baixas concentrações de cádmio (10 $\mu$ M) (Machado-Silva, 2008), assim como ocorre em *S. cerevisiae* (Clark e Kunkel, 2004; Banerjee e Flores-Rozas, 2005). Essa quantidade do metal é normalmente insuficiente para gerar algum efeito na atividade de proteínas do BER e NER sabidamente inibidas por cádmio (revisado por Hartwig e Schwerdtle, 2002). Estudos relatam que são necessárias doses de cádmio a partir de 100  $\mu$ M para que ocorra inibição de tais proteínas (Hartwig e Schwerdtle, 2002). Dessa forma, culturas dos clones Silvio e Esmeraldo foram tratadas com cisplatina ou MNNG, na presença ou ausência de 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> e tiveram sua sobrevivência avaliada após um período apropriado de crescimento (a dose de 3  $\mu$ M foi escolhida porque não alterava o crescimento dos clones). Vimos que a sensibilidade de uma população de Silvio ao

tratamento com cisplatina ou MNNG é diminuída na presença de cloreto de cádmio, tornando-se semelhante à de Esmeraldo, que é naturalmente mais tolerante à droga. Estes resultados sugerem que a maior tolerância apresentada por JG e Esmeraldo é possivelmente consequência de um MMR menos eficiente em relação a Silvio e Colombiana e reforçam a hipótese de que as pequenas diferenças funcionais entre isoformas de TcMSH2 interferem na eficiência do reparo de erros de pareamento entre linhagens divergentes de *T. cruzi*. Sugerimos que cepas do grupo I (TcMSH2A) apresentem um reparo mais eficiente sob estresse, enquanto cepas do grupo II (TcMSH2C) apresentem um reparo menos eficiente sob condições de estresse, e que isto possa ser um dos fatores responsáveis pela maior geração de variabilidade nestas linhagens.

É importante esclarecer, no entanto, que outros fatores que não TcMSH2 possam estar envolvidos em variações na eficiência do MMR em *T. cruzi*. Todas as outras proteínas que participam na via de MMR podem estar contribuindo, separadamente ou em conjunto, para o MMR diferencial entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II/III, através de variações funcionais ou alteração nos níveis de expressão. Já é descrito que a redução na expressão de MSH2 resulta em menor eficiência de MMR em células humanas sob condições de estresse (Claij e Te Riele, 2002). Resultados obtidos por nosso grupo indicam que os níveis de expressão do RNA de TcMSH2 são similares em cepas pertencentes aos diferentes grupos de *T. cruzi* (P. C. Campos, dados não publicados). No entanto, não sabemos se essa similaridade é mantida em níveis protéicos. Em vista disto, pretendemos obter anticorpos para essa proteína e determinar os níveis de sua expressão nas diferentes cepas, além de sua localização.

Outra abordagem interessante seria a avaliação do MMR *in vitro* utilizando extratos celulares de diferentes cepas de *T. cruzi*. Nesses ensaios, seriam utilizados

plasmídeos contendo um erro de pareamento em uma sequência alvo de determinada enzima de restrição. A correção da base mal pareada permitiria a clivagem pela enzima, o que poderia ser quantificado, permitindo a comparação do MMR entre cepas (Humbert *et al.*, 1999).

Uma possibilidade que deve ser levada em consideração para tentar explicar a diferença de MMR entre as linhagens de *T. cruzi* é o recrutamento de proteínas do MMR para outras vias de reparo de DNA. É importante ressaltar que tais vias não ocorrem separadamente: cada vez mais, estudos indicam haver sobreposição entre elas, com algumas proteínas chave fazendo a conexão. Como mencionado anteriormente, MSH2 é uma proteína que atua em contextos diversos. Particularmente, em *T. cruzi* MSH2 está diretamente envolvida na resposta ao dano oxidativo (Machado-Silva *et al.*, 2008), principal dano sofrido pelo parasito durante seu ciclo de vida. Dados obtidos por nosso grupo, através de complementação heteróloga de *T. brucei* MSH2 *-/-*, indicam que TcMSH2 participa da resposta a danos causados por peróxido de hidrogênio, de maneira independente do MMR (Machado-Silva *et al.*, 2008). Dessa forma, o nível basal de lesões oxidativas nas diferentes cepas, em condições normais ou sob estresse, poderia comprometer a eficiência do MMR.

Portanto, além de investigar fenótipos associados ao MMR e a atividade de TcMSH2, uma grande variedade de proteínas envolvidas nas diversas vias de reparo de DNA, assim como as condições de estresse a que o parasita é submetido ao longo do ciclo de vida, devem ser considerados no estudo da geração de variabilidade genética em *T. cruzi*. De fato, a diversidade genética de um organismo pode ser influenciada pela exposição a agentes mutagênicos e por sua habilidade em bloqueá-los ou em neutralizar os danos causados por eles.

A principal ameaça à estabilidade genômica sofrida pelo *T. cruzi* ao longo de seu ciclo de vida são os danos oxidativos no DNA, causados pela exposição a espécies reativas de oxigênio, produzidas durante o processo de respiração celular ou pelo sistema imune do hospedeiro. O sequenciamento completo do genoma de *T. cruzi* indicou que esta espécie apresenta homólogos das principais proteínas do BER, a principal via responsável pela remoção de lesões oxidativas no DNA (El-Sayed *et al.*, 2005). Um trabalho anterior havia indicado que tripanosomatídeos apresentam um BER funcional, com características conservadas entre outros organismos (Ulbert *et al.*, 2004). Alguns genes dessa via, como a DNA Polimerase  $\beta$  e a DNA glicosilase UNG, foram recentemente clonados e caracterizados (Peña-Díaz *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2008).

Dentre os danos causados por estresse oxidativo, a lesão 8-oxoG destaca-se pela alta frequência no genoma de organismos aeróbicos e alto potencial mutagênico (revisado em Dizdaroglu *et al.*, 2002). Em procariotos e em vários eucariotos, o efeito mutagênico de 8-oxoG é controlado pelo sistema GO, constituído pelas enzimas Fpg, MutY, MutT, ou por seus homólogos eucarióticos OGG1, MYH e MTH (revisado por Nakabeppu *et al.*, 2004). O sequenciamento do genoma de *T. cruzi* indicou a presença de ortólogos de OGG1 e MYH no parasito, mas não de MTH (El-Sayed *et al.*, 2005).

Iniciamos a caracterização do ortólogo de OGG1 em *T. cruzi* através do estudo de um dos alelos desse gene, presente no clone CL Brener. O alelo estudado (TcOgg1A) apresenta 38 aminoácidos adicionais na extremidades N-terminal, em relação ao outro alelo (TcOgg1B), além de pequenas variações, que resultam em treze substituições de aminoácidos distribuídas ao longo da proteína. Este alelo foi clonado no vetor pMAL, de expressão induzível por IPTG em bactérias, para a realização de estudos de complementação funcional de linhagens bacterianas deficientes em Fpg. A inesperada

citotoxicidade resultante da expressão de TcOgg1A em bactérias selvagens (*fpg+*) ou mutantes (*fpg-*) impediu, no entanto, a realização dos ensaios de complementação.

Não existem relatos na literatura sobre citotoxicidade causada pela superexpressão de OGG1 (ou de qualquer homólogo funcional de Fpg) em bactérias. No entanto, a ocorrência de danos celulares causados pela superexpressão de outras DNA glicosilases em bactérias, leveduras e células de mamíferos já é bem descrita (Kaasen *et al.*, 1986, Ibeanu *et al.*, 1992; Coquerelle *et al.*, 1995; Glassner *et al.*, 1998; Berdal *et al.*, 1998; Posnick e Samson, 1999). Os fenótipos apresentados por células superexpressoras (mutagênese espontânea, baixa viabilidade celular e maior sensibilidade a agentes exógenos) foram atribuídos ao desequilíbrio na via de reparo por excisão de bases (revisado por Glassner *et al.*, 1998b). Quando o aumento da atividade glicosilásica/AP liásica não é acompanhado pelo aumento da atividade AP endonucleásica, lesões mutagênicas e citotóxicas, intermediárias do processo de reparo são produzidas, influenciando o modo como a célula responde a agentes exógenos e danos endógenos.

A remoção de bases modificadas por uma glicosilases é a primeira etapa do BER, via caracterizada pela ação sequencial de várias enzimas (revisado por Hegde *et al.*, 2008). Após a excisão da base, um sítio AP é formado no local. Sítios AP bloqueiam a replicação e a transcrição devendo, portanto, ser processados, o que pode ocorrer de duas formas: (i) por AP endonucleases, que clivam o DNA a 5' da lesão, gerando uma quebra de fita simples (SSB) com terminal 3'-OH, que será posteriormente preenchida por uma DNA polimerase e uma ligase ou (ii) pela atividade AP liásica de glicosilases bifuncionais, que clivam o DNA a 3' da lesão, gerando SSB com terminal 3' dRP, que bloqueia a síntese por DNA polimerases. O terminal dRP deve ser então ativado pela atividade 3'-fosfodiesterase de uma AP endonuclease para o subsequente reparo (revisado por Boiteux e Guillet, 2004).

Caso contrário, devido à consequente parada da forquilha de replicação, SSBs com terminais 3' bloqueados podem ainda ser convertidas em quebras de fita dupla (DSBs) (Caldecott *et al.*, 2001). Alternativamente, sítios AP podem ser reparados por recombinação ou ainda servir de molde para DNA polimerases de síntese translesão (TLS), em um processo propenso a erros (revisado por Boiteux e Guillet, 2004). Dessa forma, em circunstâncias onde exista disponibilidade de substrato (bases modificadas a serem reparadas), a desproporção entre as atividades de DNA glicosilases/AP liases e AP endonucleases pode ser bastante prejudicial à célula, por resultar em produção de sítios AP, SSBs com terminal bloqueados e DSBs, em níveis que excedem a capacidade de seu processamento.

Essa situação é claramente demonstrada pela superexpressão da glicosilase MAG1 (3 metil adenina DNA glicosilase) em leveduras e bactérias, que resulta em acentuado fenótipo mutador (Glassner *et al.*, 1998). Os autores encontraram evidências de que a mutagênese observada foi devida à excessiva formação de sítios AP nessas células, que gera aumento nos processos de síntese translesão. A superexpressão de MAG1 em leveduras deficientes em APN1 (responsável por mais de 95% da atividade AP endonucleásica nestes organismos) aumenta em até 300 vezes a taxa de mutação espontânea nessas células. Este aumento é de apenas 20 vezes na presença da APN1 e é praticamente abolido na ausência de REV1, uma DNA polimerase que participa da síntese translesão através de sítio AP. A inibição da síntese translesão nas células superexpressoras resulta, no entanto, em citotoxicidade. Esse fenótipo também é visto após tratamento com agentes alquilantes (quando as lesões específicas são abundantes), conforme esperado (Kaasen *et al.*, 1986; Coquerelle *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem que os efeitos do desequilíbrio do BER dependem da quantidade de intermediários formados e da capacidade da célula de lidar com tais intermediários: se a célula for capaz de tolerar a

extensão dos danos (através de síntese translesão ou recombinação, por exemplo), efeitos mutagênicos (leves ou acentuados) serão observados; se a célula for incapaz de lidar com o excesso de intermediários, o efeito será citotóxico. O efeito mutador em leveduras foi também observado após a superexpressão de glicosilases homólogas a MAG1, porém em uma escala bastante reduzida (Glassner *et al.*, 1998; Posnick e Samson, 1999). O efeito mutador mais pronunciado de MAG1 é devido à menor especificidade desta em relação a suas homólogas (Bessho, *et al.*, 1993; Krokan *et al.*, 1997; Berdal *et al.*, 1998). MAG1 atua sobre uma maior variedade de lesões, gerando maior quantidade de sítios AP (Posnick e Samson, 1999), e por isso seus níveis celulares devem ser cuidadosamente regulados. Fica evidente, portanto, que propriedades específicas de cada glicosilase (além da disponibilidade de substrato) irão determinar os efeitos de sua superexpressão nas células.

A superexpressão de OGG1 de outros organismos já foi descrita em bactérias, leveduras e células de mamíferos (van der Kempt *et al.*, 1996; Radicella *et al.*, 1997; Hollenbach *et al.*, 1999; García-Ortiz *et al.*, 2001; Vongsamphanh *et al.*, 2006; Dahle *et al.*, 2008), e não há relatos sobre efeitos citotóxicos resultantes dessa superexpressão, exceto em situações de estresse oxidativo intenso ou após irradiação, quando o excesso de substrato favorece a formação de SSBs e DSBs. (Hollenbach *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Éot-Houllier *et al.*, 2007). Conforme discutido anteriormente, a maior sensibilização a agentes exógenos é comum em células que superexpressam glicosilases (Kaasen *et al.*, 1986; Coquerelle *et al.*, 1995; Hollenbach *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Éot-Houllier *et al.*, 2007). De fato, uma cultura do clone CL Brener transfectada com o vetor pROCK\_Ogg1A, possivelmente superexpressando TcOgg1A, apresentou morte acentuada em condições de estresse oxidativo, quando comparada à cultura do clone selvagem. A morte acentuada da população transfectada quando submetida a estresse oxidativo pode ser explicada pelo processamento insuficiente do excesso de intermediários (sítios AP, SSBs



com terminais bloqueados e DSBs) gerado pelos altos níveis de TcOgg1A em uma situação onde o substrato não é limitante. O excesso de intermediários não é completamente reparado antes da fase S e bloqueia a replicação. Outros resultados gerados por nosso grupo indicam a ocorrência de lesões que bloqueiam a forquilha de replicação após estresse oxidativo em *T. cruzi*: células que superexpressam TcRAD51 (proteína recrutada para o reparo de tais lesões) são resistentes ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto células que possuem um alelo de RAD51 deletado (*TcRAD51 +/-*) são sensíveis ao mesmo tratamento (dados não publicados).

Em resumo, dados na literatura indicam que a citotoxicidade resultante da superexpressão de uma glicosilase depende, em menor grau, dos níveis da enzima e, em maior grau, da disponibilidade de substrato (Glassner *et al.*, 1998; Posnick e Samson, 1999). Dessa forma, o fenótipo observado após a superexpressão de TcOgg1A em bactérias sugere a existência de excesso de substrato, o que resultaria em excesso de intermediários citotóxicos. Uma vez que nossas células não foram submetidas a condições de estresse oxidativo, ou qualquer outro tratamento que resultasse em abundância de lesões normalmente reconhecidas por OGG1, sugerimos que TcOgg1A, ao menos em bactérias, apresente uma especificidade muito baixa, podendo inclusive excisar bases não lesionadas do DNA.

A suposta baixa especificidade de TcOgg1A em bactérias poderia ser explicada pela ausência de processamentos adicionais possivelmente sofridos pelo transcrito em seu ambiente nativo, que alterem a especificidade da proteína ou controlem sua atividade. A regulação da atividade de TcOgg1A poderia ainda ser feita através de modificações pós-traducionais da proteína, que não ocorreram no ambiente exógeno. Modificações pós-traducionais podem regular atividades catalíticas, alterar interações proteína-proteína,

direcionar proteínas a diferentes compartimentos celulares ou à degradação, apresentando, portanto, um papel central na homeostase celular. Várias enzimas do BER, como AP endonucleases, glicosilases e a DNA polimerase  $\beta$  sofrem modificações pós-traducionais que acentuam ou reduzem sua atividade (Bhakat *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2001; Bhakat *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2002). Especificamente, em relação a OGG1, modificações pós-traducionais e pós transcricionais já foram descritas. A fosforilação de serinas e tirosinas parece regular o endereçamento da proteína e também aumentar sua atividade glicosilásica (Dantzer *et celul al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005); a acetilação de lisinas diminui a afinidade de OGG1 a sítios AP (Bhakat *et al.*, 2006). Em humanos, variantes de OGG1 com diferentes funcionalidades e localizações celulares são decorrentes de *splicing* alternativo de um mesmo gene (revisado por Boiteux e Radicella, 1999, Hashiguchi *et al.*, 2004). Glassner e colaboradores (1998, 1998b) salientam que alterações na especificidade, localização, ou eficiência de glicosilases podem ser obtidas através de mudanças sutis na sequência ou no processamento da proteína, e ainda sugerem que este seria um possível mecanismo celular de modulação da taxa de mutação (geração de variabilidade genética). De fato, a mudança em apenas um aminoácido da glicosilase UDG de humanos é suficiente para alterar sua especificidade, fazendo com que ela remova timinas e citosinas do DNA, gerando acentuado fenótipo mutador (Kavli *et al.*, 1996).

É importante considerar, no entanto, a possibilidade de a inserção do alelo maior ser resultado de um erro de anotação. Essa sequência pode ser, na realidade, parte da região intergênica existente entre o alelo de TcOgg1A e o alelo posicionado logo acima deste. Duas observações reforçam essa hipótese: (i) a alta frequência de timinas na região da inserção e (ii) a existência de um domínio transmembrana na região, predito pelo programa TMHMM2.0 (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). A alta frequência de timinas (T) em regiões intergênicas em *T. cruzi* é perceptível através de

análises do banco de dados genômicos desse organismo ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) e foi analisada por Campos e colaboradores (2008). Além disso, já é descrita a presença de sequências regulatórias ricas em T (Hehl *et al.*, 1994) ou ricas em A e T (Di Noia *et al.*, 2000) em regiões 3`UTR de tripanosomatídeos. Já a localização transmembrana predita para a glicosilase é improvável, uma vez que a proteína de reparo deve ter livre acesso a molécula de DNA. Dessa forma, é possível que tenhamos clonado em pMAL um fragmento contendo o gene TcOgg1 acrescido de 114 nucleotídeos adicionais, o que resultou na expressão, em bactérias, da glicosilase TcOgg1 contendo, em sua porção N-terminal, 38 aminoácidos não pertencentes à proteína. A suposta região excedente poderia interferir na estrutura terciária da glicosilase, sendo então responsável por alterações em sua atividade, incluindo a perda de especificidade em bactérias. Apesar de termos clonado o mesmo fragmento em pROCK\_HIGRO, é possível que o processamento correto do transcrito tenha ocorrido em *T. cruzi*, o que justifica a ausência do efeito citotóxico decorrente da superexpressão neste organismo.

Estudos adicionais serão necessários para o esclarecimento da atividade de TcOgg1. Dentre eles, (i) a confirmação da superexpressão de TcOgg1A na população transfectada do clone CL Brener, através de Northern blot e/ou Western Blot; (ii) a verificação da presença da inserção N-terminal em TcOgg1A, através da amplificação por RT PCR e sequenciamento do mRNA maduro, utilizando um *primer forward* que se anele à sequência do Splice Leader, e um *primer reverse* interno a TcOgg1A; (iii) a confirmação da atividade glicosilásica de TcOgg1, através de ensaios *in vivo* de complementação de leveduras deficientes em OGG1 e/ou análises *in vitro* da proteína purificada, além de estudos com o outro alelo de TcOgg1 presente em CL Brener (TcOgg1B).

Os procedimentos relativos à expressão de TcOgg1A em leveduras *OGG1*- já foram iniciados. O fragmento de TcOgg1A foi amplificado, clonado no vetor pYEDP, de expressão indutível por galactose e a construção utilizada na transformação de leveduras *OGG1*- (dado não mostrado). Leveduras deficientes em *OGG1* apresentam altas taxas de mutação (Thomas *et al.*, 1996), e a expressão de ortólogos de OGG1 nessas células restaura o fenótipo selvagem. De modo interessante, testes preliminares indicam que a expressão do gene TcOgg1A de *T. cruzi* é viável em leveduras: clones recombinantes transformados com pYEDP\_TcOgg1A e selecionados por PCR de colônia foram cultivados na presença de galactose como única fonte de carbono e apresentaram crescimento aparentemente normal.

Continuamos a caracterização do sistema GO em *T. cruzi* com a busca por ortólogos de MutT nesse parasito. O sequenciamento do genoma completo de CL Brener indicou a ausência de ORFs com homologia predita à MutT, embora homólogos de MutY tenham sido identificados (Sayed *et al.*, 2005). A glicosilase MutY remove adeninas pareadas a 8-oxoG, introduzidas quando 8-oxoguaninas permanecem no DNA molde durante a replicação. Uma vez que desoxiguanosinas (dG) também sofrem oxidação quando presentes no pool de nucleotídeos e 8-oxo-dGTPs podem ser prontamente incorporados ao DNA por DNA polimerases (Maki e Sekiguchi, 1992), a atividade de MutY representa um problema em situações onde 8-oxo-dGTP é erroneamente introduzida frente à adenina no DNA molde, pois MutY remove a base correta, fixando a transversão AT→CG. Para minimizar este problema, MutT e seus homólogos (MTH1) hidrolisam 8-oxo-dGTPs a 8-oxo-dGMPs, prevenindo que sejam incorporados durante a replicação (Nakabeppu, 2001). A importância de MutT em organismos aeróbicos é evidenciada pela elevada frequência de mutações espontâneas apresentada por bactérias *mutT*-, nas quais as transversões GC→TA e AT→CG são até 50.000 vezes mais frequentes (Vidmar e

Cupples, 1993). De fato, a atividade de MutT parece ser essencial em organismos que dispõem da atividade de MutY (Nunoshiba *et al*, 2004).

A ausência de uma enzima apresentando atividade 8-oxo-dGTPásica em *T. cruzi* é improvável, uma vez que outros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* apresentam genes com homologia a *mutT* (confirmada experimentalmente ou predita por análise de sequências) e, principalmente, pelas elevadas taxas de mutação que ocorreriam em decorrência da ausência dessa atividade na presença de uma glicosilase homóloga a MutY. Dados gerados em nosso laboratório pela aluna Marianna Kunrath Lima indicam que o gene Tc00.1047053511803.20, cuja função de adenina glicosilase A:G-específica foi inicialmente predita por homologia de sequência, é um homólogo funcional de *mutY* (e foi então denominado TcMYH), sendo capaz de complementar bactérias mutantes deficientes nesse gene, reduzindo sua frequência de mutação.

Em *S. cerevisiae*, que não apresenta ortólogos de MTH ou MYH, a “limpeza” do *pool* de nucleotídeos é realizada pela proteína YLR151c (Nunoshiba *et al*, 2004). Esta hidrolase contém o domínio Nudix, curta sequência de aminoácidos conservada entre as enzimas MutT de *E. coli* e *Pseudomonas vulgaris*, e MTH1 humana, de camundongo e de rato (Bessman *et al*, 1996). Dessa forma, realizamos uma busca no banco de dados do genoma de *T. cruzi* por proteínas putativas contendo domínios Nudix. As duas ORFs selecionadas, denominadas Ndx1 e Ndx4, foram incapazes de complementar o fenótipo mutador de linhagens bacterianas deficientes em MutT e portanto, não são homólogas funcionais de *mutT*. O fenótipo mutador das linhagens bacterianas deficientes em MutT foi verificado através de ensaios de mutação em rifampicina.

Recentemente, analisando o banco de dados de genoma de *T. cruzi* encontramos um possível ortólogo de MTH, formado pela justaposição de duas sequências depositadas (Tc00.1047053510287.4 e Tc00.1047053506581.69). Essas ORFs codificam polipeptídeos que apresentam alta homologia com as regiões N- e C-terminal do ortólogo de MTH em *T. brucei*. O suposto alelo foi amplificado a partir do clone CL Brener e ensaios de complementação com bactérias *mutT*- estão sendo preparados.

A importância da atividade 8-oxo-dGTPásica em *T. cruzi* pôde ser evidenciada pela expressão heteróloga de *mutT* de *E. coli* no clone CL Brener. O gene *mutT* foi amplificado a partir de bactérias, clonado no vetor pROCK\_HIGRO, de expressão constitutiva em *T. cruzi*, e utilizado na transfecção do clone CL Brener. A linhagem transfectada do parasito, expressando o gene exógeno, apresenta maior resistência ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparada à cultura selvagem, além de apresentar menores níveis intracelulares de 8-oxoG após exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente no DNA mitocondrial, indicando maior controle da incorporação de nucleotídeos oxidados em células que expressam MutT e evidenciando a importância da hidrólise de 8-oxodGTP.

É importante ressaltar que o fenótipo apresentado pela cultura expressando *mutT* exógeno não exclui a presença de uma atividade *MutT-like* em *T. cruzi*. Estudos mostram que, apesar da ação de múltiplas enzimas e vias metabólicas no controle dos efeitos do estresse oxidativo, as defesas celulares podem eventualmente ser insuficientes em caso de estresse intenso, como o gerado pelo tratamento com água oxigenada (Rai *et al.*, 2008). Tais defesas poderiam, no entanto, ser amplificadas por altos níveis de expressão de um ou mais de seus agentes. Assim, a maior eficiência da resposta ao estresse oxidativo apresentada pela cultura transfectada poderia ser consequência dos altos níveis de expressão heteróloga de *mutT* em células previamente desprovidas de atividade 8-oxo-

dGTPásica ou, o que sugerimos como cenário mais provável, em células apresentando anteriormente níveis baixos desta atividade, porém suficientes em situações de ausência de estresse oxidativo. Além de não se opor à existência de um homólogo funcional à MutT em *T. cruzi*, este panorama justificaria a observação de que os parasitas superexpressando *mutT* apresentam crescimento semelhante à cultura selvagem em condições normais (dado não mostrado), mas apresentam crescimento favorecido em relação a essa em condições estresse oxidativo. Caso um homólogo de *mutT* seja identificado em *T. cruzi*, a superexpressão desse deverá ser realizada em CL Brener e a resposta da cultura superexpressora ao estresse oxidativo, analisada e comparada às das culturas selvagens e expressando *mutT* exógeno.

Situações de estresse oxidativo intenso são comuns ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. Suas formas tripomastigotas infectam e se multiplicam em macrófagos no hospedeiro vertebrado e a produção de ROS faz parte da estratégia microbicida destas células ao serem invadidos por microorganismos. A hipótese de que o *T. cruzi* apresente uma atividade pirofosfatásica 8-oxo-dGTP-específica ineficaz em situações de estresse oxidativo elevado nos conduz a dois possíveis cenários, que serão discutidos adiante.

No primeiro cenário, a “limpeza” ineficiente do *pool* de nucleotídeos da célula sob estresse oxidativo resultaria no aumento da incorporação da base oxidada em pareamentos incorretos e, conseqüentemente, aumento na frequência de transversões AT→CG e GC→TA, levando à instabilidade genômica. A maior geração de variabilidade poderia, sob alguns aspectos, contribuir para o sucesso da infecção. Um mecanismo semelhante foi descrito em *Helicobacter pylori* (Rosche e Foster, 1999; Kang *et al.*, 2006; Kuwahara *et al.*, 2009). Essas bactérias, quando submetidas a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (decorrentes da reação inflamatória no hospedeiro),

apresentam um aumento transiente em sua taxa de mutação, que resulta em maior frequência de mutantes mais adaptados ao meio (resistentes a drogas, por exemplo). Foi sugerido ainda que a presença no genoma de regiões mais susceptíveis a mutações direcione a variabilidade genética, reduzindo os efeitos deletérios do fenótipo hipermutador (Kang *et al.*, 2006). Em *T. cruzi*, uma situação análoga poderia, por exemplo, favorecer a geração de mutações em proteínas antigênicas, facilitando o escape ao sistema imune do hospedeiro. De fato, a instabilidade genética localizada é essencial ao sucesso da infecção por *T. brucei*, no qual a variação de antígenos de superfície (VSGs) é promovida constantemente por eventos de recombinação em regiões específicas do genoma (revisado por Zambrano-Villa *et al.*, 2002 e Machado *et al.*, 2006). A mutagênese por estresse oxidativo apresentaria enormes desvantagens, entretanto. Na maior parte das vezes, mutações têm efeitos deletérios ou neutros, e o “custo” das mutações (perda de *fitness* ou adaptabilidade) excede suas vantagens (Dawson, 1999; Tenailon *et al.*, 1999). Por isso, para sobreviver a situações de estresse, organismos devem alcançar um equilíbrio entre a geração de variabilidade e a manutenção da integridade genômica buscando minimizar a perda de capacidade adaptativa.

Levando em consideração as observações acima, sugerimos um segundo cenário: em *T. cruzi*, durante o estresse oxidativo, a permanência de elevados níveis de precursores oxidados no *pool* de nucleotídeos aumentaria a frequência de 8-oxoG no DNA (e várias evidências sugerem que esse aumento é ainda maior no cinetoplasto). Porém, diversos mecanismos compensatórios controlariam os efeitos mutagênicos desta lesão. Tal compensação poderia ser feita, por exemplo, por modulação da atividade das glicosilases do sistema GO, especificamente, o aumento da atividade de TcOgg1 (e das etapas subsequentes do BER), associado à diminuição da atividade de TcMYH. Conforme discutido anteriormente, tal modulação seria alcançada por alterações nos níveis



enzimáticos, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína. Glicosilases alternativas poderiam também contribuir para o reparo de 8-oxoG. Em *E. coli*, a glicosilase Nei (Endonuclease VIII) atua no reparo de lesões oxidativas (incluído 8-oxoG) em DNA de fita simples ou bolha, durante a transcrição e/ou replicação (revisado por Hazra *et al.*, 2007). Ortólogos de *Nei* (NEIL) estão presentes em mamíferos, fungos e plantas, mas ainda não foram descritos em *T. cruzi*. De modo interessante, através de uma rápida busca no banco de dados deste parasito, utilizando a ferramenta BLAST, encontramos uma proteína hipotética (Tc00.1047053506357.80) apresentando as principais conservações de NEIL. O papel sugerido de Nei na correção de lesões oxidativas em sequências recém-sintetizadas compensaria (ao menos parcialmente) uma baixa atividade de MutT.

O aumento nos processos de síntese translesão livre de erros através de 8-oxoG também poderia contrabalançar os altos níveis da base oxidada no DNA. A polimerase nuclear TcPol $\eta$  é capaz de incorporar nucleotídeo frente a 8-oxoG (de Moura *et al.*, 2009). Ao contrário das polimerases replicativas, Pol $\eta$  insere citosina, preferencialmente, frente a essa lesão (Haracska *et al.*, 2001). Também há indícios de que a polimerase mitocondrial TcPol $\kappa$ , que faz síntese de DNA através de 8-oxoG, o faça de forma livre de erros (Rajão *et al.*, 2009). De fato, clones de CL Brener superexpressando TcPol $\eta$  ou TcPol $\kappa$  são mais resistentes ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparados aos parasitos selvagens (de Moura *et al.*, 2009; Rajão *et al.*, 2009).

Alternativamente, o controle da mutagênese por 8-oxoG poderia ser alcançado através da atuação de proteínas de outras vias de reparo no reconhecimento e excisão da lesão ou correção do erro de pareamento. Já é conhecida a participação do TCR (reparo acoplado à transcrição) no reparo de 8-oxoG em sequências transcricionalmente ativas, em um processo independente de OGG1, envolvendo proteínas do NER, além de MSH2,

dentre outras (Le Page *et al.*, 2000; Le Page *et al.*, 2000a, Leadon e Avrutskaya, 1997; Lee *et al.*, 2004; Pitsikas *et al.*, 2007). O envolvimento de MSH2, mas não de MLH1, no TCR de danos oxidativos (Pitsikas *et al.*, 2007) é um dado interessante, uma vez que a participação de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo em *T. brucei* também mostrou-se independente de MLH1 (Machado-Silva *et al.*, 2008). O TCR é uma ramificação do NER, dependente de RNA polimerase II, caracterizada pelo reparo rápido da fita transcrita de genes ativos (revisado em Hanawalt e Spivak, 2008). Considerando que, em *T. cruzi*, genes que codificam proteínas estão dispostos em longas unidades policistrônicas constitutivamente transcritas (El Sayed *et al.*, 2005), o reparo acoplado à transcrição pode apresentar importante papel na estabilidade genômica do parasito (uma objeção é o fato de a transcrição em *T. cruzi* ser preferencialmente realizada por RNA polimerase I). O sequenciamento do genoma de *T. cruzi* indicou que este organismo apresenta várias das principais proteínas do NER (El Sayed *et al.*, 2005). Contudo, a caracterização experimental dessa via no parasito ainda é escassa, e novos estudos serão necessários para esclarecer a exata contribuição do TCR para o controle dos níveis de 8-oxoG no DNA.

Também já é conhecida a participação do MMR no reconhecimento e correção de erros de pareamento envolvendo 8-oxoG, desde bactérias até mamíferos, e este poderia ser outro mecanismo auxiliar na resposta ao estresse oxidativo (Ni *et al.*, 1999; Earley e Crouse, 1998; DeWeese, *et al.*, 1998, Wyrzykowski e Volkert, 2002, Boiteux *et al.*, 2002). O heterodímero de MSH2 e MSH6 (MutSa) reconhece os pares 8-oxoG:A, 8-oxoG:G e 8-oxoG:T e faz a excisão de 8-oxodGMP recém incorporado na fita filha, de modo dependente de MLH1 (Ni *et al.*, 1999, Colussi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006). Além disso, MutSa possivelmente estimula a excisão, por MYH, de adenina inserida frente a 8-oxoG (Gu *et al.*, 2002). Dessa forma, MMR oferece proteção suplementar contra o excesso de nucleotídeos oxidados no pool. De fato, células *msh2*- apresentam níveis aumentados de 8-

oxoG no DNA, antes ou após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Colussi *et al.*, 2002). Em conformidade, as altas taxas de mutação em células *msh2*- são atenuadas pela expressão de MTH1 (Russo *et al.*, 2004).

Sugerimos, portanto, que eventos mutacionais induzidos por estresse oxidativo sejam importante fonte de variabilidade genética em *T. cruzi*. A constante exposição a ROS ao longo do seu ciclo de vida exige, no entanto, que o parasito apresente estratégias que minimizem os danos celulares decorrentes dessa exposição. Sugerimos também que os efeitos mutagênicos do estresse oxidativo em *T. cruzi* sejam minimizados por uma colaboração entre o BER, o sistema GO e mecanismos auxiliares como síntese translesão, TCR e MMR.

O possível recrutamento de proteínas do MMR (principalmente de MSH2) para a resposta ao estresse oxidativo é de especial interesse neste trabalho. Caso o MMR (ou TcMSH2, isoladamente) esteja realmente envolvido na prevenção de danos celulares gerados por ROS em *T. cruzi*, a existência de variantes de TcMSH2 (que apresentam diferenças funcionais e ocasionam variações na eficiência do MMR), prevê diferenças na resposta ao estresse oxidativo entre linhagens que codificam diferentes isoformas dessa proteína.

Para investigar essa hipótese, Campos e colaboradores (artigo em preparação) analisaram a resposta de culturas das cepas JG, Esmeraldo, Silvio e Colombiana ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e observaram que, conforme antecipado, as cepas Silvio e Colombiana (*T. cruzi* I), que apresentam a isoforma A de TcMSH2, responderam melhor ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (maior sobrevivência na condição de estresse), quando comparadas às cepas que codificam a isoforma C dessa proteína (JG e Esmeraldo, *T. cruzi* II), sugerindo a participação de TcMSH2 na resposta ao estresse oxidativo.

Alem disso, analisamos a sensibilidade das quatro cepas ao composto INALa, que promove danos oxidativos no DNA, inclusive 8-oxoG (Rogers *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2006). Os resultados indicam que cepas de *T. cruzi* I (Silvio e Colombiana) são também mais resistentes ao tratamento INALa, o que está de acordo com os dados obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Realizamos ainda o mesmo ensaio com um clone de CL Brener que contém um dos alelos de TcMSH2 deletado (Campos *et al.*, artigo em preparação) e vimos que este é mais sensível aos danos causados por INALa, quando comparado a um clone selvagem.

Por análise indireta através da marcação com FITC-avidina, verificamos o conteúdo de 8-oxoG nas quatro cepas em estudo e mostramos que, após tratamento com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, existem diferenças nos níveis dessa lesão entre as cepas que codificam diferentes isoformas de TcMSH2: em cepas *T. cruzi* II os níveis totais de 8-oxoG são mais elevados, quando comparados aos de cepas *T. cruzi* I. Além disso, mostramos que os níveis de 8-oxoG no cinetoplasto nos clones *T. cruzi* II são maiores que os níveis da lesão no cinetoplasto dos clones *T. cruzi* I, antes ou após estresse oxidativo e que, após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os níveis de 8-oxoG aumentam apenas no cinetoplasto dos clones *T. cruzi* II. Esses dados indicam que os níveis de lesão no DNA mitocondrial de células do grupo I são controlados de modo mais eficiente. É possível que o controle dos níveis de 8-oxoG no cinetoplasto seja feito por uma suposta atividade mitocondrial de TcMSH2, provavelmente independente do MMR, uma vez que essa é uma via predominantemente nuclear em eucariotos. Eventualmente, as diferenças na intensidade dos danos oxidativos no DNA mitocondrial poderiam ser decorrentes de outras defesas antioxidantes das células, como a atividade de enzimas que inativam ROS ou que diminuem sua produção pela mitocôndria.

Por isso, investigamos se resposta diferencial ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentada pelas cepas foi devida a diferenças na capacidade celular de redução de

espécies reativas, potencialmente nocivas. De fato, a redução de superóxidos a  $H_2O_2$  (por superóxido dismutase, ou SOD) e destes a  $H_2O$  e  $O_2$  (por catalase e glutathione peroxidase) constitui a primeira linha de defesa celular contra ROS em eucariotos superiores (revisado por Slupphaug *et al.*, 2003; Alzate *et al.*, 2007). Dessas, apenas SOD está presente em tripanosomatídeos (El Sayed *et al.*, 2005). No entanto, estes possuem o sistema alternativo tripanotioana/tripanotiona redutase, essencial à manutenção de um ambiente redutor intracelular, que atua na detoxificação de hidroperóxidos (revisado em Schmidt e Krauth Siegel *et al.*, 2002). Além disso, possuem oxidases alternativas no fim da cadeia transportadora de elétrons, que previnem a produção de ROS, reduzindo oxigênio a água (revisado em Chaudhuri *et al.*, 2006). Para verificar se a capacidade redutora das cepas Silvio e Colombiana foi o principal fator responsável pela maior sobrevivência das mesmas após estresse oxidativo e pelos menores níveis de lesões em seu DNA mitocondrial, avaliamos a eficiência destas quatro cepas em reduzir o composto MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol brometo]. Este composto é convertido por enzimas da cadeia respiratória no composto insolúvel formazan, um sal de cor violeta cuja formação pode ser medida por espectrometria. Nossos resultados indicam que os clones de *T. cruzi* I (Colombiana e Silvio) não apresentam maior capacidade redutora do que os clones de *T. cruzi* II (JG e Esmeraldo), sugerindo, portanto, que a diferença observada entre as cepas após tratamento com  $H_2O_2$  não foi principalmente devida a diferenças existentes entre o arsenal de enzimas detoxificantes das células.

A hipótese da existência de uma atividade mitocondrial de TcMSH2, que atue no controle dos níveis de 8-oxoG no cinetoplasto é reforçada pelo já referido papel de TcMSH2, de maneira independente de MHL1, na resposta ao estresse oxidativo em um sistema heterólogo (*T. brucei*) (Machado-Silva *et al.*, 2008). Essa resposta mostrou-se independente do MMR, uma vez que linhagens deficientes em MLH1 (*TbMlh1 -/-*), ao

contrário de linhagens *TbMsh2* *-/-*, não apresentaram sensibilidade acentuada a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparadas às células selvagens (Machado-Silva *et al.*, 2008). Foi sugerido que, em *T. cruzi*, TcMSH2 apresente atividade semelhante a MSH1, homólogo mitocondrial de MutS bacteriana, presente apenas em leveduras. Leveduras também não possuem catalase, e apresentam uma via mitocondrial de reparo, dependente de MSH1, acessória ao BER na correção de danos oxidativos (Dzierzbicki *et al.*, 2004). A grande maioria dos eucariotos perdeu MSH1 ao longo da evolução, porém, devido à importância do cinetoplasto em tripanosomatídeos, o MSH2 nestes organismos pode estar suprimindo a falta da enzima mitocondrial. Em conformidade, dados preliminares em *T. brucei* demonstram que, após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, células *MHS2* *-/-* apresentam considerável perda de DNA mitocondrial (Richard McCulloch, comunicação pessoal).

Para verificar se a contribuição do TcMSH2 no controle do danos oxidativos é realmente independente do MMR, como sugerido por nossos dados, foi avaliada a resposta das cepas Silvio e Esmeraldo ao tratamento com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na presença de cádmio, metal inibidor de MMR, assim como procedido com cisplatina e MNNG. De modo interessante, 48 horas após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é observada diferença entre a sobrevivência das cepas, mesmo na presença de 10 µM de CdCl<sub>2</sub>, sugerindo que a inibição do MMR não afetou a eficiência da resposta celular ao estresse oxidativo. Considerando que o cádmio interfere na atividade ATPásica dos complexos MutSα (MSH2-MSH6) e MutSβ (MSH2-MSH3), é possível supor que (i) estes heterodímeros não atuem na mitocôndria ou que (ii) a hidrólise de ATP (ou qualquer outra atividade alvo do cádmio) não é fator determinante no papel de TcMSH2 frente às lesões oxidativas mitocondriais. A segunda proposição é reforçada pelo trabalho de Mookerjee e colaboradores (2005), que mostra que MSH1 apresenta funções adicionais (e essenciais) na mitocôndria que não são abolidas por mutações de ponto em *msh1* que sabidamente inabilitam o MMR.

Em tripanosomatídeos, a existência de uma mitocôndria única demanda proteção especial do genoma mitocondrial contra lesões e mutações. De fato, diversos dados obtidos por nosso grupo indicam a ocorrência, em *T. cruzi*, de uma angariação de forças para o cinetoplasto, relacionadas, especialmente, ao combate a danos oxidativos no kDNA (Machado-Silva *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2008; Rajão *et al.*, 2009). Diversas proteínas, de diferentes vias de reparo ou síntese translesão, mostraram possuir em *T. cruzi* função ou localização mitocondrial incomuns, algumas delas descritas pela primeira vez. Curiosamente, tais proteínas parecem estar todas envolvidas, de alguma maneira, na resposta a estresse oxidativo, o que é bastante conveniente, uma vez que o DNA mitocondrial é mais susceptível a danos oxidativos pela proximidade à cadeia respiratória (Richter *et al.*, 1988). Em conformidade, o ensaio de marcação de 8-oxoG em CL Brener selvagem indicou a presença de maiores níveis dessa lesão no cinetoplasto das células, em relação ao núcleo.

Juntos, nossos dados nos permitem sugerir que, em *T. cruzi*, MSH2 esteja especialmente comprometida com o reparo de lesões oxidativas, principalmente na mitocôndria. De fato, a deleção de um dos alelos de *TcMSH2* em CL Brener causou hipersensibilidade das células ao estresse oxidativo, mas não foi suficiente para alterar a resposta destas frente a cisplatina (P.C. Campos *et al.*, artigo em preparação). Sugerimos ainda que essa atividade seja indispensável à integridade do kDNA em *T. cruzi*, o que justificaria as diversas tentativas fracassadas de se obter células *TcMSH2*<sup>-/-</sup>, indicando que nesse organismo, de modo incomum, a proteína MSH2 seja essencial (P. C. Campos *et al.*, artigo em preparação). Além disso, destacamos que o recrutamento da *TcMSH2* para a resposta ao estresse oxidativo possivelmente comprometa funções do MMR ou de MSH2, como o reparo de erros de replicação, promoção de vias de morte ou parada de ciclo celular e regulação de eventos de recombinação. Dessa forma, é possível que a menor

eficiência de MMR aparentemente apresentada por cepas de *T. cruzi* II seja decorrente do maior sequestro de TcMSH2 para o cinetoplasto, em resposta aos altos níveis de lesões oxidativas lá presentes (as quais parecem ser menos abundantes em cepas do grupo I, antes ou após estresse oxidativo). Imaginamos que a maior eficiência de TcMSH2A contribua para os menores níveis de 8-oxoG no kDNA em cepas do grupo I, o que demandaria menores quantidades da enzima na mitocôndria.

A alta variabilidade genética encontrada em *T. cruzi* seria resultante de taxas de mutação especialmente altas nesta espécie? Seriam as taxas de mutação diferentes entre as três linhagens principais de *T. cruzi*, uma vez que obtivemos evidências de que haveria diferenças na eficiência do MMR entre as cepas? Qual a importância do estresse oxidativo na mutagênese em *T. cruzi*? Essas questões poderiam ser investigadas de maneira mais direta ou até mesmo esclarecidas se pudessemos medir a taxa de mutação em diferentes cepas desta espécie, em linhagens geneticamente modificadas, deficientes em vias ou de reparo, linhagens superexpressoras de proteínas de reparo, sob condições normais ou de estresse oxidativo. Diversos sistemas *in vivo* ou *in vitro* de detecção de eventos mutacionais permitem determinar a taxa de mutação em diferentes organismos e linhagens celulares, aumentando a compreensão acerca de eventos moleculares envolvidos na mutagênese (revisado por Baer *et al.*, 2007). No entanto, ainda não há descrito na literatura um método que permita avaliar a taxa de mutação em *T. cruzi*.

Ensaio de mutação com genes repórteres em bactérias e leveduras valem-se da capacidade destes organismos de formar colônias em meio sólido. Tais ensaios avaliam a ocorrência de mutações em genes específicos, as quais podem conferir à célula mutante algum fenótipo que a diferencie visualmente das demais (mudança de cor da colônia na presença de substância indicadora, por exemplo), ou ainda oferecer à célula mutante



alguma vantagem seletiva (resistência a antibiótico, prototrofia, etc) que a possibilite crescer em um ambiente específico. Dessa forma, mutantes existentes em uma população são detectados em meio sólido, permitindo o cálculo da taxa de mutação por diferentes métodos (Von Borstel 1978; Luria e Delbruck, 1943). Apesar de terem sido descritos há mais de 20 anos, os procedimentos de clonagem de *T. cruzi* em meio semi-sólido (Goldberg e Chiari, 1980) tem como limitação a baixa eficiência de crescimento e formação de colônias em meio sólido, o que dificulta a realização de ensaios para determinação da taxa de mutação. O nosso laboratório tem procurado aperfeiçoar o procedimento para obtenção de colônias de *T. cruzi* isoladas e bem definidas após espalhamento das células em meio ágar sangue semi-sólido (constituído de LIT completo, antibióticos, sangue desfibrinado e agarose *low melting*) e incubação a 28 °C por cerca de 40 dias. Dessa forma, elaboramos uma metodologia para análise da frequência de mutação em *T. cruzi*, baseada na reversão de uma mutação presente no gene *neo*, inserido no genoma do parasita.

O gene *neo* codifica a proteína APH (aminoglicosídeo 3` fosfotransferase), contendo 267 aminoácidos, que confere à célula resistência a diferentes antibióticos. Introduzimos uma mutação de ponto na quarta base do gene *neo*, gerando um códon de parada precoce em sua fase correta de leitura. Como consequência, o gene mutado (*neostop*) codifica uma proteína truncada, contendo apenas 150 aminoácidos. A expressão do gene *neo* em bactérias as tornou capazes de crescer em meio sólido contendo kanamicina. No entanto, a expressão de *neostop* não foi capaz de conferir resistência à kanamicina a essas células, indicando que a proteína truncada não é funcional. O gene *neostop* foi integrado ao genoma do clone CL Brener, através da recombinação homóloga veiculada pelo vetor pROCK\_*neostop*.

Inicialmente, confirmamos a presença do gene *neostop* nos clones transfectados e verificamos que estes eram sensíveis a G418, indicando que o gene mutado não era funcional em *T. cruzi*, assim como em bactérias. Em seguida, realizamos ensaios de mutação preliminares com alguns clones, que consistiram em: (i) expansão dos clones em meio líquido, por 6, 10 ou 20 semanas, na presença ou ausência de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (ii) plaqueamento das culturas em meio ágar sangue contendo G418 para a seleção de mutantes revertentes, resistentes a neomicina; (iii) plaqueamento das culturas em meio ágar sangue contendo higromicina para a determinação da eficiência de clonagem; (iv) determinação da frequência de mutantes presentes em cada população, (v) sequenciamento do gene *neostop* de clones selecionados em G418 para a verificação de mutações revertentes e, finalmente, (vi) confirmação do fenótipo de resistência a G418 de alguns dos clones selecionados em placa.

Através desses procedimentos verificamos que (i) foi possível identificar, em placas de ágar sangue contendo G418, mutantes resistentes a este antibiótico, surgidos espontaneamente nas populações transfectadas ou por indução em ambiente mutagênico; (ii) a frequência de mutantes na população aumenta conforme o tempo de cultivo em meio líquido, conforme esperado; (iii) a frequência de mutantes aumenta em condições de estresse oxidativo, conforme esperado; (iv) foi possível identificar mutações revertentes em *neostop* em cerca de 10% dos mutantes selecionados.

O fato de 90% dos clones não apresentarem mutação revertente em *neostop* poderiam sugerir a ocorrência, nas populações estudadas, de uma alta frequência de células naturalmente resistentes a este antibiótico. No entanto, esta interpretação é improvável, uma vez que nenhum clone foi observado nas 30 placas com G418 em que foram plaqueadas células CL Brener selvagens (10 placas em cada etapa de plaqueamento, dado

não mostrado). Uma possível explicação é a presença de mutantes supressores nas culturas. Conforme mencionado anteriormente, um mutante supressor apresenta uma mutação na região do anticódon de algum tRNA, de forma que este passa a reconhecer um códon de terminação e assim, incorporar um aminoácido frente a ele. No momento, estamos desenvolvendo um sistema que possivelmente nos permitirá verificar, em *T. cruzi*, a ocorrência de mutantes supressores dentre aqueles clones que são resistentes a G418, mas que não apresentam mutações revertentes em *neostop*. Esse sistema baseia-se na presença de um códon TGA, introduzido por PCR na porção inicial do gene *gfp*. A proteína GFP selvagem emite fluorescência verde e sua expressão é facilmente detectável em *T. cruzi*. Por outro lado, o gene que contém o códon de parada precoce codifica uma proteína truncada, que não emite fluorescência. O gene mutado foi clonado no vetor pTREX, de expressão transiente em *T. cruzi* e será utilizado para transformar clones revertentes supostamente supressores. Caso os clones apresentem mutações em algum tRNA, que permitam a incorporação de aminoácidos frente a TGA, a expressão de GFP deverá ser restabelecida.

Os dados obtidos nos ensaios preliminares de detecção de mutantes revertentes resistentes a neomicina indicam a viabilidade da metodologia proposta para análise da frequência de mutação em *T. cruzi*, utilizando como repórter o gene *neostop*. A utilização de sistemas repórteres para o estudo da taxa de mutação apresenta algumas limitações: como o sistema não é capaz de detectar a ocorrência de mutações neutras ou de mutações que resultem em perda de funcionalidade do gene repórter (mutações negativas), detectando somente aquelas que geram alterações fenotípicas, a taxa de mutação determinada é geralmente subestimada em relação ao valor real. Além disso, uma vez que a frequência de mutação varia conforme a região do genoma, este tipo de ensaio não é adequado pra determinar com precisão a taxa de mutação genômica do organismo. Porém,

para estudos comparativos de taxa de mutação (entre diferentes linhagens de uma mesma espécie, ou entre espécies isogênicas crescidas sob diferentes condições ambientais, por exemplo) ensaios com genes repórteres mostram-se bastante úteis e satisfatórios. Para que o ensaio proposto de mutação em *T. cruzi* seja validado, no entanto, este deverá ser realizado com um número maior de clones. Ainda, precisaremos esclarecer o quanto de clones falso positivos existe entre os clones selecionados em placas com G418. Para tanto, o estudo por amostragem da resistência a G418 em meio líquido dos clones crescidos em placas contendo esse antibiótico parece ser a abordagem mais adequada. Nosso sistema apresenta a vantagem de detectar diferentes eventos mutacionais em *neostop*. Quando as possibilidades de mutantes revertentes são muitas, aumentam-se as chances de surgimentos destes em uma população e assim, algumas práticas do ensaio (quando feito na ausência de agente mutagênico) são facilitadas (por exemplo, menores períodos de expansão da população clonal são necessários para que se obtenha revertentes; isso é especialmente importante no caso de *T. cruzi*, que apresenta um tempo de dobramento de aproximadamente 36 horas). A suposta ocorrência de mutantes supressores dentre os clones revertentes, que será verificada pelo ensaio com *gfpstop*, não inviabilizaria a utilização do ensaio de mutação. Pelo contrário, as mutações supressoras serão somente mais uma possibilidade de reversão do fenótipo de sensibilidade a neomicina. Uma vez validada (com CL Brener) uma metodologia para análise de mutações em *T. cruzi*, planejamos utilizá-la inicialmente para determinar a frequência (ou a taxa) de mutação em pelo menos uma linhagem do grupo I (Silvio ou Colombiana) e uma do grupo II (JG ou Esmeraldo). Através desses estudos, pretendemos compreender melhor a geração de variabilidade genética nessa espécie.

Em resumo, a existência de uma isoforma de MSH2 específica em cada linhagem de *T. cruzi*, as diferenças funcionais entre elas e o papel central dessa proteína no

MMR nos levou a considerar que a proteína TcMSH2 e, conseqüentemente, a via de reparo de erros de pareamento poderiam contribuir de maneira expressiva para a maior geração de variabilidade em cepas apresentando a isoforma C, facilitando a adaptação destas ao sistema imune do hospedeiro humano. Se correta, essa hipótese seria a primeira demonstração em eucariotos de variação genômica e adaptação a ambientes adversos através de alterações na eficiência do MMR e auxiliaria na compreensão acerca dos mecanismos que respondem pela infectividade do parasita. Recentemente, o envolvimento do MMR na geração de variabilidade genética e sucesso da infecção foi também sugerido em estudos com *Plasmodium falciparum* (Bethke *et al.*, 2007), que possui variações singulares nessa conservada via de reparo, dentre elas a existência de dois homólogos da proteína MSH2. Neste trabalho, estudamos também alguns aspectos do controle da mutagênese induzida por estresse oxidativo em *T. cruzi*. De modo geral, a defesa celular contra danos oxidativos pode ser dividida em quatro linhas principais: (i) inativação de ROS por enzimas detoxificantes; (ii) hidrólise de dNTPs oxidados no pool de nucleotídeos, (iii) reparo de lesões oxidativas no DNA e (iv) síntese translesão livre de erros (revisado por Slupphaug *et al.*, 2003). Em *T. cruzi*, as vias de inativação enzimática de ROS são consideradas fracas, se levada em conta a alta exposição a ROS ao longo do seu ciclo de vida e a grande importância do kDNA (Hillebrand *et al.*, 2003). De modo agravante, ainda não foi encontrado neste organismo um homólogo de MutT, e a hidrólise de 8-oxodGTP parece ser pouco eficiente. Dessa forma, acreditamos que em *T. cruzi* ocorra uma sobrecarga de lesões oxidativas a serem reparadas, principalmente no kDNA, aumentando a importância ou atribuindo novos papéis a proteínas de vias de reparo e síntese translesão. Dentre as diversas vias e proteínas que se complementam na correção desses danos, MSH2 é normalmente uma proteína acessória no reparo de bases oxidadas presentes em fitas recém sintetizadas, no núcleo. No entanto, o nível supostamente elevado de lesões no

kDNA em *T. cruzi* parece determinar (i) a existência de um processo adicional de reparo de lesões oxidativas, envolvendo TcMSH2, possivelmente essencial à manutenção da integridade genômica do parasita e (ii) o deslocamento de proteínas habitualmente nucleares para o controle de danos oxidativos no cinetoplasto. Uma vez que a eficiência do MMR interfere diretamente na taxa de mutação de um organismo, estudos comparativos da taxa de mutação em cepas das diferentes linhagens de *T. cruzi*, antes e após tratamento com agentes genotóxicos, poderão fornecer informações importantes sobre o MMR e o suposto deslocamento de TcMSH2 para a resposta ao estresse oxidativo nessas cepas.

Neste estudo trabalhamos com dois organismos patogênicos de extrema relevância em termos de saúde pública no Brasil, *S. mansoni* e *T. cruzi*, e voltamos nossas atenções às vias metabólicas de reparo e/ou tolerância a erros no DNA destes parasitas, até então pouco estudadas. O estudo de tais vias pode nos proporcionar uma maior compreensão acerca da biologia destes parasitos, além de poder revelar possíveis variações, particularidades e especializações no sistema de reparo de DNA destas espécies.

## 6. Referências

- Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vågbø CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjørås M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE. 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nucleic Acids Res* 31(12):3599-3608.
- Adamson AW, Beardsley DI, Kim WJ, Gao Y, Baskaran R, Brown KD. 2005. Methylator-induced, mismatch repair-dependent G2 arrest is activated through Chk1 and Chk2. *Mol Biol Cell* 16(3):1513-26.
- Akiyama M, Horiuchi T, Sekiguchi M. 1987. Molecular cloning and nucleotide sequence of the mutT mutator of *Escherichia coli* that causes A:T to C:G transversion. *Mol Gen Genet* 206(1):9-16.
- Alani E, Lee S, Kane MF, Griffith J, Kolodner RD. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol* 265(3):289-301.
- Almeida KH, Sobol RW. 2007. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* 6(6):695-711.
- Alzate JF, Arias AA, Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jiménez-Ruiz A. 2007. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 152(2):192-202.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 100(2):163-72.
- Antony E, Hingorani MM. 2003. Mismatch recognition-coupled stabilization of Msh2-Msh6 in an ATP-bound state at the initiation of DNA repair. *Biochemistry* 42(25):7682-93.
- Arczewska KD, Kuśmierk JT. 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 2. Role of bacterial mutator gene homologues in human disease. Overview of nucleotide pool sanitization and mismatch repair systems. *Acta Biochim Pol* 54(3):435-57.
- Augusto-Pinto L, Bartholomeu DC, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. 2001. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 272(1-2):323-33.
- Augusto-Pinto L, da Silva CG, Lopes D de O, Machado-Silva A, Machado CR. 2003. *Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms. *Genet Mol Res* 2(1):77-91.
- Augusto-Pinto L, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. 2003. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics* 164(1):117-26.



- Azuaje FJ, Ramirez JL, Da Silveira JF. 2007. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Kinetoplastid Biol Dis*. Jul 10;6:6.
- Bachmann B. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews* 36:525–557.
- Baer CF, Miyamoto MM, Denver DR. 2007. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nat Rev Genet* 8(8):619-31.
- Banerjee S, Flores-Rozas H. 2005. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. *Nucleic Acids Res*. 2005 Mar 33(4):1410-9.
- Bavoux C, Hoffmann JS, Cazaux C. 2005. Adaptation to DNA damage and stimulation of genetic instability: the double-edged sword mammalian DNA polymerase kappa. *Biochimie*. 2005. 87(7):637-46.
- Bebenek K, Kunkel TA. 2004. Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* 69:137-65.
- Beckmann S, Wippersteg V, El-Bahay A, Hirzmann J, Oliveira G, Grevelding CG. 2007. *Schistosoma mansoni*: germ-line transformation approaches and actin-promoter analysis. *Exp Parasitol* 117(3):292-303.
- Begley TJ, Samson LD. 2003. Molecular biology: a Wx for RNA. *Nature* 421(6925):795–796.
- Bellacosa A. 2001. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ* 8(11):1076-92.
- Berdal KG, Johansen RF, Seeberg E. 1998. Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme. *EMBO J* 17(2):363-7.
- Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, Tano K, Mitra S. 1993. Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci* 90(19):8901-4.
- Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF. 1996. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271(41):25059-62.
- Bethke L, Thomas S, Walker K, Lakhia R, Rangarajan R, Wirth D. 2007. The role of DNA mismatch repair in generating genetic diversity and drug resistance in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Sep;155(1):18-25.
- Beyersmann D, Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82(8):493-512.
- Bhakat KK, Hazra TK, Mitra S. 2004. Acetylation of the human DNA glycosylase NEIL2 and inhibition of its activity. *Nucleic Acids Res* 32:3033–3039.

- Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, Hazra TK, Mitra S. 2003. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J* 22(23):6299-309.
- Bhakat KK, Mokkalapati SK, Boldogh I, Hazra TK, Mitra S. 2006. Acetylation of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase by p300 and Its Role in 8-Oxoguanine Repair In Vivo *Mol Cell Biol* 26(5):1654–1665.
- Bjorås M, Luna L, Johnsen B, Hoff E, Haug T, Rognes T, Seeberg E. 1997. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J* 16(20):6314-22.
- Blackwell LJ, Martik D, Bjornson KP, Bjornson ES, Modrich P. 1998. Nucleotide-promoted release of hMutS $\alpha$  from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* 273(48):32055-62.
- Boiteux S, Gellon L, Guibourt N. 2002. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med* 32(12):1244-53.
- Boiteux S, Guillet M. 2004. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 2004. 3(1):1-12.
- Boiteux S, Huisman O. 1989. Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) mutant of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 215(2):300-5.
- Boiteux S, O'Connor TR, Laval J. 1987. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J* 6:3177–3183.
- Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, Chauhan DP. 1998. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev* 22(5):377-82.
- Bowers J, Tran PT, Joshi A, Liskay RM, 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.
- Bowles T, Metz AH, O'Quin J, Wawrzak Z, Eichman BF. 2008. Structure and DNA binding of alkylation response protein AidB. *Proc Natl Acad Sci* 105(40):15299-304.
- Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, Yoshino TP. 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* 128(2):205-15
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14:115–132.
- Branch P, Aquilina G, Bignami M, Karran P. 1993. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*. 362(6421):652-4.

- Brendel M, Bonatto D, Strauss M, Revers LF, Pungartnik C, SaY J, Henriques JA. 2003. Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 544:179–193.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterization 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.
- Bruner S, Norman DPG, Verdine G. 2000. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403:859–866.
- Buscaglia CA, Di Noia JM. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect* 5(5):419-27.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131:1-87.
- Caldecott KW. 2001. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays* 23:447-455.
- Camargo EP. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.
- Campos PC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Cerqueira GC, Teixeira SM. 2008. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 38(12):1383-9.
- Casorelli I, Russo MT, Bignami M. 2008. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 8(4):368-80.
- Cerqueira GC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Hou L, Freitas-Silva DM, Machado CR, El-Sayed NM, Teixeira SM. 2008. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 157(1):65-72.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol* 22(10):484-91.
- Claij N, Te Riele H. 2002. Methylation tolerance in mismatch repair proficient cells with low MSH2 protein level. *Oncogene* 21(18):2873-9.
- Clark AB, Kunkel TA. 2004. Cadmium inhibits the functions of eukaryotic MutS complexes. *J Biol Chem* 279(52):53903-6.
- Clarke ND, Kvaal M, Seeberg E. 1984. Cloning of *Escherichia coli* genes encoding 3-methyladenine DNA glycosylases I and II. *Mol Gen Genet* 197(3):368-72.
- Collins A, Cadet J, Epe B, Gedik C. 1997. Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. *Carcinogenesis* 18(9):1833-6.

- Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E, Bignami M. 2002. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 12(11):912-8.
- Coquerelle T, Dosch J, Kaina B. 1995. Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res* 336(1):9-17.
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16(22):10881-90.
- Cunningham RP, Saporito SM, Spitzer SG, Weiss B. 1986. Endonuclease IV (nfo) mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 168:1120-1127.
- Cupples CG, Miller JH. 1989. A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc Natl Acad Sci* 86(14):5345-9.
- Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA. 2004. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol Biochem Parasitol* 138(1):57-66.
- Dahle J, Brunborg G, Svendsrud DH, Stokke T, Kvam E. 2008. Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis. *Cancer Lett.* 267(1):18-25.
- Dantzer F, Luna L., Bjoras M., Seeberg E. 2002. Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 30:2349-2357.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM. 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* (2):113-20.
- Dawson KJ. 1999. The dynamics of infinitesimally rare alleles, applied to the evolution of mutation rates and the expression of deleterious mutations. *Theor Popul Biol* 55(1):1-22.
- de Moura MB, Chamber-Reis BL, Passos Silva DG, Rajão MA, Macedo AM, Franco GR, Pena SD, Teixeira SM, Machado CR. 2009. Cloning and characterization of DNA polymerase eta from *Trypanosoma cruzi*: roles for translesion bypass of oxidative damage. *Environ Mol Mutagen* 50(5):375-86.
- Devasagayam TP, Steenken S, Obendorf MS, Schulz WA, Sies H. 1991. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30(25):6283-9.
- DeWeese TL, Shipman JM, Larrier NA, Buckley NM, Kidd LR, Groopman JD, Cutler RG, te Riele H, Nelson WG. 1998. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proc Natl Acad Sci* 95(20):11915-20.

- Di Noia JM, D'Orso I, Sánchez DO, Frasch AC. 2000. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* 275(14):10218-27.
- Dillon GP, Feltwell T, Skelton JP, Ashton PD, Coulson PS, Quail MA, Nikolaidou-Katsaridou N, Wilson RA, Ivens AC. 2006. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 36(1):1-8.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32:1102–1115.
- Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(5):465-9.
- Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3(11):1389-407.
- Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlage RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF, Baserga SJ. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417(6892):967-70.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148(4):1667-86.
- Drotschmann K, Shcherbakova PV, Kunkel TA. 2000. Mutator phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in MSH2 and MLH1. *Toxicol Lett* 112-113:239-44.
- Dzierzbicki P, Koprowski P, Fikus MU, Malc E, Ciesla Z. 2004. Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependent pathway. *DNA Repair* 3(4):403-11.
- Earley MC, Crouse GF. 1998. The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 95(26):15487-91.
- Egashira A, Yamauchi K, Yoshiyama K, Kawate H, Katsuki M, Sekiguchi M, Sugimachi K, Maki H, Tsuzuki T. 2002. Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair* 1(11):881-93.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Wortley EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringham F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, daSilveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J,

- Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. Jul 15;309(5733):409-15. Elez M, Radman M, Matic I. 2007. The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL. *Proc Natl Acad Sci* 104(21):8935-40.
- Emmanuel E, Yehuda E, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N, Levy AA. 2006. The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO* 7(1):100-5.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* 82(2):139-46.
- Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ, Kelly JD, Wu MM, Gold B, Samson LD. 1998. A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5412-8.
- Eot-Houllier G, Gonera M, Gasparutto D, Giustranti C, Sage E. 2007. Interplay between DNA N-glycosylases/AP lyases at multiply damaged sites and biological consequences. *Nucleic Acids Res* 35(10):3355-66.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3):175-85.
- Falnes PØ, Johansen RF, Seeberg E. 2002. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 419(6903):178-82.
- Falnes PØ, Rognes T. 2003. DNA repair by bacterial AlkB proteins *Res Microbiol* 154(8):531-8.
- Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. 2003. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol* 19(11):509-15.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. 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 (2):161-6.
- Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB. 1996. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56(21):4881-6.
- Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, Nehmé A, Christen RD, Haas M, MacLeod CL, Howell SB. 1997. *In vitro* and *in vivo* resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* 57(10):1841-5.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-47.
- Fitzpatrick JM, Johnston DA, Williams GW, Williams DJ, Freeman TC, Dunne DW, Hoffmann KF. 2005. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma*



- mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Mol Biochem Parasitol* 141(1):1-13.
- Franco GR, Valadão AF, Azevedo V, Rabelo EM. 2000. The Schistosoma gene discovery program: state of the art. *Int J Parasitol* 30(4):453-63.
- Frasch AC. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 16(7):282-6.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2(3):e24.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 35(4):411-7.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
- García-Ortiz MV, Ariza RR, Roldán-Arjona T. 2001. An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 47(6):795-804.
- García-Santos Mdel P, Calle E, Casado J. 2001. Amino acid nitrosation products as alkylating agents. *J Am Chem Soc* 123(31):7506-10.
- Gatehouse D. 1987. Critical features of bacterial mutation assays. *Mutagenesis* 2(5):397-409.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421(6926):936-9.
- Gee P, Maron DM, Ames BN. 1994 Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. *Proc Natl Acad Sci* 91(24):11606-10.
- Geldhof P, Visser A, Clark D, Saunders G, Britton C, Gilleard J, Berriman M, Knox D. 2007. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology* 134(Pt 5):609-19.
- Gérczei T, Correll CC. 2003. Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. *Proc Natl Acad Sci* 101(43):15301-6.
- Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87-96.
- Glassner BJ, Posnick LM, Samson LD. 1998. The influence of DNA glycosylases on spontaneous mutation. *Mutat Res* 400(1-2):33-44.

- Glassner BJ, Rasmussen LJ, Najarian MT, Posnick LM, Samson LD. 1998. Generation of a strong mutator phenotype in yeast by imbalanced base excision repair. *Proc Natl Acad Sci* 95(17):9997-10002.
- Goldberg SS, Chiari E. 1980. Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* on solid medium. *J Parasitol* 66(4):677-9.
- Gollapudi BB, Krishna G. 2000. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutat Res* 455(1-2):21-8.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* 368(9541):1106-18.
- Gu Y, Desai T, Gutierrez PL, Lu AL. 2002. Alteration of DNA base excision repair enzymes hMYH and hOGG1 in hydrogen peroxide resistant transformed human breast cells. *Med Sci Monit* 7(5):861-8.
- 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
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-80.
- Hanawalt PC, Spivak G. 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12):958-70.
- Haracska L, Washington MT, Prakash S, Prakash L. 2001. Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase  $\epsilon$ . *J Biol Chem* 276(9):6861-6.
- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 127(1-3):47-54.
- Hasan S, El-Andaloussi N, Hardeland U, Hassa PO, Bürki C, Imhof R, Schär P, Hottiger MO. 2002. Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta. *Mol Cell* 10(5):1213-22.
- Hasan S, Stucki M, Hassa PO, Imhof R, Gehrig P, Hunziker P, Hübscher U, Hottiger MO. 2001. Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300. *Mol Cell* 7(6):1221-31.
- Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair* 6(4):470-80.
- Heddle JA, Martus HJ, Douglas GR. 2003. Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen* 41(1):1-6.
- Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* 18(1):27-47.



- Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I. 1994. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci* 91(1):370-4.
- Hill JW, Hazra TK, Izumi T, Mitra S. 2001. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 29:430-438.
- Hillebrand H, Schmidt A, Krauth-Siegel RL. 2003. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *J Biol Chem* 278(9):6809-15.
- Hitomi K, Iwai S, Tainer JA. 2007. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 6(4):410-28.
- Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903):120-1.
- Hoeijmakers JH. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411:366-374.
- Hollenbach S, Dhénaut A, Eckert I, Radicella JP, Epe B. 1999. Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis* 20(9):1863-8.
- Hsieh P, Yamane K. 2008. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 129(7-8):391-407.
- Hu J, Imam SZ, Hashiguchi K, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. 2005. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase ( $\alpha$ -OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res* 33(10):3271-82.
- Hudson G, Chinnery PF. 2006. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet.* 15 Spec No 2:R244-52.
- Hughes JM, Ares M Jr. 1991. Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J* 10(13):4231-9.
- Humbert O, Fiumicino S, Aquilina G, Branch P, Oda S, Zijno A, Karran P, Bignami M. 1999. Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis* 20(2):205-14.
- Ibeanu G, Hartenstein B, Dunn WC, Chang LY, Hofmann E, Coquerelle T, Mitra S, Kaina B. 1992. Overexpression of human DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase results in the increased removal of N-methylpurines in DNA without a concomitant increase in resistance to alkylating agents in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 13(11):1989-95.

- Jackson AL, Loeb LA. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 477(1-2):7-21.
- Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99(9):2467-98.
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 34(3):326-9.
- Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, Noble LR. 2007. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*--*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology* 123 Suppl:S181-96.
- Joseph PD. 2000. The *Escherichia coli* lacZ reversion mutagenicity assay. *Mutat Res* 455(1-2):71-80.
- Jun SH, Kim TG, Ban C. 2006. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J* 273(8):1609-19.
- Kaasen I, Evensen G, Seeberg E. 1986. Amplified expression of the tag+ and alkA+ genes in *Escherichia coli*: identification of gene products and effects on alkylation resistance. *J Bacteriol* 168(2):642-7.
- Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. 2006. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 126(2):297-308.
- Kang JM, Iovine NM, Blaser MJ. 2006. A paradigm for direct stress-induced mutation in prokaryotes. *FASEB J* 20(14):2476-85.
- Karran P. 2001. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22(12):1931-7.
- Kartalou M, Essigmann JM. 2001. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 478(1-2):1-21.
- Kass S, Tyc K, Steitz JA, Sollner-Webb B. 1990. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 60(6):897-908.
- Kat A, Thilly WG, Fang WH, Longley MJ, Li GM, Modrich P. 1993. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci* 90(14):6424-8.
- Kavli B, Slupphaug G, Mol CD, Arvai AS, Peterson SB, Tainer JA, Krokan HE. 1996. Excision of cytosine and thymine from DNA by mutants of human uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 15(13):3442-7.
- Kim ST, Malhotra K, Smith CA, Taylor JS, Sancar A. 1994. Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J Biol Chem* 269(11):8535-40.

- Kleibl K. 2002. Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. *Mutat Res* 512 (1):67-84.
- Klingbeil MM, Motyka SA, Englund PT. 2002. Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell* 10(1):175-86.
- Krokan HE, Standal R, Slupphaug G. 1997. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325:1-16.
- Kuwahara H, Kariu T, Fang J, Maeda H. Generation of drug-resistant mutants of *Helicobacter pylori* in the presence of peroxyxynitrite, a derivative of nitric oxide, at pathophysiological concentration. *Microbiol Immunol* 53(1):1-7.
- Lambrecht FL. 1965. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop* 7(6):346-52.
- Lawrence C. 1994. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays* 16(4):253-8.
- Le Page F, Klungland A, Barnes DE, Sarasin A, Boiteux S. 2000. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci* 97(15):8397-402.
- Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasin A. BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60(19):5548-52.
- Leadon SA, Avrutskaya AV. 1997. Differential involvement of the human mismatch repair proteins, hMLH1 and hMSH2, in transcription-coupled repair. *Cancer Res* 57(17):3784-91.
- LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 274(5290):1208-11.
- Lee M.R., Kim S.H., Cho H.J., Lee K.Y., Moon A.R., Jeong H.G., Lee J.S., Hyun J.W., Chung M.H., You H.J. 2004. Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. *J Biol Chem* 279:9857-9866.
- Lee SJ, Baserga SJ. 1999. Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. *Mol Cell Biol* 19(8):5441-52.
- Lindahl T, Sedgwick B, Sekiguchi M, Nakabeppu Y. 1988. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem* 57:133-57.
- Lindahl T, Wood RD. 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897-1905.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715.

- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21(8):363-9.
- Lopes Dde O, Schamber-Reis BL, Regis-da-Silva CG, Rajão MA, DaRocha WD, Macedo AM, Franco GR, Nardelli SC, Schenkman S, Hoffmann JS, Cazaux C, Pena SD, Teixeira SM, Machado CR. 2008. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. *DNA Repair (Amst)* 7(11):1882-92.
- LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, Lee NH, El-Sayed N. 2004. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int* 53(2):183-92.
- Lu SC. 2000. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 32(4):391-5.
- Luria SE, Delbrück M. 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28(6):491-511.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(1):1-12.
- Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SD, Oliveira RP. 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(3):407-13.
- Machado CA, Ayala FJ. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci* 98(13):7396-401.
- Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM. 2006. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res* 612(1):40-57.
- Machado-Silva A, Teixeira SM, Franco GR, Macedo AM, Pena SD, McCulloch R, Machado CR. 2008. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene* 411(1-2):19-26.
- Macpherson P, Barone F, Maga G, Mazzei F, Karran P, Bignami M. 2005. 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutSalpha. *Nucleic Acids Res* 33(16):5094-105.
- Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417(3):639-50.
- Maki H, Segikuchi M. 1992. Mut T protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355: 273-275.
- Marra G, D'Atri S, Corti C, Bonmassar L, Cattaruzza MS, Schweizer P, Heinimann K, Bartosova Z, Nyström-Lahti M, Jiricny J. 2001. Tolerance of human MSH2+/- lymphoblastoid cells to the methylating agent temozolomide. *Proc Natl Acad Sci* 98(13):7164-9.

- Marra G, Schär P. 1999. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J* 338 ( Pt 1):1-13.
- Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. 2008. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14(5):1291-5.
- Mathieu-Daudé F, Bosseno MF, Garzon E, Lelièvre J, Sereno D, Ouaisi A, Brenière SF. 2007. Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains. *Parasitol Res* 101(5):1355-63.
- Memisoglu A, Samson L. 1996. DNA repair functions in heterologous cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31(5-6):405-47.
- Michaels ML, Miller JH. 1992. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* 174:6321–6325.
- Michaels ML, Pham L, Nghiem Y, Cruz.C, Miller JH. 1990. MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. *Nucleic Acids Res* 18:3841–3845.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17(3):235-48.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 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(3):217-25.
- Miller JH. 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 50:625-43.
- Mookerjee SA, Lyon HD, Sia EA. 2005. Analysis of the functional domains of the mismatch repair homologue Msh1p and its role in mitochondrial genome maintenance. *Curr Genet* 47(2):84-99.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, 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* 77(11):6810-4.
- Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, Ohno M, Ide Y, Hirano S, Yoshimura D, Tominaga Y, Furuichi M, Sakumi K. 2004. Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 1011:101–111.
- Nakabeppu Y. 2001. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat Res* 477(1-2):59-70.
- Nakagawa T, Datta A, Kolodner RD. 1999. Multiple functions of MutS- and MutL-related heterocomplexes. *Proc Natl Acad Sci* 96(25):14186-8.

- Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA. 1998. Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Research* 58:222–225.
- Ndegwa D, Krautz-Peterson G, Skelly PJ. 2007. Protocols for gene silencing in schistosomes. *Exp Parasitol* 117(3):284-91.
- Neves DP, de Melo AL, Genaro O, Linardi PM. 2004. *Parasitologia Humana*. 10<sup>a</sup>.ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- Ni TT, Marsischky GT, Kolodner RD. 1999. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 4(3):439-44.
- Nieminuszczy J, Grzesiuk E. 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. 1: *Acta Biochim Pol* 54(3):459-68.
- Nouspikel T. 2009. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci*. 66(6):994-1009.
- Nowosielska A. 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Acta Biochim Pol* 54(3):483-94.
- Nunoshiba T, Ishida R, Sasaki M, Iwai S, Nakabeppu Y, Yamamoto K. 2004. A novel Nudix hydrolase for oxidized purine nucleoside triphosphates encoded by ORFYLR151c (PCD1 gene) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 32(18):5339-48.
- Nunoshiba T, Watanabe T, Nakabeppu Y, Yamamoto K. 2002. Mutagenic target for hydroxyl radicals generated in *Escherichia coli* mutant deficient in Mn- and Fe- superoxide dismutases and Fur, a repressor for iron-uptake systems. *DNA Repair* 1(5):411-418.
- O'Brien V, Brown R. 2006. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis* 27(4):682-92.
- Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Tudek B. 2007. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 54(1):11-26.
- Oliveira G. 2007. The *Schistosoma mansoni* transcriptome: an update. *Exp Parasitol* 117(3):229-35.
- Papouli E, Cejka P, Jiricny J. 2004. Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res* 64(10):3391-4.
- Peña-Díaz J, Akbari M, Sundheim O, Farez-Vidal ME, Andersen S, Sneve R, Gonzalez-Pacanowska D, Krokan HE, Slupphaug G. 2004. *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *J Mol Biol* 342(3):787-99.
- Pitsikas *et al.*, 2007).

- Pitsikas P, Lee D, Rainbow AJ. 2007. Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. *Mutagenesis* 22(3):235-43.
- Posnick LM, Samson LD. 1999. Imbalanced base excision repair increases spontaneous mutation and alkylation sensitivity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(21):6763-71.
- Prakash S, Johnson RE, Prakash L. 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* 74:317-53.
- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1(2):92-100.
- Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 94(15):8010-5.
- Rai P, Onder TT, Young JJ, McFaline JL, Pang B, Dedon PC, Weinberg RA. 2008. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad* 106(1):169-74.
- Rajão MA, Passos-Silva DG, DaRocha WD, Franco GR, Macedo AM, Pena SD, Teixeira SM, Machado CR. 2009. DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. *Mol Microbiol* 71(1):185-97.
- Ramachandran S, Temple BR, Chaney SG, Dokholyan NV. 2009. Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 37(8):2434-48.
- Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M. 1989. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342(6248):396-401.
- Regis-da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira MT, DaRocha WD, Franco GR, Macedo AM, Hoffmann JS, Cazaux C, Pena SD, Teixeira SM, Machado CR. 2006. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem Parasitol* 149(2):191-200.
- Richter C, Park JW, Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad* 85(17):6465-7.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 66(6):981-93.
- Roche H, Gietz RD, Kunz BA. 1994. Specificity of the yeast rev3 delta antimutator and REV3 dependency of the mutator resulting from a defect (rad1 delta) in nucleotide excision repair. *Genetics* 37(3):637-46.



- Rodrigues MA, Bemquerer MP, Mohallem ND, Politi MJ. 2006. Xerogel from N,N'-bis(2-phosphonoethyl)-1,4,5,8-naphthalenediimide: a nanohybrid material displaying efficient tryptophan photooxidation. *Langmuir* 22(21):8939-44.
- Rogers JE, Abraham B, Rostkowski A, Kelly LA. 2001. Mechanisms of photoinitiated cleavage of DNA by 1,8-naphthalimide derivatives. *Photochem Photobiol* 74(4):521-31.
- Rosche WA, Foster PL. 1999. The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 96(12):6862-7.
- Ruelas DS, Karentz D, Sullivan JT. 2007. Sublethal effects of ultraviolet b radiation on miracidia and sporocysts of *Schistosoma mansoni*: intramolluscan development, infectivity, and photoreactivation. *J Parasitol* 93(6):1303-10.
- Russo MT, Blasi MF, Chiera F, Fortini P, Degan P, Macpherson P, Furuichi M, Nakabeppu Y, Karran P, Aquilina G, Bignami M. 2004. The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* 24(1):465-74.
- Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. 2007. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat Res* 614(1-2):69-76.
- Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabata SI, Maka H, Sekiguchi M. 1993. Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem* 268:23524-23530.
- Salsbury FR Jr, Clodfelter JE, Gentry MB, Hollis T, Scarpinato KD. 2006. The molecular mechanism of DNA damage recognition by MutS homologs and its consequences for cell death response. *Nucleic Acids Res* 34(8):2173-85.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. 1987. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold spring harbor laboratory press
- Sancar A. 1994. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33(1):2-9.
- Santos TM, Johnston DA, Azevedo V, Ridgers IL, Martinez MF, Marotta GB, Santos RL, Fonseca SJ, Ortega JM, Rabelo EM, Saber M, Ahmed HM, Romeih MH, Franco GR, Rollinson D, Pena SD. 1999. Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using the expressed sequence tag approach. *Mol Biochem Parasitol* 103(1):79-97.
- Savino R, Gerbi SA. 1990. In vivo disruption of *Xenopus* U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J* 9(7):2299-308.
- Savioli L, Renganathan E, Montresor A, Davis A, Behbehani K. 1997. Control of schistosomiasis-- a global picture. *Parasitol Today* 13(11):444-8.
- Saxowsky TT, Choudhary G, Klingbeil MM, Englund PT. 2003. *Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. *J Biol Chem* 278(49):49095-101.



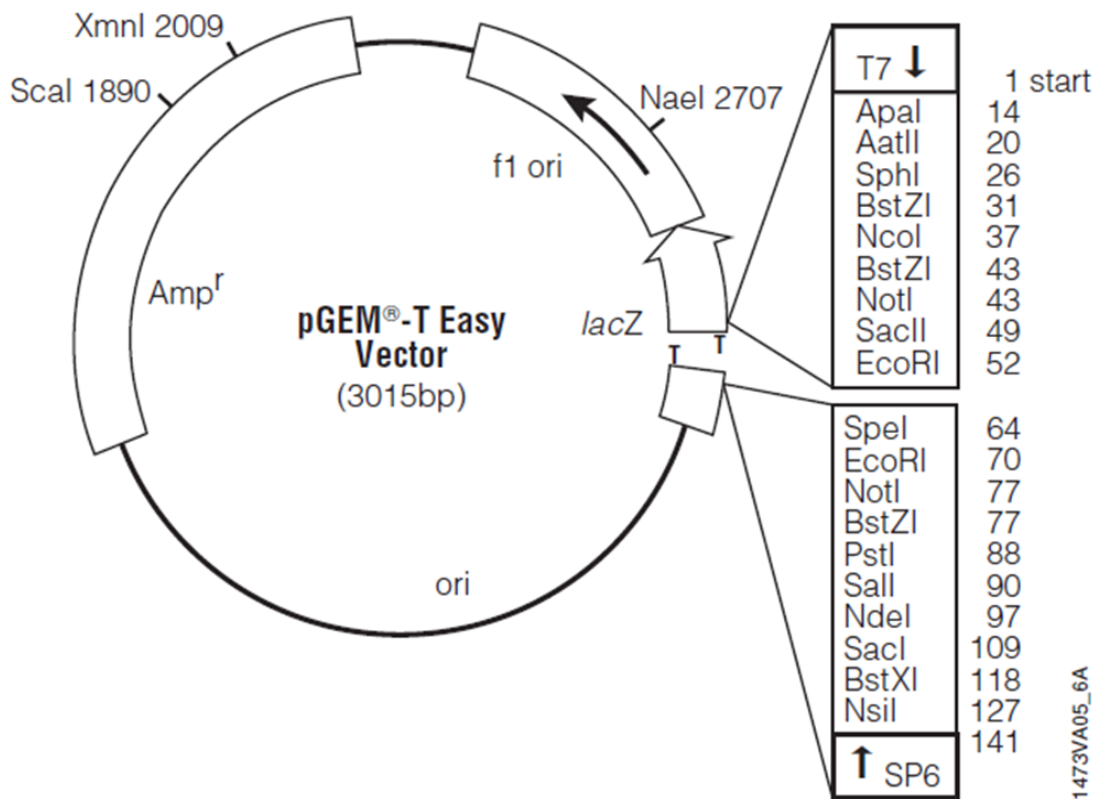
- Scheuermann RH, Echols H. 1984. A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci* 81(24):7747-51.
- Schmidt A, Krauth-Siegel RL. 2002. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem* 2(11):1239-59.
- Schofield MJ, Hsieh P. 2003. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 57:579-608.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349(6308):431-4.
- Shin KH, Park JG. 2000. Microsatellite instability is associated with genetic alteration but not with low levels of expression of the human mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1. *Eur J Cancer* 36(7):925-31.
- Shuker DE, Margison GP. 1997. Nitrosated glycine derivatives as a potential source of O6-methylguanine in DNA. *Cancer Res* 57(3):366-9.
- Silva CS, Silva SH, Pereira-Júnior OS, Cabral FJ, Costa-Cruz JM, Rodrigues V. 2007. *Schistosoma mansoni*: gene expression of the nucleotide excision repair factor 2 (NEF2) during the parasite life cycle, and in adult worms after exposure to different DNA-damaging agents. *Acta Trop* 104(1):52-62.
- Singer B. 1976. All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. *Nature* 264(5584):333-9.
- Slebos RJ, Li M, Evjen AN, Coffa J, Shyr Y, Yarbrough WG. 2006. Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells. *Mutat Res* 602(1-2):92-9.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531(1-2):231-51.
- Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. 1996. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 178:3885-3892.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83(2):141-52.
- Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, Zielińska M, Siomek A, Kowalewski J, Oliński R, Tudek B, Kuśmierk JT. 2005. Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 97(5):384-95.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20(2):77-88.

- Tajiri T, Maki H, Sekiguchi M. 1995. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 336(3):257-67.
- Tenaillon O, Taddei F, Radmian M, Matic I. 2001. Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 152(1):11-6.
- Tenaillon O, Toupance B, Le Nagard H, Taddei F, Godelle B. 1999. Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics* 152(2):485-93.
- Thomas D, Scott A, Barbey R, Padula M, Boiteux S. 1996. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G.C → T.A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet* 254:171-178.
- Thomas DC, Roberts JD, Sabatino RD, Myers TW, Tan CK, Downey KM, So AG, Bambara RA, Kunkel TA. 1991. Fidelity of mammalian DNA replication and replicative DNA polymerases. *Biochemistry* 30(51):11751-9.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci* 90(4):1335-9.
- Tornaletti S. 2009. DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cell Mol Life Sci.* 66(6):1010-20.
- Toyoshima M. 2009. Analysis of p53 dependent damage response in sperm-irradiated mouse embryos. *J Radiat Res* 50(1):11-7.
- Tudek B, Boiteux S, Laval J. 1992. Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res* 20(12):3079-84.
- Tudek B, Swoboda M, Kowalczyk P, Oliński R. 2006. Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7:33-49.
- Ulbert S, Eide L, Seeberg E, Borst P. 2004. Base J, found in nuclear DNA of *Trypanosoma brucei*, is not a target for DNA glycosylases. *DNA Repair* 3(2):145-54.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD. 1996. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 149(6):2153-9.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
- van der Kemp PA, Thomas D, Barbey R, de Oliveira R, Boiteux S. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which encodes a

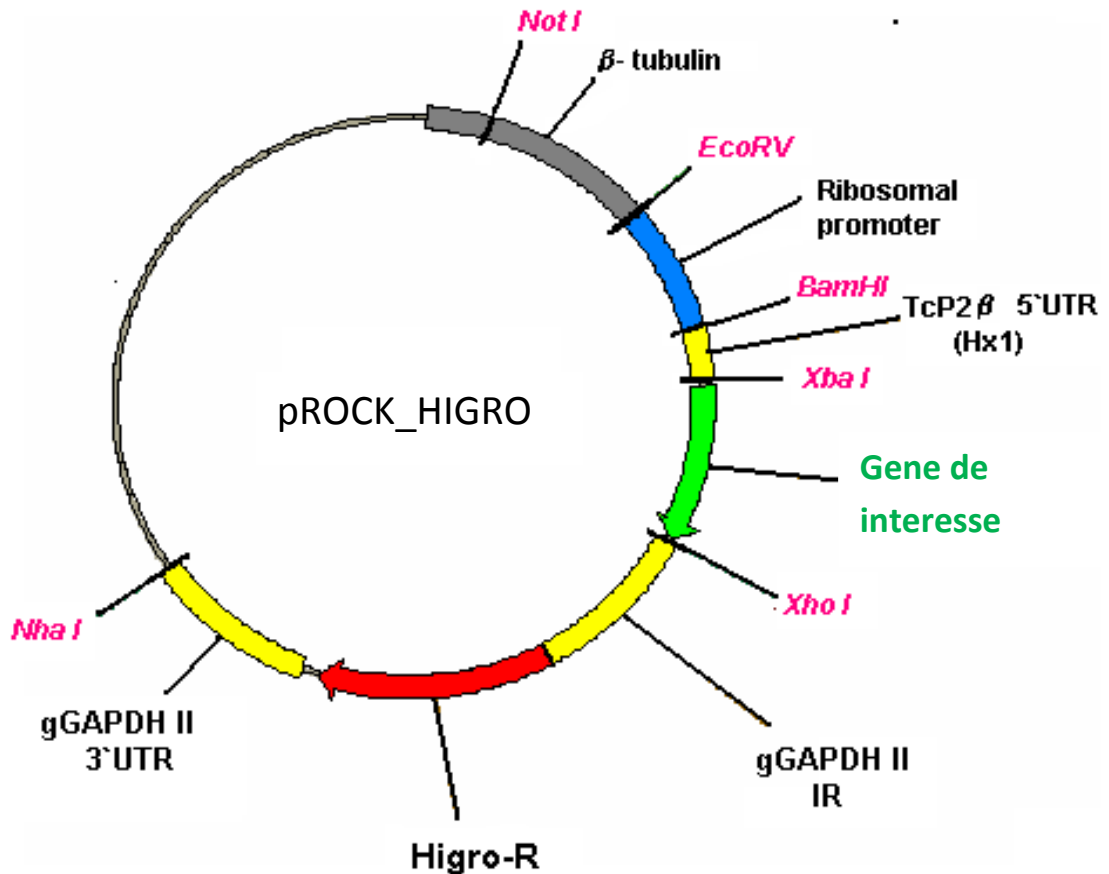
- DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci* 93:5197–5202.
- van der Werf MJ, de Vlas SJ, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. 2002. Associating community prevalence of *Schistosoma mansoni* infection with prevalence of signs and symptoms. *Acta Trop* 82(2):127-37.
- van Hellemond JJ, van Balkom BW, Tielens AG. 2007. Schistosome biology and proteomics: progress and challenges. *Exp Parasitol* 117(3):267-74.
- Vidmar JJ, Cupples CG 1993. MutY repair is mutagenic in mutT- strains of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 39(9):892-4.
- Von Borstel RC. 1978. Measuring spontaneous mutation rates in yeast. *Methods Cell Biol.* 20:1-24.
- Vongsamphanh R, Wagner JR, Ramotar D. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* Ogg1 prevents poly(GT) tract instability in the mitochondrial genome. *DNA* 5(2):235-42.
- Waisberg M, Lobo FP, Cerqueira GC, Passos LK, Carvalho OS, El-Sayed NM, Franco GR. 2008. *Schistosoma mansoni*: Microarray analysis of gene expression induced by host sex. *Exp Parasitol* 120(4):357-63.
- Waldman AS. Ensuring the fidelity of recombination in mammalian chromosomes. *Bioessays* 30(11-12):1163-71.
- Wang Y, Qin J. 2003. MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci* 100(26):15387-92.
- Wehner KA, Baserga SJ. 2002. The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol Cell* 9(2):329-39.
- Williams DL, Sayed AA, Bernier J, Birkeland SR, Cipriano MJ, Papa AR, McArthur AG, Taft A, Vermeire JJ, Yoshino TP. 2007. Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Exp Parasitol* 117(3):246-58.
- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. 2006. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* 85(2):148-54.
- Wilson RA, Coulson PS. 2006. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? *Microbes Infect* 1(7):535-43.
- Wilson SH, Kunkel TA. 2000. Passing the baton in base excision repair. *Nature Structural Biology* 7:176–178.
- Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigmann JM. 1992. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 20(22):6023-32.

- Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. 2005. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 577 (1-2):275-83.
- Worthey EA, Delcher AL, Blandin G and others. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733):409-15.
- Wu X, Khalpey Z, Cascalho M. 2004. Cellular physiology of mismatch repair. *Curr Pharm Des* 10(32):4121-6.
- Wyrzykowski J, Volkert MR. 2003. The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol* 185(5):1701-4.
- Yang N, Chaudhry MA, Wallace SS. 2006. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells. *DNA Repair* 5(1):43-51.
- Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 18(6):272-8.

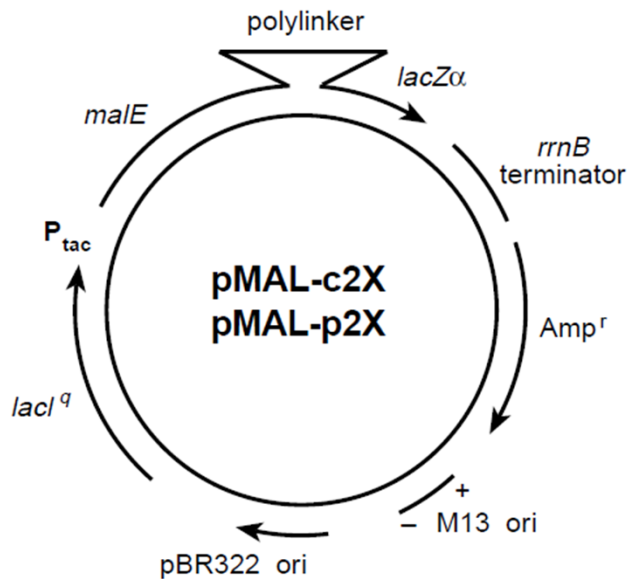
## 7. Anexos



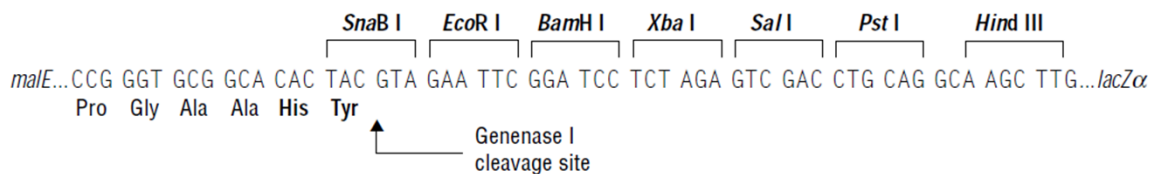
**ANEXO 1 - Mapa circular do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).** Desenho esquemático do vetor pGEM-T<sup>®</sup> Easy mostrando a origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência a ampicilina (Amp<sup>R</sup>), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem, localizado na região codificadora da enzima galactosidase (o que permite a seleção direta de clones positivos). O vetor pGEM-T<sup>®</sup> Easy apresenta 3` T em ambas extremidades, aumentando a eficiência de ligação direta de produtos de PCR. (Em <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>).



**ANEXO 2 - Mapa circular do vetor pROCK\_HIGRO.** Desenho esquemático do vetor pROCK\_HIGRO, utilizado para expressão permanente em *T. cruzi* de um gene de interesse. O vetor possui o promotor de rRNA, que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de Hx1 (derivada da região 5'UTR de TcP2β), um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*. Além disso, possui as regiões intergênicas e 3'UTR do gene GAPDH, sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do transcrito de Higo-R, que confere resistência a higromicina. A linearização do vetor com *NotI* permite a integração do vetor, através de recombinação homóloga, no *locus* de β-tubulina do DNA genômico do parasito. (Adaptado de DaRocha *et al.*, 2004)

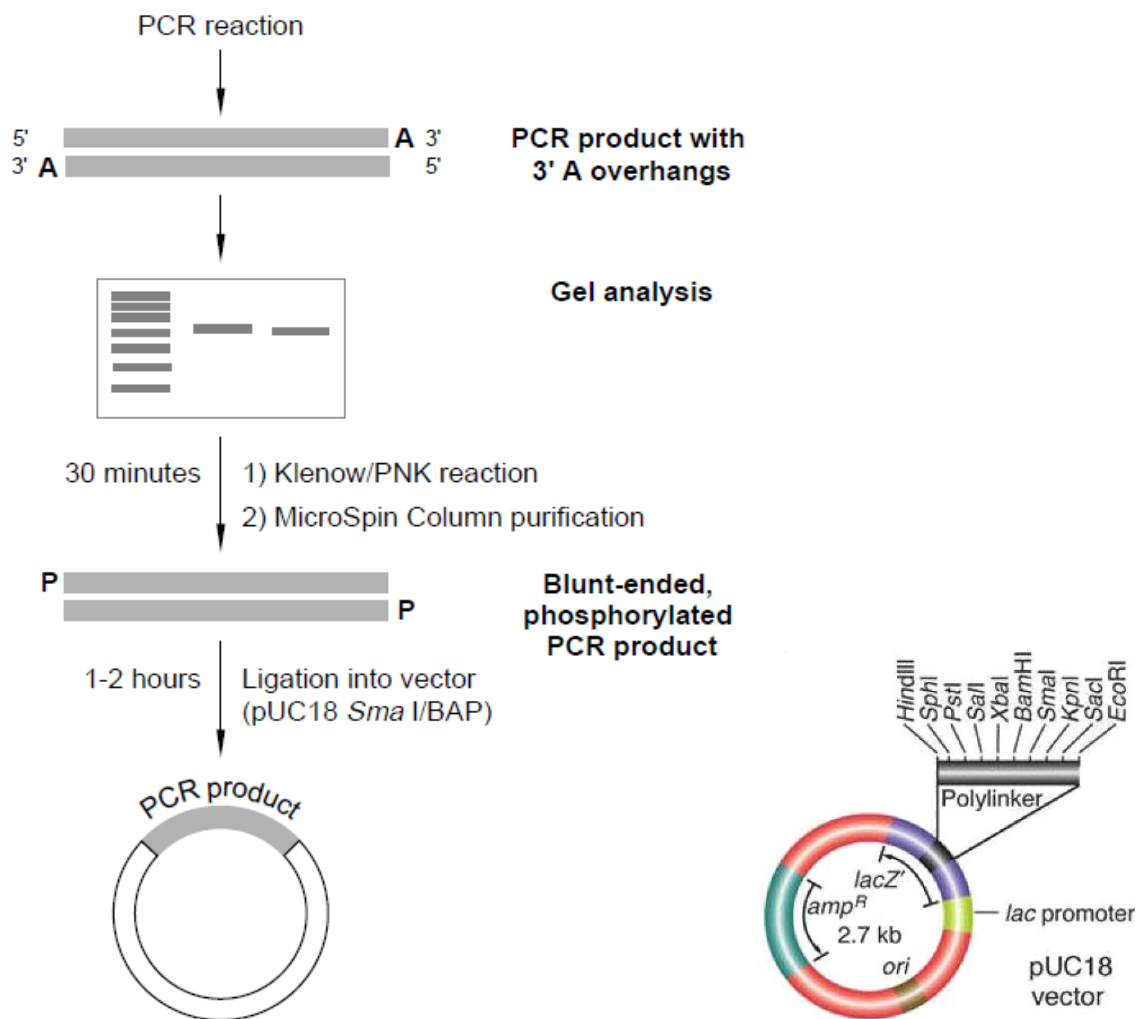


#### pMAL-c2G, pMAL-p2G Polylinker

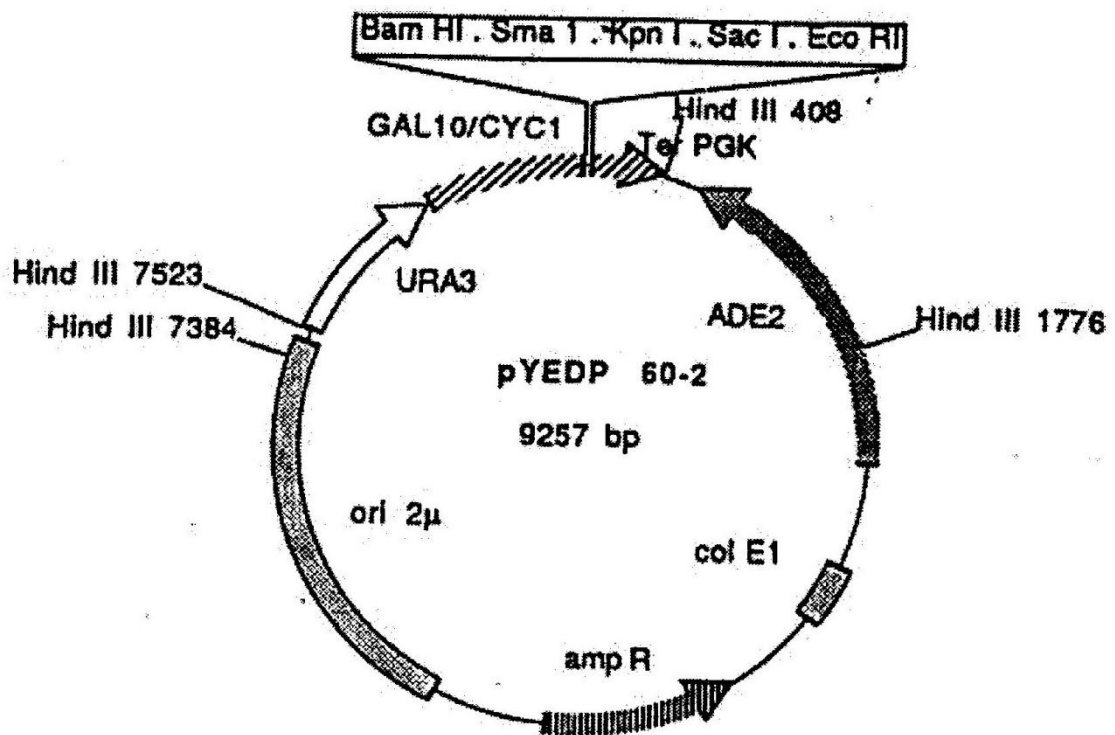


**ANEXO 3 - Mapa circular genérico dos vetores pMAL-c2 e sítio múltiplo de clonagem específico do vetor pMAL-c2G.** O sítio múltiplo de clonagem está localizado entre a seqüência de *malE* (que codifica MPB) e *LacZ $\alpha$* , codificador da  $\beta$ -galactosidase. A expressão do gene de interesse em fusão com MBP é promovida pelo promotor TAC ( $P_{\text{tac}}$ ), induzido por IPTG, e por sinais de início de tradução de MBP. O vetor possui o gene de resistência a ampicilina ( $Amp^r$ ) e origem de replicação pBR322. *LacI<sup>q</sup>* codifica o repressor Lac, que inibe a expressão basal do gene de interesse na ausência de IPTG. (Em <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ExpressionSystems/NEBMaltose.pdf>).





**ANEXO 4 - Vetor pUC18 e SureClone® Ligation Kit.** À direita: representação esquemática do vetor pUC18, mostrando sítio múltiplo de clonagem (Polylinker), o gene de resistência à ampicilina ( $amp^R$ ), a origem de replicação (*ori*) e o gene *LacZ*, codificador da  $\beta$ -galactosidase, cuja expressão é interrompida pela clonagem do gene de interesse. À esquerda: etapas do processo de clonagem em pUC18 utilizando o SureClone® Ligation Kit (Amersham Biosciences). O produto de PCR é processado pela atividade exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  da Klenow (para a remoção da base A despareada presente nas extremidades  $3'$ ), purificado e então ligado no sítio de *Sma*I do vetor.



**ANEXO 5 - Mapa esquemático do vetor pYEDP.** O vetor pYEDP possui um sítio múltiplo de clonagem na região 3' do promotor GAL10/CYC1, que é ativado pela presença de galactose. O plasmídeo é capaz de replicar-se em *E. coli* e em *S. cerevisiae*. Possui o gene que confere resistência a ampicilina (amp<sup>R</sup>) e os marcadores URA3 e ADE2, que permitem que leveduras auxotróficas cresçam em meio desprovido de uracila e adenina, respectivamente. O vetor foi cedido pelo Prof. Francisco Nóbrega, da Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo.