

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Análise da expressão heteróloga da enzima MutT na
resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo
em *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum***

por

Laila de Carvalho Andrade

Belo Horizonte

2016

Laila de Carvalho Andrade

**Análise da expressão heteróloga da enzima MutT na
resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo
em *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr^a. Silvane Maria Fonseca Murta

Coorientação: Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A553a
2016

Andrade, Laila de Carvalho.

Análise da expressão heteróloga da enzima MutT na resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo em *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* / Laila de Carvalho Andrade. – Belo Horizonte, 2016.

XVI,55 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 68 - 71

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmanioses/enzimologia 2. *Leishmania braziliensis*/efeitos de drogas 3. *Leishmania infantum* /efeitos de drogas. I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Machado, Carlos Renato (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Laila de Carvalho Andrade

**Análise da expressão heteróloga da enzima MutT na
resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo
em *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr^a. Silvane Maria Fonseca Murta

Coorientação: Dr. Carlos Renato Machado

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra Silvane Maria Fonseca Murta (CPqRR) Presidente

Prof. Dr. Carlos Renato Machado (UFMG) Titular

Prof^a. Dra. Camila Carrião Machado Garcia (UFOP) Titular

Prof^a. Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (CPqRR) Titular

Prof^a. Dra. Ceres Luciana Alves (UMFG) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 24 / 02 / 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me permitiu realizar esse projeto do meu tão sonhado mestrado.

Agradeço aos meus pais, Silvana e Eugênio, pelo amor incondicional, carinho e dedicação durante todos esses anos para que pudesse me tornar quem sou hoje, sempre me incentivando aos estudos e torcendo pelo meu sucesso. Sou muito grata a vocês!

Agradeço ao Francisco pelo carinho, companheirismo e compreensão em todas as etapas por nós divididas e por respeitar meu sonho.

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta meus agradecimentos por todo ensinamento compartilhado não somente no mestrado, mas desde minha iniciação científica. Além de ter confiado a mim a realização desse projeto. Muito obrigada!

Ao Dr. Carlos Renato Machado agradeço pelo incentivo, orientação e disponibilização do seu laboratório para realização dos experimentos.

Agradeço à banca examinadora: Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira, Dra. Camila Carrião Machado Garcia e Dra. Ceres Luciana Alves por aceitarem o convite de participação em minha defesa.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ – MG, na pessoa da Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, por manter a excelência nos trabalhos científicos.

À coordenação do programa de Pós-Graduação do CPqRR.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, além da catalogação e normalização da mesma.

À Juvana agradeço pela amizade construída em 5 anos de René Rachou, onde não só ganhei uma colega de profissão, mas também uma grande amiga que me ensinou muito. Obrigada por todas as palavras de incentivo!

À Lívia agradeço pela amizade, que foi um dos grandes presentes que o mestrado me trouxe, e pelos momentos que compartilhou comigo nessa jornada nada fácil.

Agradeço à Ceres pelo auxílio em diversos experimentos no CPqRR e na UFMG. Muito obrigada pela sua disponibilidade em me ajudar.

Agradeço à Elisângela Coser e Renata de Barros, técnicas da Plataforma de Sequenciamento Sanger – CPqRR, pela prestação de serviços.

À Graziela de Paula agradeço no auxílio em alguns experimentos.

À Rosana Alves que me auxiliou diversas vezes dividindo seus conhecimentos para que os experimentos fossem realizados de acordo com as normas da Qualidade.

AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Agradeço à agência de fomento Capes pela bolsa de estudo concedida. Agradeço ao apoio financeiro das instituições CNPq – Projeto PROEP e Universal, FAPEMIG – Projeto PPM, CPqRR, Plataforma de sequenciamento de DNA - PDTIS/CPqRR que foi fundamental para a execução deste trabalho.

RESUMO

O estresse oxidativo é o grande responsável por gerar danos ao DNA uma vez que a ação de oxidantes produz lesões que podem ser deletérias para célula. A 8-oxoguanina (8-oxoG) é a lesão mais comumente encontrada no DNA, devido à guanina (seu precursor) ser a base nitrogenada que mais sofre oxidação, por causa do seu baixo potencial redox, que facilita essa ação. Quando a 8-oxoG não é reparada ela pode se ligar a adenina, formando um tipo de transverso G:C para T:A. Quando o DNA é replicado ocorre incorporação dessa base gerando quebras de duplas-fitas de DNA e causando morte celular. Por esse fato, a 8-oxoG é utilizada como biomarcador celular de estresse oxidativo. Nas bactérias a enzima MutT é responsável pelo reparo dessa base oxidada. Essa enzima é capaz de prevenir a incorporação de 8-oxoG no DNA, hidrolisando essa base no pool de nucleotídeos, impedindo que ela seja incorporada no DNA no momento de replicação. No banco de dados TriTrypDB o gene da MutT foi anotado em algumas espécies de *Leishmania*, mas ainda não existem estudos de caracterização desse gene. Para investigar o papel do gene *mutT* em *Leishmania*, nesse estudo fizemos a análise da expressão heteróloga da enzima MutT na resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo em *L. braziliensis* e *L. infantum*. O gene *mutT* de *E. coli* foi clonado no vetor pGEM-T easy e sequenciado para comprovar a correta sequência nucleotídica. Após subclonagem no vetor específico para expressão gênica em *Leishmania*, pIR1-BSD, a construção pIR1-BSD-MutT foi transfectada em *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os parasitos foram plaqueados em meio semissólido contendo Blastidina (BSD). A análise de PCR mostrou que as colônias que cresceram na presença de blastidina foram positivas para o marcador BSD. A análise de RT-PCR com iniciadores específicos para os genes *mutT* e DNA polimerase (gene constitutivo) mostrou a presença do gene *mutT* em todos os clones analisados. Dois clones de cada espécie foram utilizados para análise fenotípica. Análises de susceptibilidade destes parasitos ao antimônio trivalente (SbIII) mostraram que a superexpressão do gene *mutT* em ambas espécies de *Leishmania* não alterou o fenótipo de resistência a esse composto. Analisamos também a defesa desses parasitos contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Os resultados mostraram que *L. infantum* é mais resistente ao H₂O₂ do que *L. braziliensis*. Além disto, observamos que as formas promastigotas de *L. braziliensis* superexpressoras do gene *mutT* de *E. coli* foram mais resistentes ao tratamento com H₂O₂ quando comparadas com os parasitos não transfectados. Entretanto em *L. infantum*, a MutT parece não estar envolvida na proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Análise do ciclo celular mostrou que *L. braziliensis* após o tratamento com H₂O₂ permanece por mais tempo na fase subG1, apresentando portanto demora para retornar o seu ritmo normal de crescimento. Por outro lado, *L. infantum* apresentou um perfil clássico de ciclo celular e os parasitos após o tratamento com H₂O₂ retomam o seu crescimento normal. Provavelmente esse resultado é devido à menor incorporação de 8-oxoG pela *L. infantum* comparado com *L. braziliensis* gerando assim menor número de quebras de fitas-duplas no DNA. Posteriormente investigamos a influência do estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ no perfil cromossomal dos parasitos superexpressores de MutT utilizando a metodologia de PFGE. O perfil das bandas cromossomais na presença e ausência de estresse foram similares entre os parasitos parentais e os superexpressores de MutT. Concluindo, nossos resultados indicam que a enzima MutT em *L. braziliensis* é importante para a defesa contra o estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, MutT, reparo de DNA, 8-oxoG, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Oxidative stress is responsible for generating DNA damage since that the oxidizing action produces lesions that may be deleterious to cell. The 8-oxoguanine (8-oxoG) is the lesion most commonly found in DNA damage due to guanine (its precursor) be a nitrogenous base that most suffers oxidation, due to its low potential redox, which facilitates this action. When the 8-oxoG is not repaired it can bind to adenine, forming a type of transversion G:C to T:A. When DNA is replicated this base is incorporated generating double-strand DNA breaks and cellular death. Then, the 8-oxoG is used as a cellular biomarker of oxidative stress. Bacteria have the MutT enzyme that hydrolyzes this oxidized base. This enzyme hydrolyzes the 8-oxoG base in the nucleotide pool, preventing its incorporation during DNA replication. In the TriTrypDB database the *mutT* gene has been described in some *Leishmania* species, but no characterization studies of this gene was performed yet. In order to investigate the role of *mutT* gene in *Leishmania*, in this study we analyzed the heterologous expression of MutT enzyme in drug-resistance phenotype and defense against oxidative stress in *L. braziliensis* and *L. infantum*. The *mutT* gene from *E. coli* was cloned into pGEM vector and sequenced to confirm the correct nucleotide sequence. After subcloning this gene into pIR1-BSD vector, the pIR1-BSD-*mutT* construct was transfected into *L. braziliensis* and *L. infantum*. The parasites were plated on semi-solid medium containing Blasticidin (BSD). PCR analysis showed that colonies grown in the presence of blasticidin were positive for selectable marker BSD. RT-PCR analysis using specific primers for *mutT* and DNA polymerase genes (constitutive gene) showed the presence of *mutT* gene in all clones analyzed. Two clones of each species were used for phenotypic analysis. Susceptibility analysis of these parasites to trivalent antimony (SbIII) showed that MutT-overexpressors parasites from both *Leishmania* species did not change the SbIII-susceptibility phenotype. We also analyzed the defense of parasites against oxidative stress generated by hydrogen peroxide (H₂O₂). The results showed that *L. infantum* is more resistant to H₂O₂ than *L. braziliensis*. In addition, we observed that *L. braziliensis* MutT-overexpressors clones were more resistant to H₂O₂ treatment than its parental non-transfected parasites. However in *L. infantum*, the MutT is not involved in protection against oxidative stress generated by H₂O₂. Cell cycle analysis showed that *L. braziliensis* after treatment with H₂O₂ remains in subG1 phase, taking longer time to return to its normal growth rate. In contrast, *L. infantum* showed a classical cell cycle profile and parasites after treatment with H₂O₂ return to their normal growth. Probably these results are due to 8-oxoG lower incorporation by *L. infantum* compared with *L. braziliensis* thus generating few number of double-strand DNA breaks. Subsequently we investigated the influence of oxidative stress generated by H₂O₂ in chromosomal profile of MutT-overexpressors parasites using the PFGE methodology. The profile of chromosomal bands in the presence and absence of stress were similar between parental and MutT-overexpressors parasites. In conclusion, our results showed that the MutT enzyme in *L. braziliensis* is important in the defense against oxidative stress generated by hydrogen peroxide.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, MutT, DNA repair, 8-oxoG, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica das áreas endêmicas de leishmanioses cutânea e visceral no mundo.....	18
Figura 2: Agente etiológico	19
Figura 3: Vetor Flebotomíneo	19
Figura 4: Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	21
Figura 5: Formas clínicas da Leishmaniose	22
Figura 6: Via de defesa antioxidante dos tripanossomatídeos	25
Figura 7: Pareamento da 8-oxoG.....	26
Figura 8: Sistema de Reparo “GO”	27
Figura 9: Vetor pGEM [®] -T Easy.....	35
Figura 10: Construção plasmidial pIR1-BSD sub-clonado com a região codificante do gene MutT	37
Figura 11: Consulta ao TritypDB.....	43
Figura 12: Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene <i>mutT</i>	44
Figura 13: Mapa <i>in silico</i> da clonagem do gene <i>mutT</i> em vetor pIR1-BSD.....	45
Figura 14: Eletroforese para confirmação da posição da construção pIR1-BSD-MutT	45
Figura 15 Confirmação da transfecção de <i>L. braziliensis</i>	46
Figura 16: Confirmação da transfecção de <i>L. infantum</i>	47
Figura 17: RT-PCR semiquantitativo de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	48
Figura 18: Crescimento dos parasitos <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	49
Figura 19: Teste de susceptibilidade de <i>L. braziliensis</i> ao SbIII	50
Figura 20: Teste de susceptibilidade de <i>L. infantum</i> ao SbIII	51
Figura 21: Gráfico de sobrevivência de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> ao tratamento com H ₂ O ₂ (Parentais)	52
Figura 22: Gráficos de sobrevivência de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> ao tratamento com H ₂ O ₂	55
Figura 23 Teste de susceptibilidade de <i>L. braziliensis</i> ao H ₂ O ₂	55
Figura 24 Análise comparativa do ciclo celular de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	56

Figura 25 Análise comparativa do ciclo celular de <i>L. braziliensis</i> parental e seus clones superexpressores de MutT	57
Figura 26 Perfil cromossômico por PFGE	59
Figura 27 Modelo proposto para explicar as diferenças da resposta ao estresse oxidativo em <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Formas Clínicas da Leishmaniose	21
Quadro 2: Espécies e cepas de <i>Leishmania</i> utilizadas no estudo	31
Quadro 3: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões alvo.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG – 8-oxoguanina

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

8-oxodGTP – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

% – Porcentagem

°C – Grau Celsius

μF – Microfarad- Unidade de capacitância

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

aa. – Aminoácido

AP –apurínico/apirimidínico

BER – reparo por excisão de base

BgIII – Endonuclease de restrição

BSA – Albumina bovina sérica

BSD – Blastidina

BZ - Benznidazol

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA – DNA complementar

CDC – *Center of Disease and Prevention Control*

CIAP – Fosfatase Alcalina de Intestino de bezerro

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

DDW - Deuterium-depleted water

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfato

DTT – Ditioneitol

DSB – Quebra de fita dupla de DNA

E. coli – *Escherichia coli*

EcoRI – Endonuclease de restrição

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

F – *Forward*

Fe²⁺ – Íon ferro

g – Grama
h – Hora
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
HindIII – Endonuclease de restrição
HPLC/EC – *High Performance Liquid Chromatography/ Eletrochemical Detection*
IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ – Interferon Gama
IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb – Kilobases
KCl – Cloreto de potássio
K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico
L – Litros
(L.) – Subgênero *Leishmania*
LB – meio Luria Bertani
M – Molar
M199 – Meio de cultura para *Leishmania*
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mL – mililitros
mM – milimolar
min – Minutos
MQ – MiliQ
MTH – Homólogo de MutT
mRNA – RNA mensageiro
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
ng – nanogramas
NaOH – Hidróxido de sódio
ND - Nanodrop
nm – Nanômetro
O₂⁻ – Ânion superóxido

OH⁻ – Radical hidroxila
oligo-d(T) – pequena sequência de nucleotídeos de deoxitimina
pb – Pares de bases
PBS – Tampão salina fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis*
pH – Potencial hidrogeniônico
pmoles – Picomoles
PSG – tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e glicose
p/v – massa/volume
q.s.p. – Quantidade Suficiente Para
R – *Reverse*
RNA – Ácido ribonucléico
RNase – Ribonuclease
ROS – *Reactive Oxygen Species*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR*
s – Segundos
SbIII – Antimonial trivalente
SDS – Dodecil sulfato de sódio
spp. – Espécie
Swa I – Endonuclease de restrição
TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral - alfa
TOP 10F' – Linhagem da bactéria *E. coli*
Tris – Tri-hidroximetil amino metano
U – Unidade
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
V – Voltagem
(V.) – Subgênero *Viannia*
v/v – volume/volume
xg – Força G
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo
TBE – Tampão Tris-borato EDTA, pH 8,0
OGG1 – 8-oxoguanina DNA glicosilase

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

8-oxodGTP – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
1.1	Epidemiologia.....	17
1.2	Agente etiológico e vetor.....	18
1.3	Ciclo Biológico do parasito.....	19
1.4	Manifestações clínicas da Leishmaniose.....	21
1.5	Tratamento das leishmanioses.....	23
1.6	Estresse Oxidativo e danos ao DNA.....	24
1.6.1	A 8-oxoguanina.....	25
1.6.2	Via de reparo da 8-oxoguanina.....	26
1.6.3	MutT.....	27
2	Justificativa.....	29
3	Objetivos.....	30
3.1	Geral.....	30
3.2	Específicos.....	30
4	Materiais e Métodos.....	31
4.1	Linhagens de <i>Leishmania</i> spp. e condições de cultivo.....	31
4.2	Extração de DNA de <i>E. coli</i>	31
4.3	Extração de RNA Total.....	32
4.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.5	Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	33
4.6	Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida.....	33
4.7	Purificação do produto de PCR.....	33
4.8	Preparação de bactérias cálcio-competentes.....	34
4.9	Clonagem do gene MutT.....	34
4.10	Sequenciamento.....	36
4.11	Sub-clonagem dos genes no vetor pIR1-BSD de <i>Leishmania</i>	36
4.12	Transfecção.....	38
4.13	Extração de DNA método Quick Prep.....	38
4.14	RT-PCR semi-quantitativo.....	39
4.15	Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente (SbIII).....	40
4.16	Teste de susceptibilidade dos parasitos ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	40
4.17	Análise do ciclo celular.....	41
4.18	Eletroforese em Pulso Alternado (Pulsed-field Gel Electrophoresis – PFGE).....	41
4.19	Análise estatística.....	42
5	Resultados.....	43
5.1	Consulta ao banco de dados.....	43
5.2	Expressão heteróloga do gene MutT.....	44
5.3	Confirmação da expressão do gene MutT.....	47
5.4	Análise da curva de crescimento dos parasitos parentais e transfectados com o gene mutT.....	48
5.5	Teste de susceptibilidade dos parasitos superexpressores de MutT ao tratamento ao SbIII.....	49
5.6	Análise de sobrevivência dos parasitos superexpressores de MutT ao estresse oxidativo gerado pelo H ₂ O ₂	51
5.7	Análise do ciclo celular.....	56
5.8	Análise do efeito do estresse oxidativo causado pelo H ₂ O ₂ no perfil cromossômico dos parasitos transfectados com o gene da MutT.....	58
6	Discussão.....	60
7	Resumo dos resultados.....	65
8	Conclusão.....	66
9	Perspectivas.....	67
	Referências.....	68

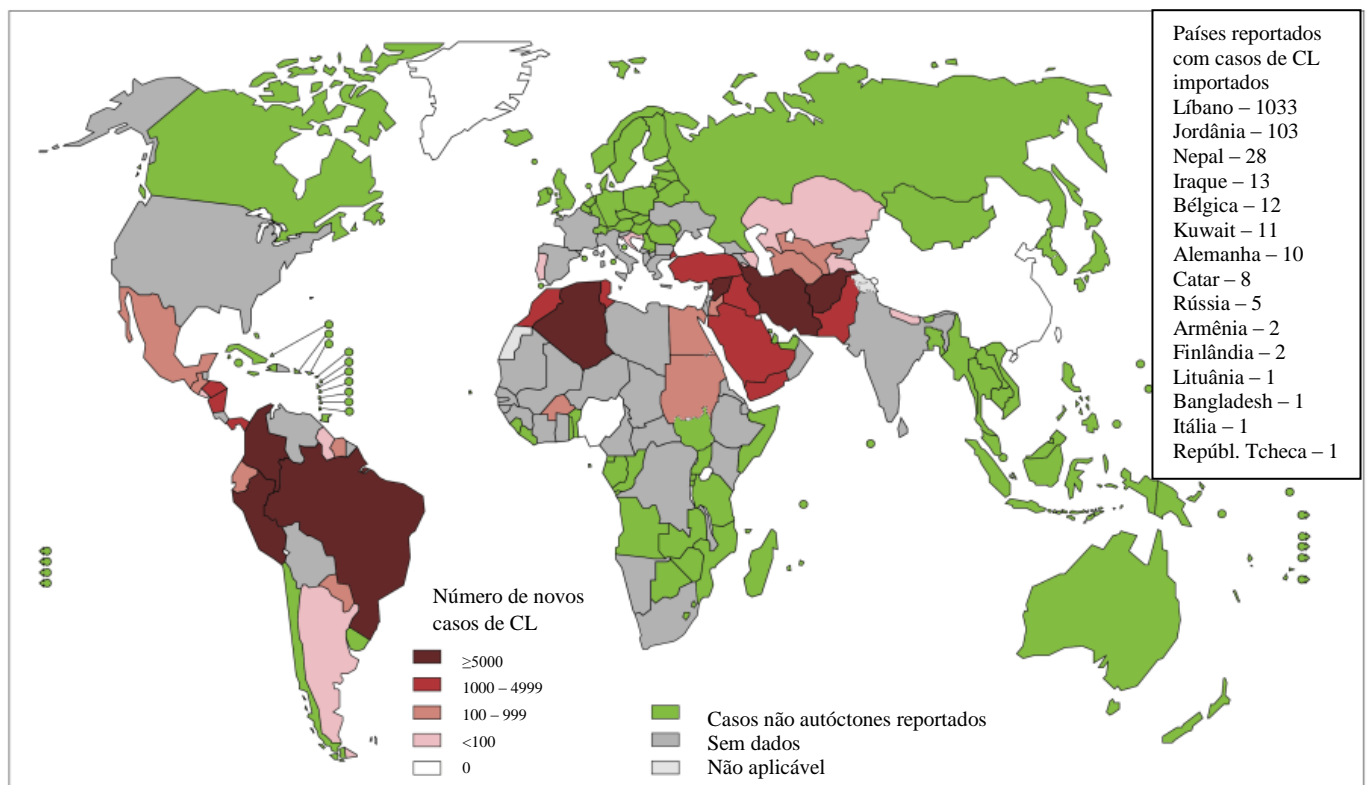
1 Introdução

1.1 Epidemiologia

As leishmanioses fazem parte do grupo de doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde, estando diretamente ligadas à pobreza, más condições de moradia, desnutrição e, sobretudo com a urbanização das áreas rurais (WHO, 2015). Elas são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, e são endêmicas em aproximadamente 88 países (FIG. 1) localizados nas áreas tropicais e subtropicais (66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo), incluindo o Brasil e o sudoeste da Europa, onde estima-se que 310 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção (DESJEUX, 2004; JOHN, JOHN e KHOLIA, 2012; WHO, 2015).

Por ano, ocorrem aproximadamente 1.6 milhão de novos casos, sendo 1.2 milhão destes de leishmaniose tegumentar e 400 mil de casos de leishmaniose visceral. Assim, são de grande importância novos estudos de controle das leishmanioses (WHO, 2015).

Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2013



Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013

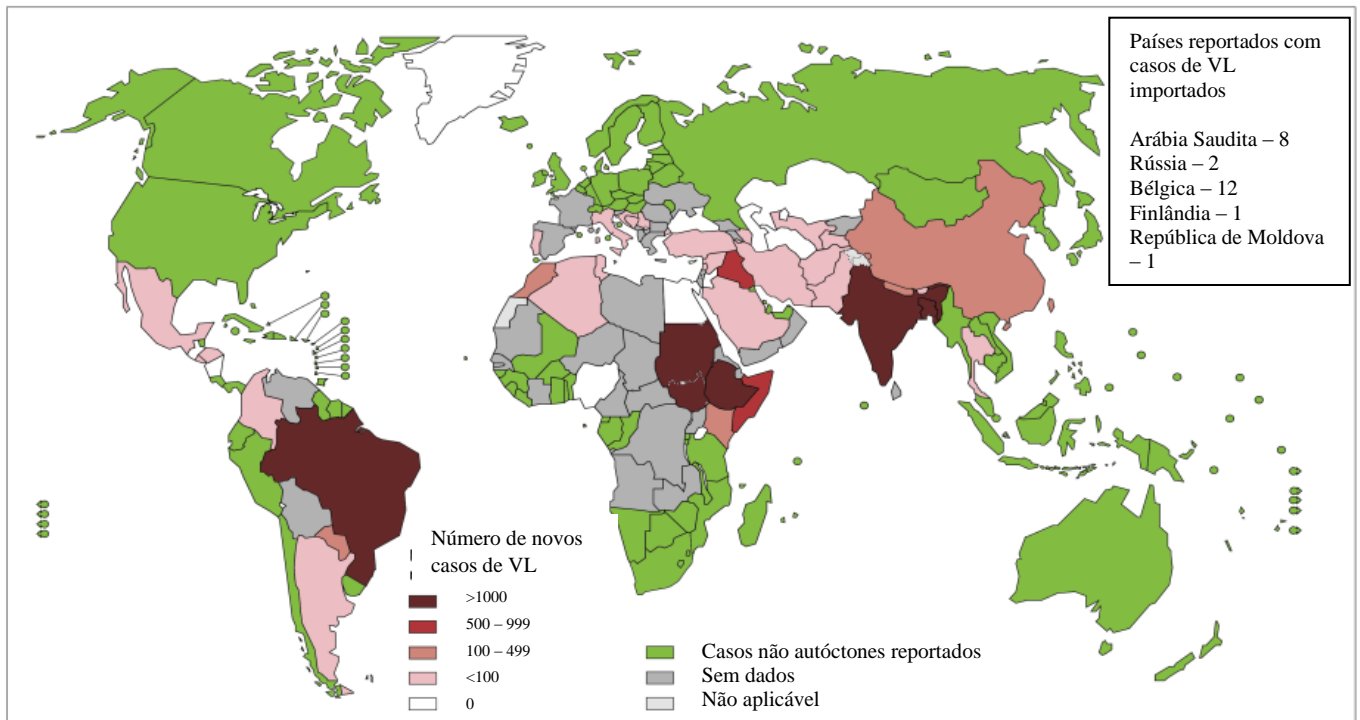


Figura 1: Distribuição geográfica das áreas endêmicas de leishmanioses cutânea e visceral no mundo. **Fonte:** adaptado de WHO, 2015.

1.2 Agente etiológico e vetor

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Os kinetoplastídeos apresentam como características específicas mitocôndria e flagelo únicos, sendo que a primeira se ramifica por todo corpo do parasito. Eles também possuem uma grande quantidade de DNA organizado na forma de minicírculos (kDNA), que está concentrado em uma determinada região da mitocôndria que irá originar uma organela capaz de autorreplicação, o cinetoplasto (SOUZA *et al.* 2000; MICHALICK, 2002).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, o *Viannia* e o *Leishmania*, e são diferenciados de acordo com a porção do intestino do hospedeiro invertebrado em que o parasito irá se desenvolver. No primeiro o parasito se desenvolve nas porções anterior, média e posterior, já no segundo subgênero a *Leishmania* irá habitar o intestino anterior e médio (MICHALICK, 2002; REY, 1991).

A *Leishmania* apresenta diversas formas evolutivas devido à diferenciação celular que ocorre no parasito principalmente durante a transição de um hospedeiro para o outro. Essa diferenciação também pode ocorrer como forma de adaptação fisiológica em um mesmo hospedeiro, e se apresentam nas formas promastigotas, que se desenvolvem no vetor, e amastigotas (sem flagelo aparente) que parasitam o sistema mononuclear

fagocitário do hospedeiro vertebrado (FIG. 2). As promastigotas são longas, flageladas e extracelulares, enquanto as amastigotas são esféricas com flagelo internalizado (MICHALICK, 2002; REY, 2001).

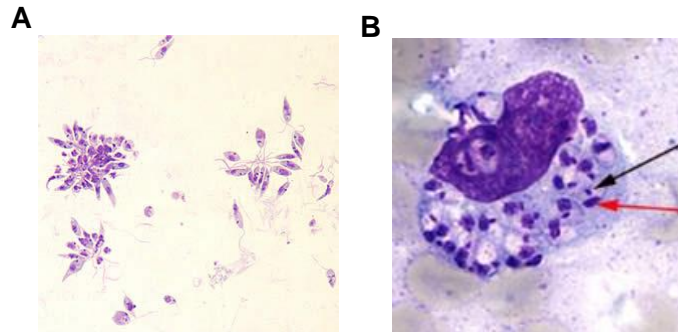


Figura 2: Agente etiológico. Formas promastigotas **(A)** e amastigotas **(B)** de *Leishmania*. **Fonte:** Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC).

O vetor da *Leishmania* (FIG. 3) são insetos hematófagos fêmeas, da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (DESJEUX, 2004; BATES, 1994).



Figura 3: Vetor Flebotomíneo. **Fonte:** CDC.

1.3 Ciclo Biológico do parasito

O ciclo biológico da *Leishmania* (FIG. 4) é heteroxênico, ou seja, acontece em dois hospedeiros, um invertebrado (flebotomíneo) e outro vertebrado (mamíferos). Assim, ele se inicia durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, quando a fêmea do inseto vetor ingere macrófagos contendo as formas amastigotas intracelulares ou amastigotas extracelulares do parasito. Ao longo do trato digestivo do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação destes parasitos, que se aderem às microvilosidades intestinais e se diferenciam em formas promastigotas, que por sua vez também se reproduzem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o

esôfago e a faringe do vetor. Elas permanecem aderidas ao epitélio, e então se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas para o hospedeiro vertebrado) por um processo denominado metaciclogênese. Essas formas por sua vez migram para a porção anterior do intestino do vetor. Durante o repasto sanguíneo, essas formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelo flebotomíneo e elas atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea, esses parasitos são fagocitados por macrófagos e /ou outros tipos celulares do sistema fagocitário mononuclear. Esse processo ocorre devido à ação quimiotática dessas células e substâncias imunorreguladoras, assim os parasitos são internalizados nos macrófagos, sem sofrer ação dos mesmos. As promastigotas metacíclicas (forma infectante) são resistentes à lise mediada por complemento, devido ao LPG (lipofosfoglicano) presente em sua superfície, que protege o parasito da ação de produtos liberados durante a atividade respiratória celular do hospedeiro vertebrado (Óxido nítrico, superóxidos, radicais livres e OH•). Além desse mecanismo, a *Leishmania* pode ser internalizada nos macrófagos por opsonização, sem estimular a atividade respiratória. Depois de fagocitados os parasitos transformam-se rapidamente em amastigotas para evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim devido a mudanças de temperatura e pH no interior dessas células, dentro do vacúolo parasitóforo, esses parasitos se diferenciam em formas amastigotas (BARAK *et al.*, 2005). Essas formas se reproduzem rapidamente por fissão binária, levando ao rompimento das células. Assim as formas amastigotas ficam livres para infectarem outras células ou podem ser ingeridas pelo inseto vetor durante novo repasto sanguíneo. No flebotomíneo as formas amastigotas se diferenciam em paramastigotas, promastigotas e em seguida através do processo de metaciclogênese se transformam em promastigotas metacíclicas, que são inoculadas pelas fêmeas de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo em mamíferos, reiniciando o ciclo (MICHALICK, 2002; BATES, ROGERS, 2004; WHO, 2015).

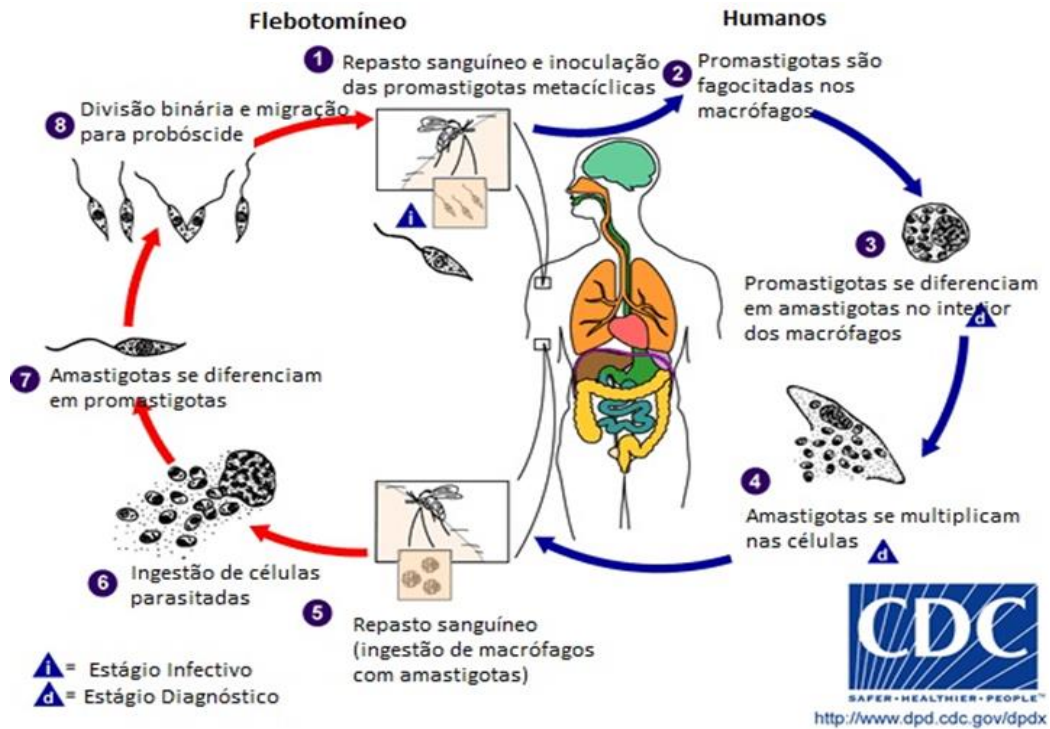


Figura 4: Representação do ciclo de vida de *Leishmania*. **Fonte:** Adaptado de CDC.

1.4 Manifestações clínicas da Leishmaniose

As principais manifestações clínicas das leishmanioses no homem são cutânea, mucocutânea e visceral, e estão relacionadas com a espécie infectante e a susceptibilidade do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2005; REY, 1991). Elas estão descritas a seguir no Quadro 1:

Quadro 1: Formas Clínicas da Leishmaniose

Síndromes Clínicas	Espécies	Descrição
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania (L.) tropica</i> / <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	Produz lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas.
Leishmaniose mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	Produz lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe.
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Produz lesões crônicas e disseminadas na pele. Erupções papulares ou nodulares não ulcerosas.

Leishmaniose visceral	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i> = <i>L.(L.) chagasi</i>	Os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfoides, produzindo lesões nesses órgãos.
-----------------------	--	--

Fonte: Adaptado de Murray *et al.*, 2005.

A leishmaniose cutânea produz lesões na pele, sendo elas ulcerosas ou não, e podem desaparecer de forma espontânea em alguns indivíduos, porém elas podem causar desfigurações. A leishmaniose mucocutânea, causada pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. V. guyanensis*, provoca ulcerações que destroem as mucosas das regiões de boca (palato), nariz, faringe e laringe. A leishmaniose difusa, causada pela *L. (L.) amazonensis*, está associada a uma deficiência imunológica do hospedeiro, e por possuir caráter crônico e progressivo, os tratamentos convencionais não são muito eficazes (MICHALICK, 2002; MURRAY *et al.*, 2005; WHO, 2015).

A leishmaniose visceral, causada pela *L. infantum* (sinonímia *L. L. chagasi* no Novo Mundo), é a forma mais grave da doença, podendo levar a óbito se não for tratada. Ela é responsável pelo acometimento de diversos órgãos como baço e fígado e também a medula óssea. Após alguns meses de infecção (2 a 6 meses) os pacientes apresentam febre, fadiga, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. E também pode haver perda de função e carga parasitária sanguínea (CHAPPUIS *et al.*, 2007; CROFT *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2011).

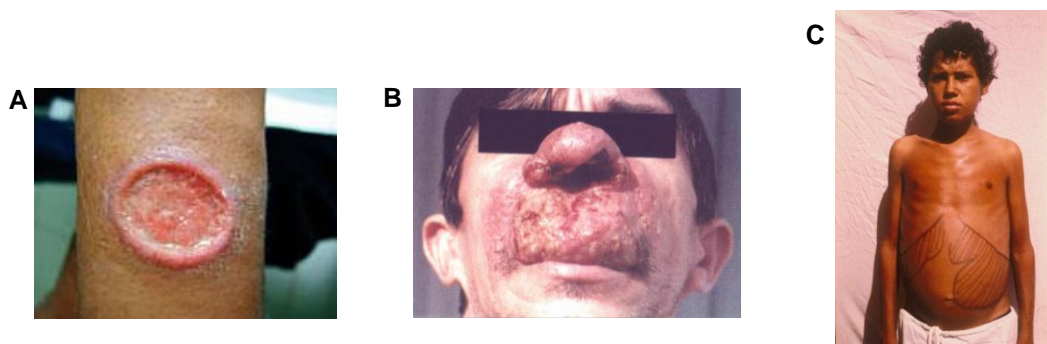


Figura 5: Formas clínicas da Leishmaniose. **A)** Leishmaniose cutânea. **B)** Leishmaniose mucocutânea. **C)** Leishmaniose Visceral. **Fontes:** **A)** Medifoco, **B)** UFPE e **C)** MD Saúde.

1.5 Tratamento das leishmanioses

A quimioterapia das leishmanioses é feita com a administração de drogas que contenham o sal orgânico antimônio pentavalente, elas são o Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostam®) (HERWALDT, 1999; MURRAY *et al.*, 2005; ROBERTS *et al.*, 1998). Esses compostos têm sido usados como droga de primeira linha no tratamento de todas as formas de leishmaniose. No Brasil, apenas o Glucantime está disponível para o tratamento clínico das leishmanioses e ele é distribuído gratuitamente pelo Sistema único de Saúde (SUS). Compostos de antimônio são muito tóxicos apresentando efeitos colaterais graves no paciente como: anorexia, vômito, náuseas, mialgia, artralgia, letargia e outros (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Em países como a Índia, em que a *Leishmania* apresenta alto índice de resistência ao antimonial pentavalente, a outra droga de escolha é a Anfotericina B (GUERIN *et al.*, 2002). Além dessas duas, outros fármacos são usados no tratamento das leishmanioses, como as pentamidinas, anfotericina B lipossomal, a paramomicina e a miltefosina. As pentamidinas são utilizadas para o tratamento de leishmaniose tegumentar na América do Sul. Já anfotericina B lipossomal é a droga mais efetiva no tratamento da leishmaniose visceral, e também é utilizada no tratamento da leishmaniose mucocutânea e dermal pós-calazar. A paramomicina é utilizada na Índia e no leste da África para tratar a leishmaniose visceral e é utilizada na formulação tópica com associações para tratamento da leishmaniose cutânea. A miltefosina é administrada oralmente para tratar a leishmaniose visceral e alguns casos de leishmaniose cutânea. Apesar de diminuir drasticamente o tempo de tratamento essa droga é teratogênica, sendo contraindicada a gestantes (MURRAY *et al.*, 2005; CROFT, OLLIARO, 2011).

Os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que sofrem redução biológica para a forma trivalente SbIII para ter atividade leishmanicida (OUELLETTE *et al.*, 2004). Estudos sugerem que o SbV inibe a síntese de macromoléculas em amastigotas (BERMAN *et al.*, 1985), possivelmente alterando o metabolismo energético, glicólise e oxidação de ácidos graxos (BERMAN *et al.*, 1987). Dados também revelaram que o antimonial induz um processo de apoptose, envolvendo a fragmentação do DNA e a exteriorização de fosfatidilserina (SERENO *et al.*, 2001). Outros estudos mostram que o antimonial trivalente SbIII causa distúrbios no potencial tiol redox do parasito, com efluxo de tióis intracelulares, tripanotiona e glutatona, inibindo a enzima tripanotiona redutase, o que levaria a morte do parasito (WYLLIE *et al.*, 2004 e 2010).

1.6 Estresse Oxidativo e danos ao DNA

Birben (2012) define o estresse oxidativo como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes que potencialmente pode gerar danos. As espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS) são as principais fontes de estresse oxidativo nos organismos. Essas espécies são compostos derivados a partir do metabolismo do oxigênio, altamente reativos e que podem causar danos em nível celular e molecular. As principais ROS são radical ânion superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\bullet). O H_2O_2 é um produto de oxidação muito importante na geração do estresse oxidativo, devido sua habilidade de se difundir nas membranas biológicas, pois ele irá gerar o radical OH^\bullet , através das reações de Fenton, que é catalisada pelo Fe^{2+} , e Haber-Weiss, que possui participação do O_2^\bullet . As ROS podem ser produzidas a partir de fontes endógenas (fosforilação oxidativa e ação da NADPH oxidase) ou exógenas (ação de quimioterápicos e radiação ultravioleta) (FINKEL, HOLBROOK, 2000; KLAUNIG, KAMENDULIS, 2004; NOVO, PAROLA, 2008;).

A oxidação representa o principal fator endógeno de lesões no DNA, podendo causar instabilidade genômica e morte celular. Essas lesões podem causar quebras nas fitas simples ou dupla de DNA (DSB), sendo altamente deletérias se forem inseridas no momento da replicação do DNA (VAN LOON *et al.*, 2010; DAVID *et al.*, 2007).

Os organismos possuem defesas antioxidantes, que irão impedir que metabólitos gerados durante o estresse oxidativo ocasionem algum tipo de dano ao organismo. E apesar dos tripanossomatídeos serem desprovidos de catalase e glutathione peroxidase, a sua habilidade em lidar com o estresse oxidativo se mostra eficiente (FINZI, 2004). A defesa antioxidante dos tripanossomatídeos é baseada no sistema da tripanotiona redutase, que utiliza a tripanotiona como principal transportador de elétrons, que mantém o ambiente intracelular reduzido (TURRENS, 2004) (FIG. 6). Várias enzimas atuam nesse sistema (Ferro Superóxido Dismutase, Ascorbato Peroxidase, Triparedoxina Peroxidase e Tripanotiona Redutase).

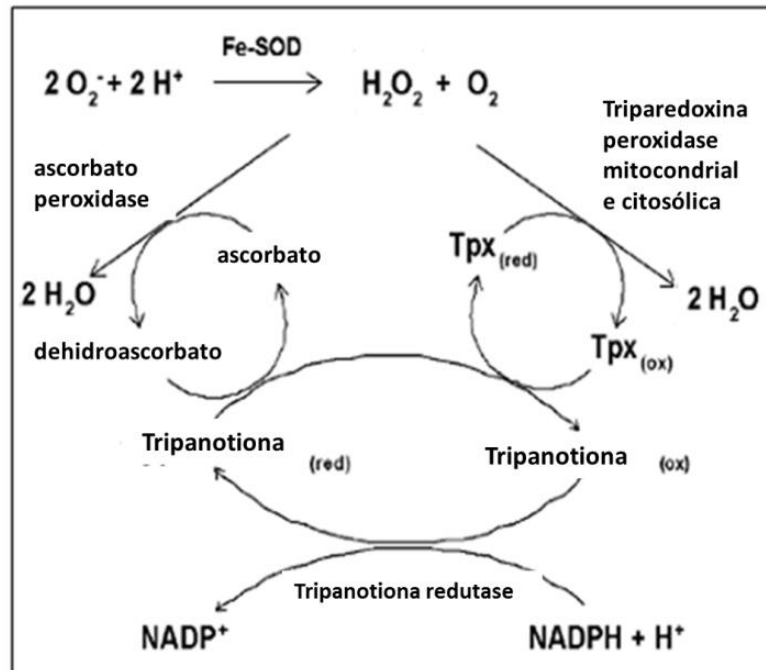


Figura 6: Via de defesa antioxidante dos tripanossomatídeos.
Fonte: Adaptado de Turrens, 2004.

1.6.1 A 8-oxoguanina

O produto de oxidação por ROS da guanina (dGTP) é a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (ou simplesmente 8-oxoguanina, 8-oxoG). Essa base possui um baixo potencial redox, por isso ela é facilmente oxidada (FIG. 7 A). Assim, a 8-oxoG é conhecida por induzir transversões do tipo G-C: T-A, quando está presente durante a síntese de DNA (DAVID *et al.*, 2007; MAKI, SEKIGUCHI, 1992; NEELEY, ESSIGMAN, 2006; SHIBUTANI *et al.*, 1991). Essas transversões ocorrem devido a 8-oxoG ser potencialmente mutagênica na conformação *syn*, pois ela consegue mimetizar a timina (T), pareando então com uma adenina (A) (FIG. 7 C), o que aumenta a chance de pareamentos errados (SETOYAMA, 2011). Quando a 8-oxoG faz o pareamento com Adenina (A(*anti*):8-oxoG(*syn*)) ela causa menos distorções no DNA que será replicado comparado ao par C(*anti*): 8-oxoG(*anti*) (FIG. 7 B), além de conseguir passar por DNA polimerases replicativas. Dessa forma, se muita 8-oxoG for incorporada, poderá ocorrer morte celular (HSU *et al.*, 2004). Devido seu alto poder de causar lesões no DNA, a 8-oxoG é utilizada como biomarcador celular de estresse oxidativo (NEELEY, ESSIGMAN, 2006).

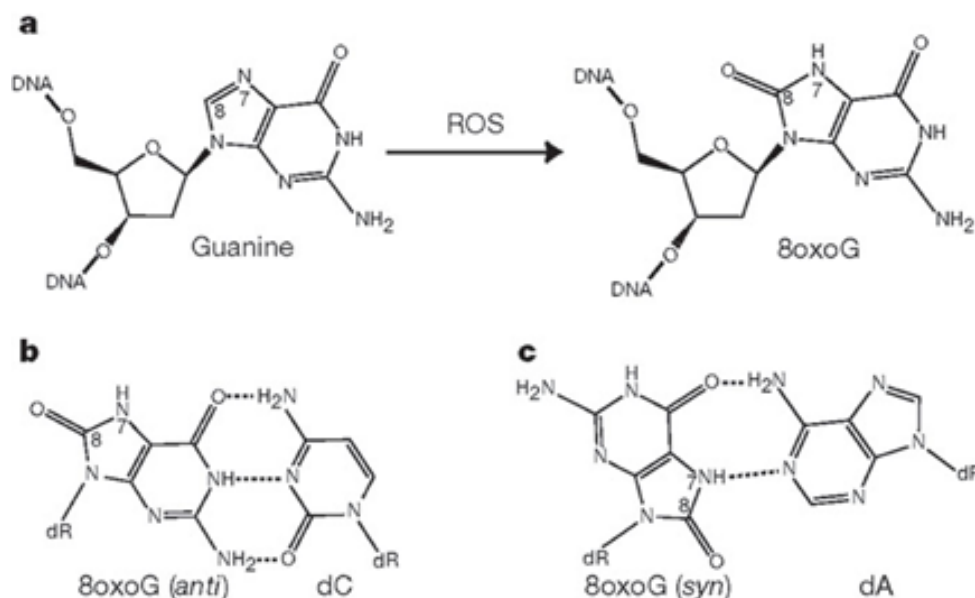


Figura 7: Pareamento da 8-oxoG. **A)** oxidação do carbono 8 por ROS. **B)** 8oxoG na conformação *anti* pareada com dC (citosina). **C)** 8oxoG na conformação *syn* pareada com dA (adenina). **Fonte:** Hsu *et al.*, 2004.

1.6.2 Via de reparo da 8-oxoguanina

As enzimas de bactéria, MutT, MutY e MutM/fpg, homólogas em eucariotos da MTH1, da MutYH e da OGG1, respectivamente, são as responsáveis pela via de reparo da 8-oxoguanina (Sistema "GO") (FIG.8) (DAVID *et al.*, 2007). A MutM ou OGG1, é uma glicosilase responsável pelo reparo por excisão de base (BER), portanto ela é capaz de remover a guanina oxidada quando ela está pareada com citosina (8-oxoG:C). Após a remoção da base mal pareada, outras enzimas da via BER são recrutadas para o sítioapurínico/apirimidínico (AP) e reestabelecem o pareamento correto de G:C (BOITEUX *et al.*, 1987; DAVID *et al.*, 2007; VAN DER KEMP *et al.*, 1996). A MutY ou MutYH é responsável por remover a adenina incorporada frente a 8-oxoG, caso a mesma não tenha sido excisada pela MutM. Essa remoção é importante, pelo fato das DNA polimerases replicativas possuírem preferência pela adenina do par 8-oxoG:A, que se forem formados podem levar a um molde DNA defeituoso (DAVID *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2004). Já a MutT ou MutTH1 é capaz de prevenir a incorporação da 8-oxoG, do pool de nucleotídeos, no DNA molde (DAVID *et al.*, 2007; MAKI, SEKIGUCHI, 1992). A MutT não é uma enzima de reparo, ela previne o dano no DNA.

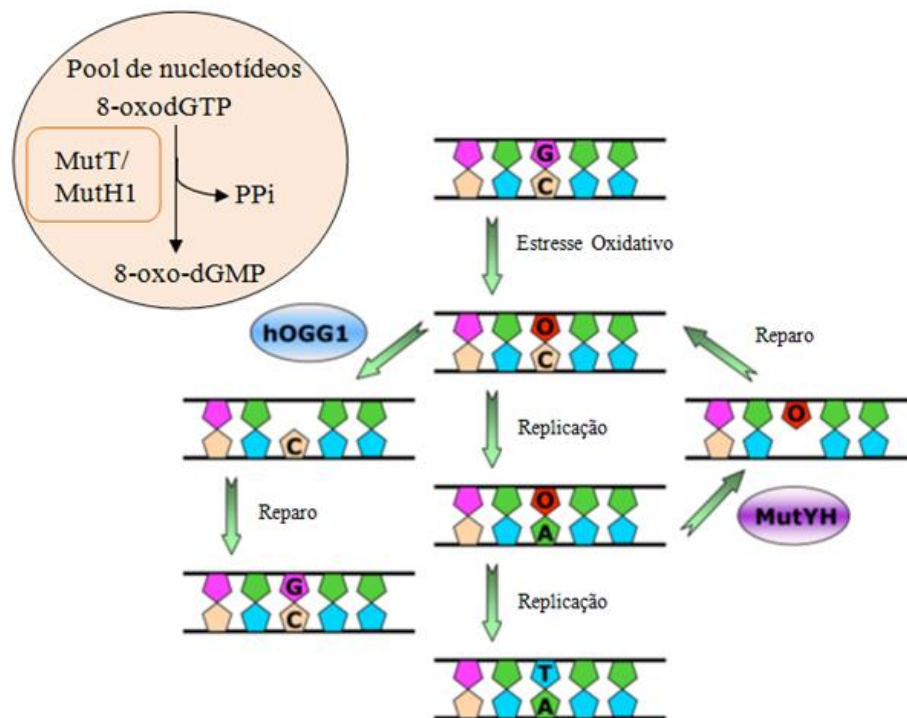


Figura 8: Sistema de Reparo “GO”. Representação do Sistema “GO” de humanos que age no reparo por excisão de bases. Ele é composto pelas enzimas MutH1 homóloga a MutT, OGG1 homóloga a MutM e MutYH homóloga a MutY. A MutM é responsável por remover a citosina quando forma par com a 8-oxoG; a MutY remove a adenina pareada com a 8-oxoG, e a MutT previne a incorporação da 8-oxoG frente a essas bases antes da replicação. **Fonte:** adaptado de David *et al.*, 2007.

1.6.3 MutT

O gene da enzima MutT da bactéria *Escherichia coli* (NCBI: P08337), possui 390 pb e codifica uma proteína com 129 aminoácidos. Ela pertence à superfamília das Nudix Hidrolases. O termo Nudix significa **NU**cleosídeos **DI**fosfatos ligados a outras partes **X** (BESSMAN *et al.*, 1996).

Enzimas da família Nudix são encontradas em diversos organismos, de variadas espécies, onde elas hidrolisam substratos como nucleosídeos di- e trifosfatos intactos ou com danos oxidativos, além de RNA capeado, açúcar-nucleotídeo e coenzimas dinucleotídeos (MCLENNAN, 2006). As nudix hidrolases têm o papel de proteção, regulação e sinalização do metabolismo (MILDVAN, 2005).

Estudos mostraram que a MutT, tem afinidade pela 8-oxodGTP, sendo este um substrato específico para esta enzima, pois é capaz de ser hidrolisado 10 vezes mais rápido que a dGTP. Dessa maneira, a MutT é capaz de degradar o nucleosídeo trifosfato (8-oxo-dGTP) em monofosfato (8-oxo-dGMP), eliminando a guanina oxidada e aumentando a precisão da síntese de DNA (MAKI, SEKIGUCHI, 1992).

Essa enzima foi recentemente caracterizada em *Trypanosoma cruzi* por Aguiar *et al.* (2013). Os autores observaram que parasitos mutantes de *T. cruzi* que superexpressavam MutT eram mais resistentes a ação do H₂O₂.

A sequência completa do gene *mutT* em *Leishmania* spp. foi disponibilizada em banco de dados (TritrypDB). Ela está presente em 14 diferentes espécies de *Leishmania* como: *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. tarentolae* (TritrypDB). Entretanto a função dessa enzima em *Leishmania* ainda não foi descrita.

Conforme exposto acima, fica evidenciada a importância da MutT na minimização dos danos que podem ser causados pelo estresse oxidativo e a relevância de se investigar o papel dessa enzima em espécies de *Leishmania* que acometem o nosso país.

2 Justificativa

Os tripanossomatídeos são expostos constantemente a diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, formados durante a reação de defesa do hospedeiro, seja pela ação exógena (quimioterápicos) ou endógenas (metabolismo do próprio parasito ou citocinas inflamatórias). A ação das ROS pode levar a danos deletérios no DNA se não forem reparadas. Assim, é essencial para o parasito um sistema de defesa antioxidante eficaz, que seja capaz de prevenir e reparar os danos causados pelos agentes oxidantes.

A enzima MutT de bactérias foi sequenciada, e verificou-se que ela é importante no sistema de reparo de DNA, prevenindo a incorporação de bases oxidadas no momento da replicação. Adicionalmente, dados da literatura demonstraram que a expressão heteróloga da enzima MutT de *E. coli* em *T. cruzi* gerou parasitos superexpressores mais resistentes a compostos oxidativos como o H₂O₂. Esta enzima também está presente em diferentes linhagens de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. tarentolae*), porém ainda não foram realizados estudos de caracterização para saber qual papel dessa enzima nesses parasitos.

Assim, o nosso projeto busca comparar avaliar o papel do gene MutT na resistência de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao antimônio, bem como entender a via metabólica de defesa do parasito contra o estresse oxidativo nesses parasitos, para que sejam desenvolvidas novas estratégias de tratamento das leishmanioses.

3 Objetivos

3.1 Geral:

Analisar o papel da expressão heteróloga da enzima MutT na resistência a drogas e defesa contra o estresse oxidativo em *L. braziliensis* e *L. infantum*.

3.2 Específicos:

- Inserir o gene da MutT de *E. coli* em vetor de expressão de *Leishmania* pIR1-BSD.
- Transfectar o gene MutT em *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- Confirmar a transfecção através da análise da presença do gene blasticidina e o nível de expressão do gene MutT nos parasitos transfectados.
- Avaliar a susceptibilidade dos parasitos superexpressores de MutT ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ao antimonial trivalente (SbIII).
- Analisar o ciclo celular dos parasitos superexpressores de MutT por citometria de fluxo
- Verificar o efeito do peróxido de hidrogênio no perfil cromossomal através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE).

4 Materiais e Métodos

4.1 Linhagens de *Leishmania* spp. e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas, devido a facilidade de cultivo, as formas promastigotas das espécies de *Leishmania* citadas no Quadro 2.

Quadro 2: Espécies e cepas de *Leishmania* utilizadas no estudo.

Espécie	Cepa
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904
<i>L. infantum</i>	MCAN/BR/2000/BH400

As formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas em estufa BOD a 26°C em Meio 199 (M199) (Gibco®) definido e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), hemina 2,5mg/mL, biopterina 0,5mg/mL, biotina 1mg/mL, vitamina 100x, Penstrep 100X e adenina 10mM, com pH 7,4. A manutenção das culturas dos parasitos foi realizada através de dois repiques semanais.

4.2 Extração de DNA de *E. coli*

O DNA de *E. coli* foi extraído pelo método fenol:clorofórmio, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). As culturas de *E. coli* foram centrifugadas a 874 xg, por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 700 µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA, 100 mM NaCl e 0,5% SDS, pH 8,0) e incubados com Proteinase K (20 mg/mL) por 16 horas a 37°C. Após a adição de mesmo volume de fenol neutralizado (pH 8,0), as amostras foram agitadas suavemente por 10 min e centrifugadas a 13000 xg, a temperatura ambiente, por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo já acrescido com mesma proporção de fenol neutralizado (pH 8,0) e clorofórmio /álcool isoamílico 1:24, mantida em agitação suave por 10 min e centrifugada nas condições acima descritas. A fase aquosa foi transferida novamente para um novo tubo já acrescido de clorofórmio/álcool isoamílico 1:24, mantida em agitação suave por 10 min e novamente centrifugada. O DNA foi precipitado pela adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetado de sódio 3 M (v/v). As amostras foram mantidas a -70°C por 1 h e, então centrifugadas a 13000 xg, por 20 min, a 4 °C. O DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspensado em água estéril. Posteriormente, o DNA foi tratado com RNase (20 µg/mL) em tampão (Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 15 mM) a 37°C por 2 h. A concentração do DNA foi determinada utilizando Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

4.3 Extração de RNA Total

O RNA total das amostras de *Leishmania* spp. foi extraído com TRIZOL de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). O sedimento de parasitos (cerca de 1×10^7 parasitos/mL) foi ressuspensionado no TRIZOL (v/v). Após a adição de 200 μ L de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo e, posteriormente, centrifugada a 13000 xg por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo, contendo o mesmo volume de isopropanol 95%, e incubado a -20°C *overnight*. O RNA assim precipitado foi então lavado com etanol 70%, secado e ressuspensionado em água autoclavada, estéril e livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrometer ND-100 (Nanodrop®).

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para amplificação da região codificante do gene da MutT, gene de resistência a blasticidina (BSD) e DNA polimerase. As sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões alvo.

Ensaio	Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (direção 5'→3')	Tamanho do fragmento
Transfecção	MutT	MutTBgIIIF MutTBgIIIR	tAGATCTccaccATGAAAAGCTGCAAATTGC ttAGATCTCTACAGACGCTTAAGCTTCGCA	390pb
Transfecção	Blasticidina (BSD)	BSD F BSD R	ATGGCCAAGCCTTTGTCTCA TTAGCCCTCCACACATAACCAGAG	399pb
RT-PCR	DNA polimerase	DNApol F DNApol R	CGAGGGCAAGACATAC GAGAGCGGGCACCAATCAC	69pb

F – Oligonucleotídeo *forward*; R – Oligonucleotídeo *reverse*; região sublinhada corresponde ao sítio de restrição de BgII

Os iniciadores MutTBgIII foram desenhados a partir da sequência nucleotídica depositada no banco de dados NCBI: P08337, e foi adicionada a sequência de restrição AGATCT de BgIII. Para a amplificação da região codificante do gene MutT foi utilizado PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen™), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Em cada reação foi adicionado 10 pmoles de cada iniciador, DNA de *E. coli* (10 ng/ μ l), em volume final de 12,5 μ l.

As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1

min, anelamento 60 °C por 1 min e extensão 72°C por 1 min, e ao final dos 35 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C.

4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos das PCRs (3µl) foram submetidos à análise em gel de agarose 1% (p/v). A agarose foi fundida em tampão de corrida TBE 1X (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA, pH 8,0) por aquecimento em forno de micro-ondas e depois de resfriada foi colocada ao suporte de eletroforese BRL Horizontal Gel Electrophoresis Horizon 11.14 (Gibco®-LifeTechnologies) para polimerização. A corrida de eletroforese foi realizada a 100 V em tampão de corrida TBE 1X. As amostras foram aplicadas no gel misturadas ao tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol) e GelRed™ (Biotium). Após a eletroforese, a imagem do gel corado foi digitalizada no equipamento ImageQuant™ Las 4000 (GE®). Para estimar o tamanho dos fragmentos foram utilizados os marcadores Φx174 HaeIII (Promega®) e DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen™).

4.6 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Os produtos de PCR também foram submetidos à análise em gel de poliacrilamida 6%, onde foi 3 µL do produto da reação juntamente com 3 µL do tampão de amostra foram submetidos à eletroforese. Para a confecção do gel foi utilizado 10 mL de solução de bis/bis-acrilamida 6% (3,32 mL bis/bis-acrilamida 30%, 2 mL TBE 5X (0,45 M Tris-Borato; 0,01 M EDTA, pH 8,3), 4,68 mL água Milli-Q), 125 µL persulfato de amônio 10% (v/v) e 12,5 µL TEMED (N,N,N',N' –tetrametiletilenodiamina) 0,05% (v/v). A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão de corrida TBE 1X. O gel foi fixado em 150 mL de solução contendo etanol 10% (v/v), 0,5% de ácido acético (v/v) e água MQ por 30 min e, corados por uma solução de nitrato de prata 0,2% (p/v). Posteriormente, o gel foi lavado com água MQ e revelado em solução aquosa de NaOH 0,75 M com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas. Para estimar o tamanho dos fragmentos foram utilizados os marcadores Φx174 HaeIII (Promega®) e DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen™).

4.7 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados de gel de agarose utilizando o Kit QIAquick, de acordo com o protocolo do fabricante (Qiagen®). Inicialmente foi adicionado ao produto de PCR, um tampão com detergente PB, para a ligação do DNA na coluna. O DNA ligado na coluna foi lavado com o tampão PE contendo etanol por

centrifugação a 17900 xg por 1 min. O DNA foi eluído após a adição de 50µl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e centrifugação da coluna.

4.8 Preparação de bactérias cálcio-competentes

As bactérias *E. coli* da linhagem TOP 10F' foram preparadas para a transformação por choque térmico. Assim, foram feitos pré-inóculos de colônia isolada das bactérias *E. coli* cepas TOP 10F' em 5 mL de meio LB líquido (10 mg NaCl; 5 mg extrato de levedura; 10 mg peptona; água deionizada qsp. 1 L, pH 7,0).

Os pré-inóculos foram incubados a 37°C por 12 h, sob agitação constante a velocidade de 9 g. O volume de 1 mL dos pré-inóculos foi transferido para 100 mL de meio líquido LB, e mantido sob agitação a 37°C. A densidade óptica da cultura foi monitorada no espectrofotômetro a 600 nm até atingir valores de absorvância entre 0,4 e 0,6. Posteriormente as bactérias foram resfriadas no gelo por 10 min e transferidas para tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 4170 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos de cada tubo foram ressuspensos em 25 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl₂; 10 mM HEPES, pH 7,0), gelado e estéril e, mantidos no gelo por 20 min. A suspensão foi então submetida, novamente, a centrifugação e o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuspensas em 1 mL de solução de cloreto de cálcio-glicerina (100 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; 10% glicerol, pH 7,0), gelado e estéril. As células foram aliqüotadas e armazenadas a -70°C.

4.9 Clonagem do gene MutT

A inserção dos fragmentos do gene MutT foi realizada a fim de obter plasmídeos recombinantes contendo os genes de interesse para os ensaios de transfecção.

Os fragmentos amplificados utilizando o kit PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen™) foram primeiramente submetidas à reação TA-tailing. Para 10 µl de reação, foram usados 1 µL do Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1 µL MgCl₂ 15mM, 1 µL dATP 2 mM, 6 µL de produto de PCR e 1 µL Taq Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen™). A reação foi incubada a 70°C por 30 min. Em seguida, os fragmentos foram inseridos em vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega®), segundo orientações do fabricante.

Para a clonagem do gene MutT foi utilizado o vetor pGEM®-T Easy (Promega®) (FIG. 9). O produto de PCR purificado utilizado para clonagem foi obtido conforme descrito nos itens 4.2 e 4.4, mantendo o mesmo par de iniciadores descritos no Quadro 3.

Para a etapa de ligação, foram utilizados: 5 µl do tampão de ligação 2X, 4 µl do produto de PCR purificado, 1 µl da enzima T4 DNA ligase e 1 µl do vetor pGEM[®]-T Easy (50 ng). A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 h ou *overnight* a 4°C.

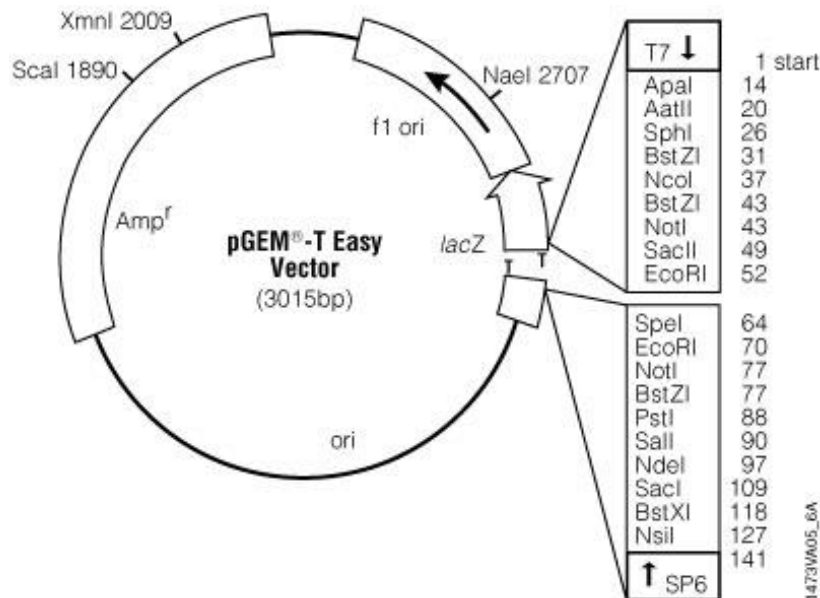


Figura 9: Vetor pGEM[®]-T Easy. **Fonte:** Promega®.

Para clonagem do gene da MutT, a etapa de transformação foi feita por choque térmico e foram utilizados 100 µl da bactéria *E. coli* TOP 10 F' e 10 µl do produto da ligação. Após o choque térmico (42°C por 45 s), foi adicionado 1ml de meio LB líquido sem antibiótico à bactéria transformada e o tubo foi incubado por 1 h no agitador. Após esse período, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido (ágar) contendo 100 µg/ml de Ampicilina, 4 µl de IPTG e 40 µl de X-Gal e incubado a 37°C durante 12h.

A confirmação da clonagem foi feita através de PCR das colônias transformadas com os iniciadores específicos (conforme protocolo descrito no item 4.4), porém, ao invés de DNA genômico, foram utilizadas pequenas quantidades das colônias transformadas com os plasmídeos recombinantes. As colônias positivas foram crescidas em meio LB contendo Ampicilina 100 µg/ml (1 µg/ml de meio) durante a noite.

Posteriormente, uma alíquota de 400 µl foi criopreservada em glicerol 50% e o restante da cultura foi utilizado para purificação do plasmídeo utilizando o Kit Miniprep (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante. O plasmídeo purificado foi dosado no espectrofotômetro Nanodrop Espectrometer ND-100 (Nanodrop®).

4.10 Sequenciamento

O sequenciamento dos plasmídeos pGEM-T easy contendo a sequência completa do gene da MutT de *E. coli* foi realizado, com o intuito de verificar a sequência correta do mesmo. Nesse estudo utilizamos a Plataforma de Sequenciamento do CPqRR (PDTIS/FIOCRUZ). Plasmídeos pGEM-MutT de 4 diferentes colônias foram sequenciados, sendo o sequenciamento repetido 2 vezes com cada iniciador universal do plasmídeo (forward M13F e reverse M13R) e do gene MutT. Uma alíquota de 1 µl (100ng) de DNA foi utilizada na reação de sequenciamento com o Kit BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies), utilizando os iniciadores M13F 5' GTAAAACGACGGCCAG 3' e M13R 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'. A reação foi realizada em uma placa de 96 poços da seguinte forma: 1 µl de DNA (100ng); 4 µl do Kit terminator ET DYEnamic; 1 µl de iniciador M13 F ou R (3,3 pmoles) e 4 µl de água deionizada para completar um volume final de 10 µl. Esta reação de sequenciamento foi submetida à PCR, com temperatura inicial de desnaturação de 96°C, 25 ciclos de 15 segundos a 92°C, 15 s a 50°C e 1 min a 60°C. Após a PCR, foi realizada a precipitação das amostras para purificar o produto de PCR e obter melhor resolução no sequenciador.

As amostras foram analisadas no sequenciador capilar, ABI 3730 (Applied Biosystems®). Para evitar variabilidade da sequência, 4 colônias de cada amostra foram sequenciadas 2 vezes com cada iniciador M13F, M13R e os sequenciadores específicos para o gene *mutT*. Os dados foram analisados usando o “BLAST” e o programa “Bioedit Sequence Alignmet Editor”. A sequência de nucleotídeos foi traduzida em sequência de aminoácidos usando o programa “Emboss Transeq – EMBL-EBI”. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas usando o software “Clustal Omega– EMBL-EBI”.

4.11 Sub-clonagem dos genes no vetor pIR1-BSD de *Leishmania*

O plasmídeo pGEM-MutT foi digerido com a enzima *Bgl*II (New England Biolabs®). Na reação de digestão foi utilizado 30 µg do plasmídeo recombinante, 15 µL BSA (10 mg/mL), 10 µL tampão NEBuffer 3 10X, 3 µL enzima (10 U/µL) e água deionizada estéril para volume final de 150 µL. O fragmento liberado após a digestão foi separado em gel de agarose 1% e purificado com o Kit Gel Extraction QIAquick (Qiagen®), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para a sub-clonagem do gene da MutT utilizamos o vetor pIR1-BSD (FIG. 10) que foi desenvolvido exclusivamente para *Leishmania*. Esse vetor de expressão pIR1-BSD (10 µg), gentilmente cedido pelo Dr. Stephen Beverley - Washington University/USA, também foi digerido com *Bgl*II (New England BioLabs®) e, em seguida, defosforilado utilizando a enzima Alkaline Phosphatase Calf Intestinal- CIAP (Promega®),

conforme protocolo do fabricante. O vetor foi então precipitado com adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (v/v). A amostra foi mantida por 30 min a -20 °C, centrifugada a 15000 xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado 2X com etanol 70%, centrifugado a 15000 xg por 10 min a 4°C e ressuspenso em água deionizada estéril. Posteriormente, o vetor defosforilado foi submetido à reação de ligação com o inserto utilizando o kit Rapid DNA Ligation (Roche®), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células cálcio competentes *E. coli* cepa TOP 10F' por choque térmico e, os transformantes confirmados por PCR de colônia e digestão com a enzima *Bgl*II (New England BioLabs®).

Para determinar a correta orientação do inserto, o plasmídeo recombinante contendo a região codificadora do gene da MutT foi submetido à análise por enzimas de restrição (*Hind*III e *Eco*RI - New England BioLabs®).

Os plasmídeos recombinantes contendo as regiões codificantes do gene nas orientações corretas, bem como o vetor de expressão pIR1-BSD sem inserto foram digeridos com a enzima *Swa*I (New England BioLabs®) por 16h a 37°C. Posteriormente, o produto da digestão foi então precipitado com adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (v/v), lavado em etanol 70% e ressuspenso em água deionizada estéril. Os plasmídeos recombinantes e o vetor de expressão, linearizados, foram utilizados nos experimentos de transfecção estável em *L. braziliensis* e *L. infantum*.

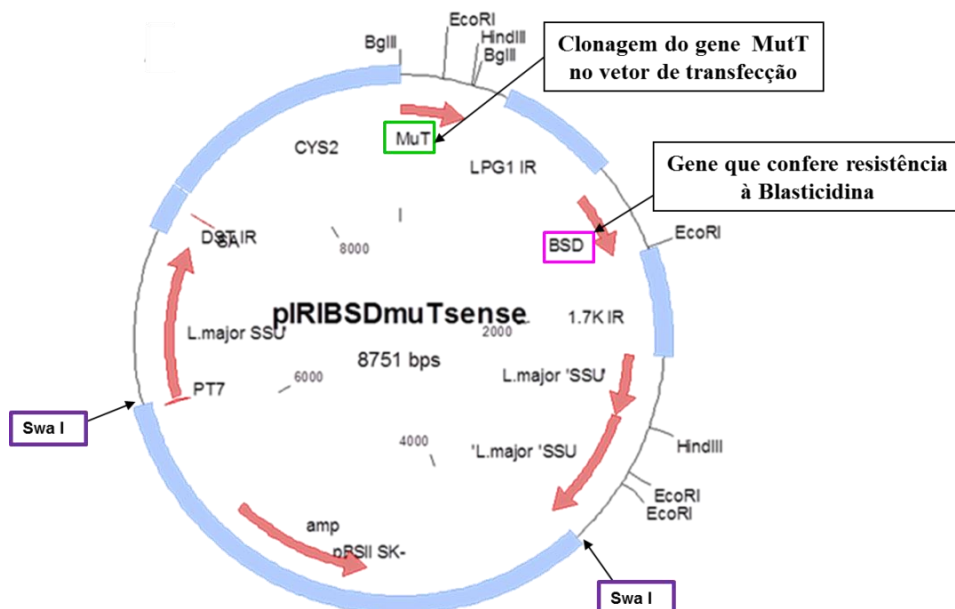


Figura 10: Construção plasmidial pIR1-BSD sub-clonado com a região codificante do gene MutT. Essa construção possui 8.751 pb. As regiões em azul indicam as regiões intergênicas: LPG1, 1.7K, pBSII SK, DST e CYS2. As regiões indicadas com as setas vermelhas estão os genes da MutT, o gene que confere resistência à blasticidina (BSD), o gene que confere resistência à ampicilina (AMP) e as regiões da subunidade pequena do RNA ribossomal (L. major SSU) de *L. major* onde o plasmídeo se integrará no genoma de *Leishmania* spp. após a transfecção. **Fonte:** Dr. Stephen Beverley.

4.12 Transfecção

Após todos os procedimentos citados anteriormente, formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* na fase exponencial de crescimento foram transfectadas com a construção pIR1-BSD-MutT, e também com o vetor vazio pIR1-BSD, como controle de interferência do vetor na transfecção. Os ensaios de transfecção foram realizados segundo o protocolo descrito por Robinson e Beverley (2003), que utiliza o método de eletroporação de alta voltagem.

Aproximadamente 2×10^8 parasitos foram centrifugados a 874 g por 10 min a 4°C e o sedimento lavado e ressuspendido com tampão Citomix (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA e 5 mM MgCl₂; pH 7,6). A suspensão contendo os parasitos foi submetida à eletroporação com 10 µg do plasmídeo recombinante linear. As células foram eletroporadas com 2 pulsos de 1500 V e 25 µF, com intervalo de 10 s entre eles, em equipamento GenePulser X Cell (Bio-rad®). Após a eletroporação, os parasitos foram incubados por 16-24 h com 10 mL de M199 (Gibco®) sem droga e, em seguida centrifugados a 1300 g x 4 °C por 10 min e o sedimento ressuspendido em M199 (Gibco®) sem droga. Um volume de 200 µL de cultura foi plaqueado em M199 (Gibco®) ágar semi-sólido contendo a droga de seleção blastocidina (BSD) (10 µg/ml) e, incubados a 26 °C por 15-20 dias. Após crescimento, as colônias individuais foram transferidas para 1 mL de M199 (Gibco®) sem droga em placas de 24 poços. Após 3-4 dias, 1 mL desta cultura de parasitos foi transferido para garrafas de culturas de 25 cm³ contendo 10 mL de M199 (Gibco®) acrescido com blastocidina (BSD) (10 µg/ml).

Os clones foram mantidos em meio seletivo por 3-4 dias. Os clones de parasitos transfectados que cresceram na presença de BSD foram submetidos à caracterização molecular para verificar a efetividade da transfecção. Para avaliar a presença do gene BSD no genoma dos parasitos, os clones resistentes à droga de seleção foram submetidos à extração de DNA pelo método rápido conforme descrito abaixo (item 4.13).

O DNA extraído dos parasitos transfectados foi quantificado e submetido à reação de PCR para confirmar a presença do marcador molecular, o gene BSD que confere resistência à blastocidina.

4.13 Extração de DNA método Quick Prep

Após a transfecção, os parasitos superexpressores de MutT foram submetidos à extração de DNA pelo método Quick Prep, para que posteriormente fosse confirmada por PCR a presença do gene de interesse no DNA dos parasitos.

Resumidamente, 1 mL das formas promastigotas em fase estacionária de cultura foi lavado com PBS 1X, em seguida o sedimento foi ressuspensionado em 250 µL de tampão de extração (10mM Tris-HCL pH 8,0; 25 mM EDTA pH-8; 0,15M NaCl e 0,5% SDS). Foi adicionado 20µg/mL de RNase/amostra e em seguida homogeneizado e incubado em banho-maria a 37°C por duas horas. Posteriormente, foi adicionada proteinase K na concentração final de 0,1mg/mL e incubada novamente em banho-maria a 37°C por 1 h. Foi adicionado a solução (fenol:clorofórmio/álcool isoamílico). Terminada esta etapa, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente por 10 min, na rotação de 36910 g. O sobrenadante foi retirado e colocado em um tubo novo do tipo Eppendorf. Ao sobrenadante foi adicionado 500 µL de etanol e 25 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2. As amostras foram incubadas por 1 h a 4°C.

Os tubos foram centrifugados a 36910 g por 10 min a 4°C, em seguida o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Centrifugados por 5 min a 4°C por 10 min. Após evaporação do álcool O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água DDW e incubado a 37°C por 10 min. Em seguida foram dosados no Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®). Posteriormente o DNA foi utilizado em reação de PCR para confirmar a presença do marcador molecular, o gene BSD que confere resistência à blasticidina.

4.14 RT-PCR semi-quantitativo

A RT-PCR semiquantitativa foi realizada para quantificar a expressão diferencial do gene da MutT. Ela utiliza a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados os seguintes reagentes: 2 µg de RNA total, 0.5 µg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa Superscript II, em um volume final de 20 µl. Todos os reagentes usados foram obtidos da Invitrogen™. A reação do cDNA foi incubada a 42°C por 60 min. Após a síntese da primeira fita, a reação foi inativada a 70°C por 20 min, e o cDNA foi diluído 15X em água deionizada.

O cDNA foi submetido à reação de PCR para amplificação e semi-quantificação do gene da MutT. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem). O iniciador utilizado foi o mesmo citado no item 4.4 para o gene da MutT. O gene constitutivo da DNA polimerase foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada.

As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, 10 ng/µl de cDNA molde, de Supermix High Fidelity (Invitrogen™). O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 5 min e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s,

anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 72 °C por 30s, e após os 30 ciclos extensão final a 72 °C por 1 min. O resultado foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata.

4.15 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente (SbIII)

Os parasitos não transfectados (Parental), transfectados com vetor vazio (BSD) e clones dos parasitos superexpressores do gene MutT foram submetidos à análise de susceptibilidade ao SbIII.

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* (2×10^6 parasitos/mL) em fase exponencial, foram crescidas em M199 (Gibco®), contendo várias concentrações de SbIII, por aproximadamente 48 horas a 26°C. A concentração do SbIII que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}) foi determinada contando o número de parasitos crescidos na ausência e presença do SbIII, utilizando o contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.16 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os parasitos não transfectados (Parental), transfectados com vetor vazio (BSD) e os clones dos parasitos superexpressores do gene MutT foram submetidos à análise de susceptibilidade ao H₂O₂.

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* em fase exponencial de crescimento, foram crescidas em M199 (Gibco®), contendo diferentes concentrações de H₂O₂ (0, 200 µM, 350 µM e 400 µM). Inicialmente, os parasitos (2×10^6 parasitos/mL) foram centrifugados a 1966 g por 10 min e tratados com H₂O₂ em diferentes concentrações por 20 min em PBS 1X a 26°C. Em seguida, os parasitos foram novamente centrifugados, ressuspendidos em M199 novo e distribuídos em placas de 24 poços, sendo inicialmente 1mL/poço. Os parasitos que não receberam o tratamento com H₂O₂ também foram centrifugados e permaneceram por 20 min em PBS para reduzir eventuais diferenças dos efeitos deste processo entre os parasitos tratados e não tratados.

A taxa de sobrevivência das culturas foi determinada pela contagem diária do número de parasitos vivos após 4 a 168 horas de crescimento após a exposição ao H₂O₂. A contagem foi realizada utilizando o Isoton III Diluent (Beckman Coulter™) para diluição dos parasitos e o contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). 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 realizados em triplicatas.

4.17 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada para verificar a influência do H₂O₂ na fase de crescimento dos parasitos não transfectados e transfectados com o gene *mutT*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Citometria do ICB, localizado no Centro de Laboratório Multiusuários do ICB-UFMG.

Nesse ensaio os parasitos foram tratados com H₂O₂ na concentração de 350µM por 20 min e posteriormente crescidos em M199. Os parasitos foram submetidos à 3 diferentes tempos de incubação: 24, 48 e 72h. Cada amostra foi tratada em triplicata para serem posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

Os parasitos foram lavados uma vez com PBS 1X por centrifugação a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente eles foram ressuspensos, em etanol 70% na concentração de 1 x 10⁷ parasitos/ml e armazenados em freezer -20°C. Para realizar a leitura as amostras foram lavadas novamente com PBS 1X, centrifugadas e ressuspensas em uma mistura de PSB 1X contendo 10 µg/ml de RNase e 10 µg/ml de Iodeto de propídeo. Após esse procedimento, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram processadas no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson).

4.18 Eletroforese em Pulso Alternado (Pulsed-field Gel Electrophoresis – PFGE)

A análise do perfil das bandas cromossômicas foi realizada através da eletroforese em pulso alternado para separação dos cromossomos das diferentes espécies de *Leishmania*. Essa análise foi realizada com objetivo de comparar o efeito do estresse oxidativo na degradação do DNA dos parasitos parentais não transfectados e superexpressores de MutT. Foram preparados blocos de agarose contendo células de *L. braziliensis* e *L. infantum* não transfectadas e transfectadas com o gene da MutT, não tratadas e tratadas previamente com 200 µM H₂O₂ em dois tempos diferentes, 24h e 48h. Os blocos foram confeccionados conforme Smith e Cantor (1988). Os parasitos transfectados e os parentais tratados e não tratados com H₂O₂ (4x10⁸ parasitos / mL) foram lavados em PBS 1x e ressuspensos em solução PSG 2x (65 mM NaCl, 75 mM Na₂HPO₄, e glicose 1%). Em seguida, foi adicionada aos parasitos, uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (Agarose tipo VII – Sigma©), e então transferidos para moldes de acrílico para formação dos blocos. Após polimerização da agarose, os blocos foram incubados em uma solução de lise (ESP – EDTA, Sarcosil e Proteinase) de sarcosil 1%, 1 mg/mL Proteinase K e 0,5 mM EDTA pH 9,5 durante 48h a 50°C. Em seguida, os blocos foram estocados em solução de EDTA 0,5 mM a 4°C. A eletroforese de pulso alternado foi realizada no equipamento Gene Navigator TM

System (Amersham Biosciences®, Buckinghamshire, UK). Os blocos contendo os parasitos foram colocados em canaletas separadas de um gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8). Foram realizadas duas corridas eletroforéticas com diferentes condições. A primeira condição foi obtida com pulsos norte/sul, leste/oeste de 60 s por 24h e 120 s por 24h a 90V e 9°C, totalizando uma corrida de 48h. A segunda corrida consistiu de pulsos norte/sul, leste/oeste de 90s por 18h, 200s por 18h, 400s por 22h, 600s por 7h a 90V e 9°C, totalizando uma corrida de 65h. O marcador molecular usado foi DNA Size Markers – Yeast Chromosomal (Bio-rad®) de *Saccharomyces cerevisiae*. Ao final da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/mL) e fotografado no aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare®).

4.19 Análise estatística

Os dados dos experimentos de susceptibilidade ao SbIII e H₂O₂ foram analisados estatisticamente usando Teste *t- Student* através do software GraphPad Prism 5.0 e valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 Resultados

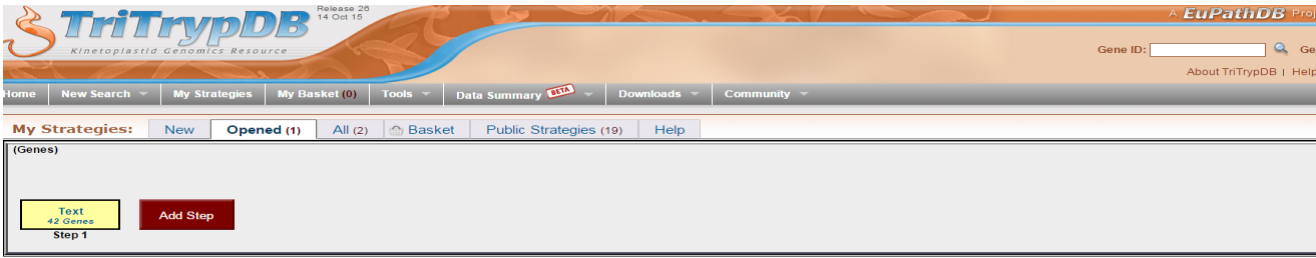
5.1 Consulta ao banco de dados

No início de nosso estudo foi realizada uma análise no banco de dados TriTrypDB para verificar a presença do gene *mutT* em *Leishmania*. Os resultados mostraram que 14 diferentes espécies de *Leishmania* possuem o gene MutT (figura 11). Nas espécies utilizadas no presente estudo, o gene da MutT está localizado nos cromossomos 31 e 35 de *L. braziliensis* e 31 e 36 de *L. infantum*.

Em *L. braziliensis* o gene MutT foi identificado como Lbr.M31.3320, e está descrito como uma “*mutt/nudix family protein-like protein*”, possuindo 978 pb e codificando uma proteína de 325 aa. Esse gene possui a função de ligante de íons metal e hidrolase. A outra sequência do gene presente no cromossomo 35 (LbrM.35.0380) codifica uma “*Mutt-Nudix-related hydrolase, putative*”. Esse gene possui uma sequência de 924 pb e codifica uma proteína de 307 aa, apresentando função em processos metabólicos e atividade de hidrolase.

O número de depósito da sequência de *L. infantum* no TriTrypDB é LinJ.31.3060. Ele está descrito como uma “*mutt/nudix family protein-like protein*”, com uma sequência genômica de 978pb codificando uma proteína de 325 aa apresentando funções de hidrolase e ligante iônica de metais. No cromossomo 36, a LinJ.36.0320 possui uma sequência de 999pb e codifica uma proteína de 332 aa.

A anotação presente no banco de dados do TriTrypDB sugere que os genes descritos como homólogos a MutT possuem domínio Nudix, entretanto não podemos afirmar que os mesmos são correspondem ao gene *mutT* devido a versatilidade catalítica exercida por essa superfamília (MILDVAN, 2005).



42 Genes from Step 1
Strategy: Text(2) [Add 42 Gen](#)

Click on a number in this table to limit/filter your results

Leishmania																		
#	<i>L.aethiops</i>	<i>L.arabica</i>	<i>L.braziliensis</i> (nr Genes: 2)	<i>L.donovani</i>	<i>L.enriettii</i>	<i>L.gerberilli</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.major</i> (nr Genes: 2)	<i>L.mexicana</i>	<i>L.panamensis</i>	<i>L.sp.</i>	<i>L.tarentolae</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L.turicana</i>				
	L147	strain LEM1108	MHOM/BR/75/M2903	MHOM/BR/75/M2904	BPK282A1	strain LEM3045	strain LEM452	JPCM5	strain Friedlin	strain LV39c5	strain SD 75.1	MHOM/GT/2001/AJ1103	MHOM/COL/81/L13	MAR LEM2494	Parrot-Tariti	L590	strain LEM423	
	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1

Figura 11: Consulta ao TriTrypDB. Representação da consulta ao banco de dados de tripanossomatídeos (TriTrypdb), onde estão descritas as 14 espécies de *Leishmania* que possuem o gene MutT.

5.2 Expressão heteróloga do gene MutT

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

sp|P08337|MUTT_ECOLI      MKKLQIAVGIIRNENNEIFITRRAADAHMANKLEFPGGKIEMGETPEQAVVRELQEEVGI
Laila15_1                 MKKLQIAVGIIRNENNEIFITRRAADAHMANKLEFPGGKIEMGETPEQAVVRELQEEVGI
*****

sp|P08337|MUTT_ECOLI      TPQHFSLFEKLEYEFPDRHITLWFVLVERWEGEPWGKEGQPGEWMSLVGLNADDFPPANE
Laila15_1                 TPQHFSLFEKLEYEFPDRHITLWFVLVERWEGEPWGKEGQPGEWMSLVGLNADDFPPANE
*****

sp|P08337|MUTT_ECOLI      PVIAKLKRL-
Laila15_1                 PVIAKLKRL*
*****

#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
1: sp|P08337|MUTT_ECOLI  100.00  100.00
2: Laila15_1             100.00  100.00

```

Figura 12: Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene *mutT*. A sequência do plasmídeo pGEM-MutT foi alinhada, através do software Clustal Omega (1.2.1), com a sequência do gene *mutT* do banco de dados (NCBI: P08337).

região codificadora do gene *mutT* de *E. coli* foi clonada no vetor pGEM®-T Easy, conforme descrito no item 4.8. Após a confirmação da clonagem por PCR, as colônias que possuíam o gene *mutT* foram sequenciadas para confirmar a correta sequência do gene. A sequência nucleotídica e de aminoácidos da MutT obtida nas reações de sequenciamento foi comparada com a do banco de dados como representado na figura 12 e no Anexo, respectivamente. O resultado do alinhamento da sequência de aminoácidos mostrou que a colônia 15 foi idêntica ao gene *mutT* depositado no banco de dados. Diante disto, a sequência do gene *mutT* dessa colônia foi utilizada para a subclonagem no vetor pIR1-BSD.

Para o procedimento de subclonagem, o plasmídeo com o gene de interesse (pGEM-MutT), foi digerido com a enzima de restrição *Bgl*I e posteriormente, o fragmento liberado foi subclonado no vetor de expressão pIR1-BSD, originando a construção pIR1-BSD-MutT. Para confirmar a correta orientação do inserto no vetor (senso ou antisenso), foi realizada análise *in silico* através do programa Clone Manager e as enzimas *Eco*RI e *Hind*III foram selecionadas para digestão (FIG. 13). O padrão da orientação senso com a *Eco*RI foi a geração de fragmentos de 70, 1224, 1463 e 5994pb, enquanto a antisenso foram fragmentos de 70, 1224, 1522 e 5935pb. Já a digestão com a enzima *Hind*III o plasmídeo com a orientação senso gerou fragmentos de 2271 e 6480 pb e a antisenso fragmentos de 2636 e 6115 bp (FIG.14).

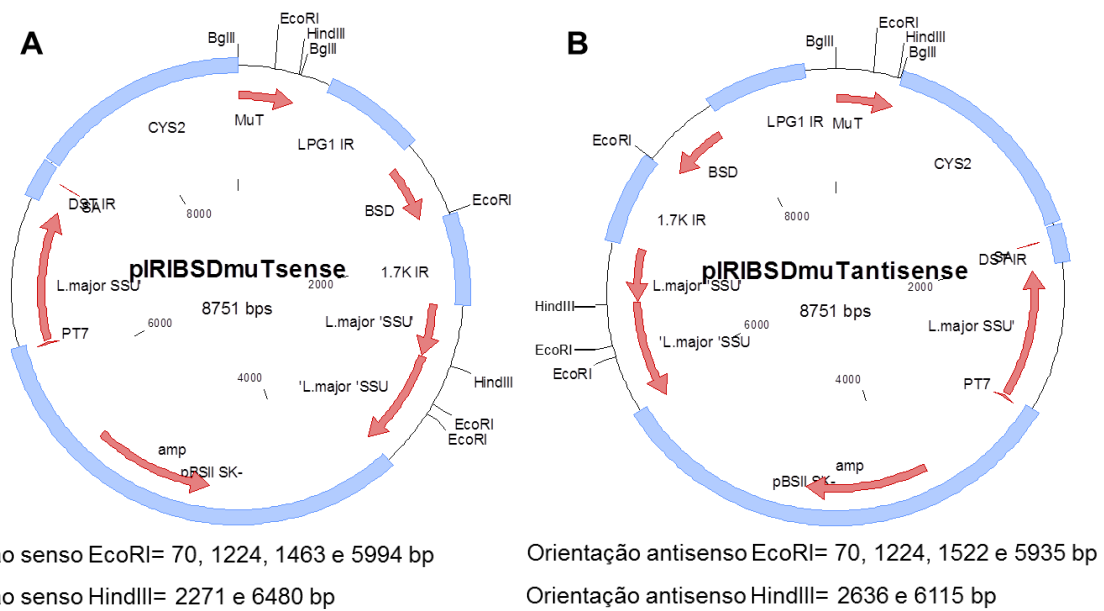


Figura 13: Mapa *in silico* da clonagem do gene *mutT* em vetor pIR1-BSD. A digestão da construção pIR1-BSD-MuT com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* apresentou padrões diferentes na orientação do inserto no vetor, sendo **A)** senso e **B)** antisense.

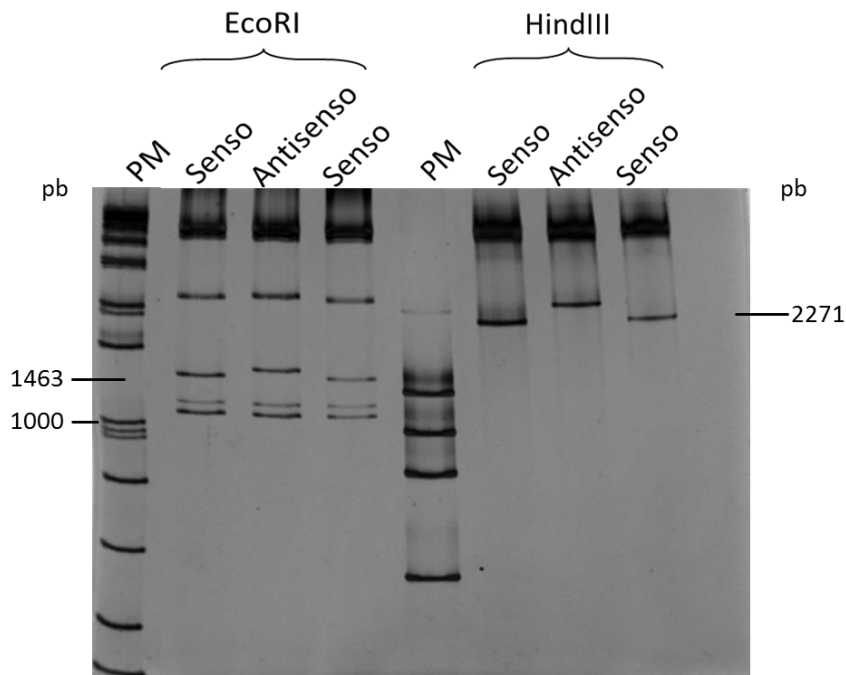


Figura 14: Eletroforese para confirmação da posição da construção pIR1-BSD-MuT. Os clones foram digeridos com as endonucleases *EcoRI* e *HindIII* para confirmar a correta orientação dos mesmos. A eletroforese foi feita em gel de poliácridamida 6% corado com nitrato de prata para seleção dos clones senso. Estão representados na figura PM: peso molecular (1- DNA Ladder 1kb plus – Invitrogen™ e 2- Φx174 HaeIII-Promega®).

Os plasmídeos contendo a orientação senso foram digeridos com a endonuclease *SwaI* para linearização dos plasmídeos permitindo a correta integração da sequência na subunidade menor ribossomal do RNA do parasito, após a transfecção.

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas com a construção pIR1-BSD-MutT e com o vetor vazio (controle da interferência do vetor no parasito). Após a transfecção, as células foram incubadas por 24h em M199 sem droga. Em seguida, os parasitos foram centrifugados e plaqueados em meio semissólido contendo 10 µg/ml de BSD, que é a droga de seleção do plasmídeo. Após um período de aproximadamente 15 dias, observamos a presença de colônias na placa indicando a eficiência da transfecção. Em seguida, aproximadamente 12 colônias individuais de cada amostra foram incubadas em 1 mL de M199 líquido em placas de 24 poços. Após 3-4 dias, os parasitos (1 mL de cultura) foram transferidos para 10 mL de M199 contendo 10µg/ml de BSD. Os clones resistentes a BSD foram selecionados para ensaios de PCR e RT-PCR semiquantitativo. Para confirmar a transfecção foi realizada extração do DNA genômico dos clones resistentes à droga de seleção (BSD), conforme protocolo descrito no item 4.13. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas à PCR utilizando iniciadores específicos para o gene BSD. Conforme ilustrado nas figuras 15 e 16, observamos a amplificação de um fragmento de 399 pb, correspondente ao gene BSD nas amostras de *L. braziliensis* e *L. infantum* transfectadas com os vetores pIR1-BSD (controle) e pIR1-BSD-MutT, confirmando a integração do gene no genoma dos parasitos.

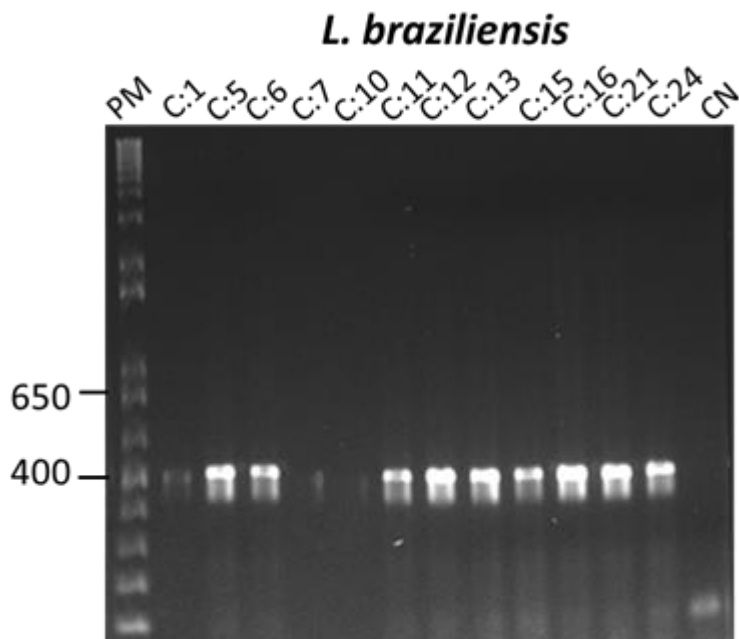


Figura 15: Confirmação da transfecção de *L. braziliensis*. Na figura acima observamos quase todos os clones com presença da construção pIR1-BSD-MutT. O fragmento observado é de 399pb correspondente ao gene do BSD, que confere resistência a Blastomicina. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% e corada com GelRed™ (Biotium). CN: Controle Negativo.

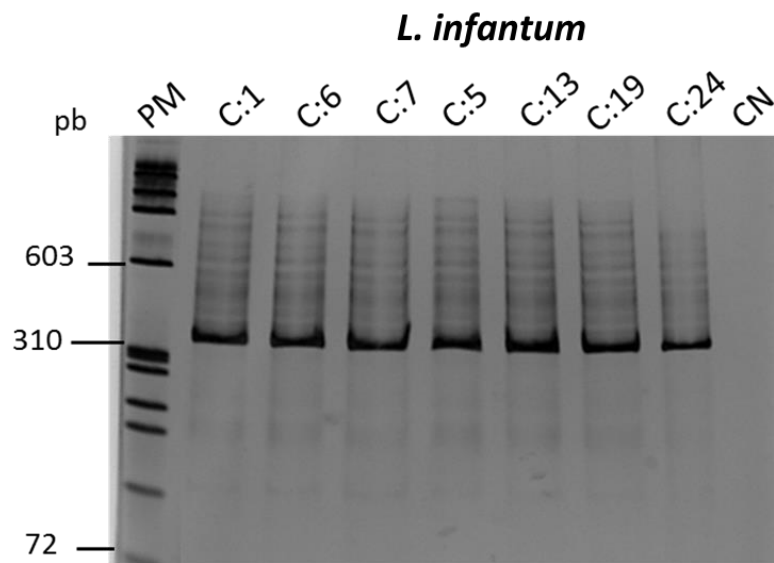


Figura 16: Confirmação da transfecção de *L. infantum*. Na representação acima observamos todos clones com a presença da construção pIR1-BSD-MutT, um fragmento de 399pb correspondente ao gene do BSD, que confere resistência a Blastomicina. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.

5.3 Confirmação da expressão do gene MutT

A técnica de RT-PCR semiquantitativo foi realizada para confirmar a expressão heteróloga do gene *mutT* de *E. coli* em promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Nessa técnica, o RNA total extraído dos parasitos transfectados com o gene da MutT foi utilizado na reação de síntese de cDNA, que posteriormente serviu de molde para a reação de PCR. Na figura 17 a presença de um fragmento de 390 pb confirma a expressão do gene *mutT* apenas nos parasitos transfectados com a construção pIR1-BSD-MutT. O gene constitutivo que codifica a DNA polimerase de *Leishmania* foi utilizado como normalizador da quantidade de cDNA utilizada na reação de RT-PCR. Observamos a presença de um fragmento de 69 pb correspondente a um fragmento do gene da DNA polimerase em todas as amostras analisadas. Nos ensaios de análise do fenótipo dos parasitos transfectados com o gene *mutT* escolhemos dois clones de cada espécie *Leishmania* que apresentaram maior expressão do gene *mutT* evidenciado pela RT-PCR.

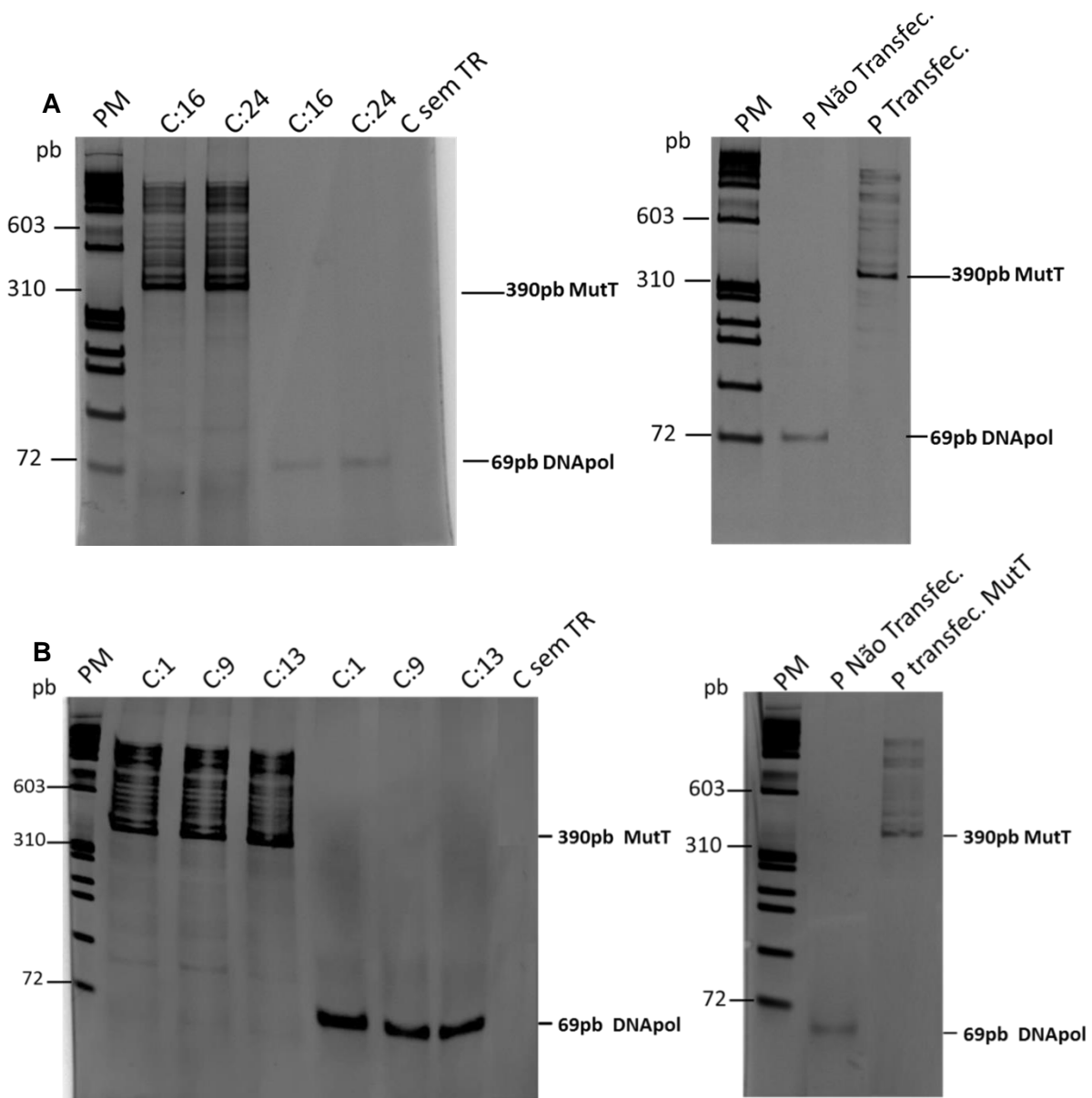


Figura 17: RT-PCR semiquantitativo de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum* (B). O RT-PCR foi realizado para confirmar a expressão do gene da MutT, a partir do RNA total dos clones transfectados. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. O fragmento de 390pb esperado foi amplificado em ambas espécies de *Leishmania*. Como controle da reação, foi utilizado cDNA sem a enzima transcriptase reversa, apresentando ausência de amplificação para o gene MutT; controle negativo foi utilizada amostra de DNA dos parasitos não transfectados, apresentando amplificação apenas do fragmento do gene da DNA polimerase e transfectados com o gene *mutT* e como controle positivo foi utilizado DNA dos parasitos transfectados com gene *mutT*.

5.4 Análise da curva de crescimento dos parasitos parentais e transfectados com o gene *mutT*

Analisamos o crescimento da *L. braziliensis* e *L. infantum* selvagem (WT) e os clones superexpressores de MutT nos tempos 4, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h (figura 18). Ao compararmos o crescimento das duas espécies de *Leishmania* podemos verificar que a espécie *L. infantum* apresenta um maior número de parasitos comparado com a espécie *L.*

braziliensis. Esse maior crescimento de *L. infantum* é característico do subgênero *Leishmania*.

Quando comparamos a amostra parental com os clones superexpressores de MutT para ambas espécies de *Leishmania* verificamos que os parasitos apresentam crescimento muito similar sem diferença estatística. Diante disto, observamos que o gene *mutT* não interfere no crescimento dos parasitos. Além disto, observamos que os parasitos transfectados com o vetor pIR1-BSD vazio apresentam crescimento similar ao parental.

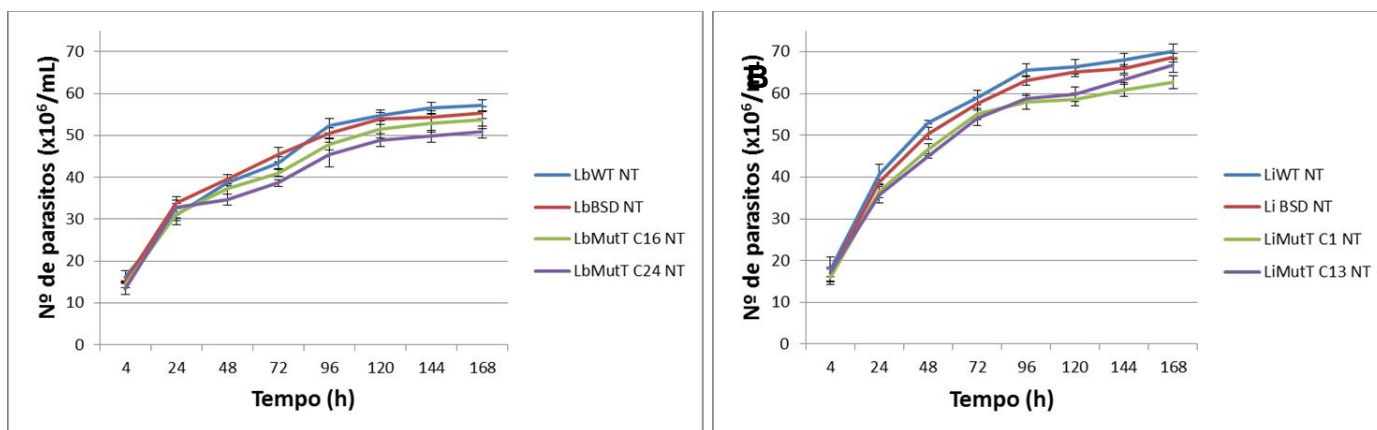


Figura 18: Crescimento dos parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em **A** está representado o crescimento de *L. braziliensis* parental, BSD e seus respectivos clones superexpressores de MutT. Em **B** observamos o crescimento de *L. infantum* parental, BSD e seus clones. Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LbBSD - *L. braziliensis* clonada com gene de resistência da Blastocidina, LbMutT – *L. braziliensis* superexpressora de MutT, LiWT – *L. infantum* Wild Type (Parental), LiBSD - *L. infantum* clonada com gene de resistência da Blastocidina, LiMutT – *L. infantum* superexpressora de MutT, NT – Não tratados.

5.5 Teste de susceptibilidade dos parasitos superexpressores de MutT ao tratamento ao SbIII

Nesse ensaio avaliamos a susceptibilidade dos parasitos parentais e superexpressores de MutT ao antimônio trivalente (SbIII). Os parasitos foram incubados durante 48h com diferentes concentrações de SbIII e a porcentagem de crescimento foi calculada a partir da contagem do número de parasitos crescidos na ausência e presença do SbIII. Em diferentes concentrações de SbIII observamos similar índice de crescimento dos clones de *L. braziliensis* superexpressores de MutT comparado com o parental. O valor de IC₅₀ (concentração de droga que inibe 50% dos parasitos) foi determinado conforme cálculo de regressão linear descrito por Huber e Koella (1993). Em nosso estudo observamos que o valor de IC₅₀ dos clones superexpressores foi 0.95 µM e 1.55 µM e do parental foi 0.96 µM, (FIG. 19). O experimento também foi realizado com o vetor pIR1-BSD vazio, que apresentou crescimento similar ao parental (dados não mostrados). Esses resultados indicam que a superexpressão do gene *mutT* em *L. braziliensis* não interferiu na susceptibilidade dos parasitos ao antimônio trivalente.

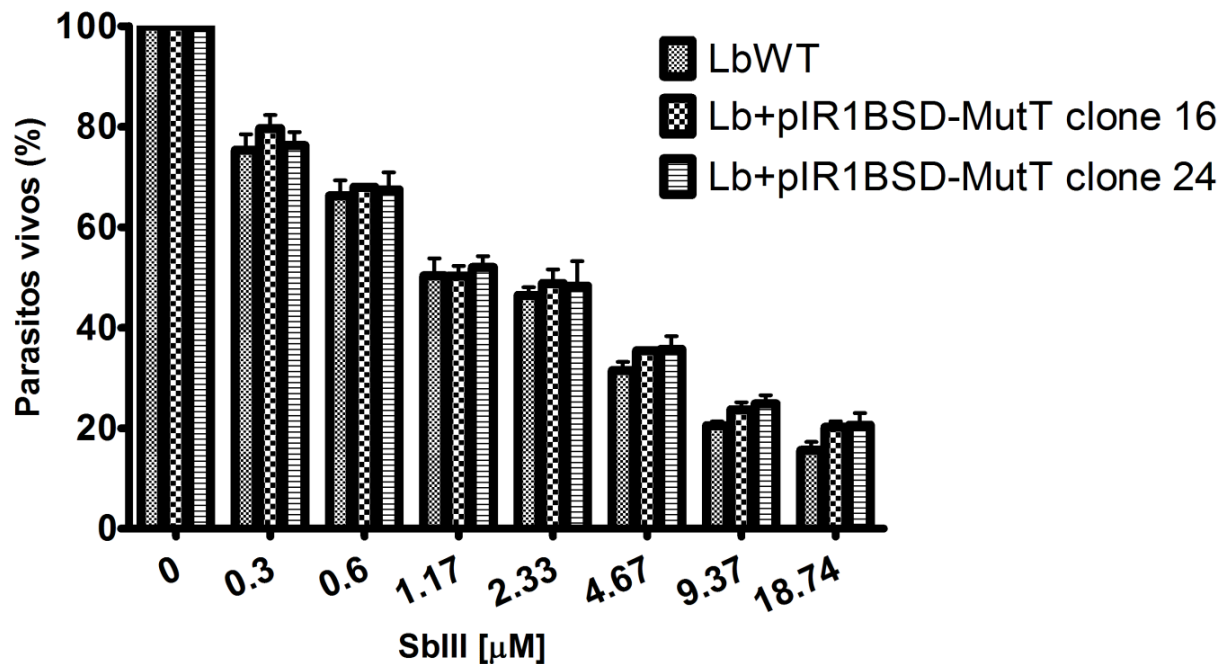


Figura 19: Teste de susceptibilidade de *L. braziliensis* ao SbIII, onde está representada a porcentagem de crescimento dos parasito na presença de diferentes concentrações de SbIII. A média e o desvio-padrão dos números de parasitos foram calculados e não foi observada diferença significativa. O resultado foi baseado na análise de Teste *t-Student* com $p>0,05$. Foram realizados 5 experimentos em triplicata.

Em relação a *L. infantum*, também não observamos diferenças na susceptibilidade dos parasitos superexpressores ao antimônio trivalente (FIG. 20). Verificamos que o valor de IC_{50} do SbIII para os clones de *L. infantum* superexpressores de MutT foi 57.24 µM e 61.71 µM e do parental foi 50.35 µM. O experimento também foi realizado com o vetor pIR1-BSD vazio, que apresentou crescimento similar ao parental (dados não mostrados). Esses resultados indicam que a superexpressão do gene *mutT* em *L. infantum* não interferiu na susceptibilidade dos parasitos ao antimônio trivalente.

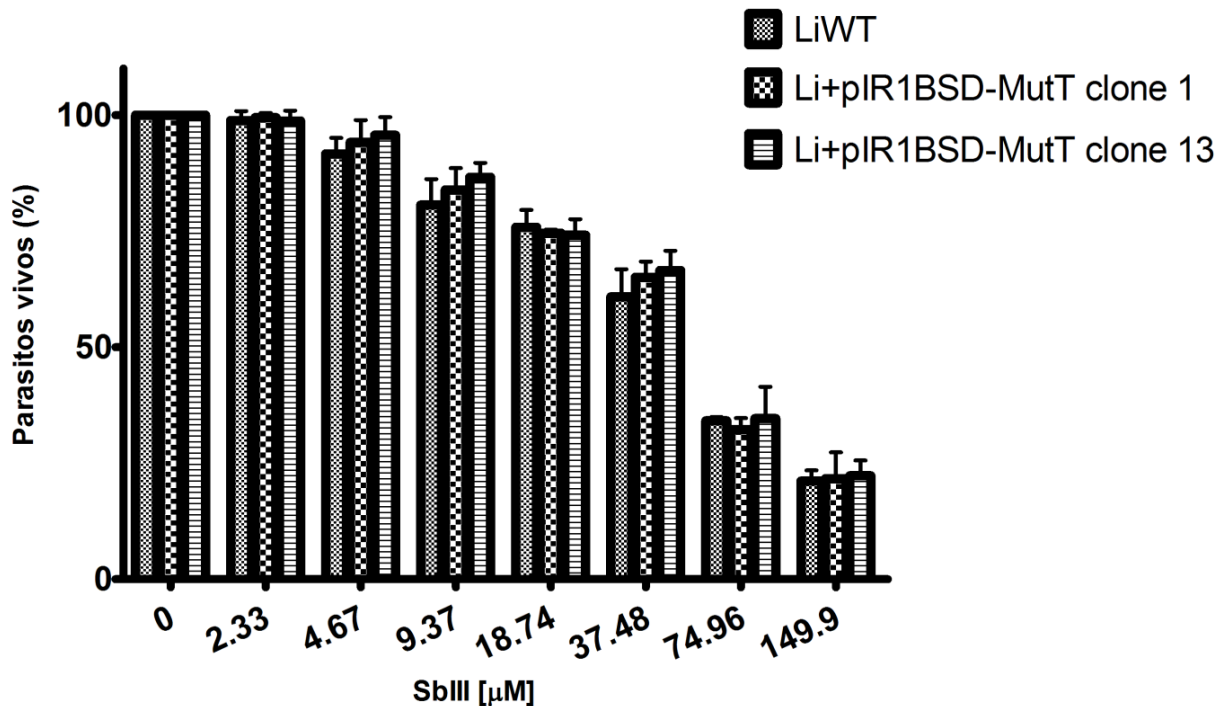


Figura 20: Teste de susceptibilidade de *L. infantum* ao SbIII. No gráfico está representada a porcentagem de crescimento dos parasitos na ausência e presença de diferentes concentrações de SbIII. O teste realizado em *L. infantum* não observou nenhum efeito de resistência a droga. A média e o desvio-padrão dos números de parasitos foram calculados e não foi observada diferença significativa. O resultado foi baseado na análise de Teste *t-Student* com $p > 0,05$. Foram realizados cinco experimentos em triplicata.

5.6 Análise de sobrevivência dos parasitos superexpressores de MutT ao estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2

Posteriormente foi realizada a análise de sobrevivência dos clones de *L. braziliensis* e *L. infantum* superexpressores de MutT ao estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2 . Dessa forma, os parasitos foram incubados com diferentes concentrações de H_2O_2 (200, 350 e 400 μM) durante 20 min. Posteriormente eles foram lavados e incubados com M199 e o número de parasitos foi quantificado diariamente durante 7 dias.

Inicialmente comparamos a diferença entre as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* em relação ao estresse gerado pelo H_2O_2 . Conforme mostrado na figura 21 observamos que o H_2O_2 , afeta o crescimento de ambas as espécies de *Leishmania* analisadas. Entretanto observamos nitidamente que *L. infantum* é mais resistente ao H_2O_2 do que *L. braziliensis*, uma vez que os parasitos crescem melhor mesmo na presença de altas concentrações de H_2O_2 .

O H_2O_2 gera um estresse replicativo nos parasitos. Após o tratamento com H_2O_2 *L. braziliensis* precisa de um tempo maior para voltar a se multiplicar. Na concentração 200 μM os parasitos voltam a crescer, mas apresentam um platô de crescimento bem menor comparado aos parasitos não tratados (FIG. 21). As concentrações maiores de H_2O_2 de 350 e 400 μM são muito tóxicas para *L. braziliensis* e os parasitos não voltam a crescer. Por outro lado, *L. infantum* precisa de um tempo menor para voltar a crescer, os parasitos recuperam melhor. Como podemos observar no tratamento com 200 μM de H_2O_2 , os parasitos voltam a crescer após 48h e atingem um alto platô de crescimento. O tratamento com 350 μM de H_2O_2 , os parasitos voltam a crescer após 72h de crescimento e com 400 μM o crescimento é restabelecido após 96h de cultivo (FIG. 21).

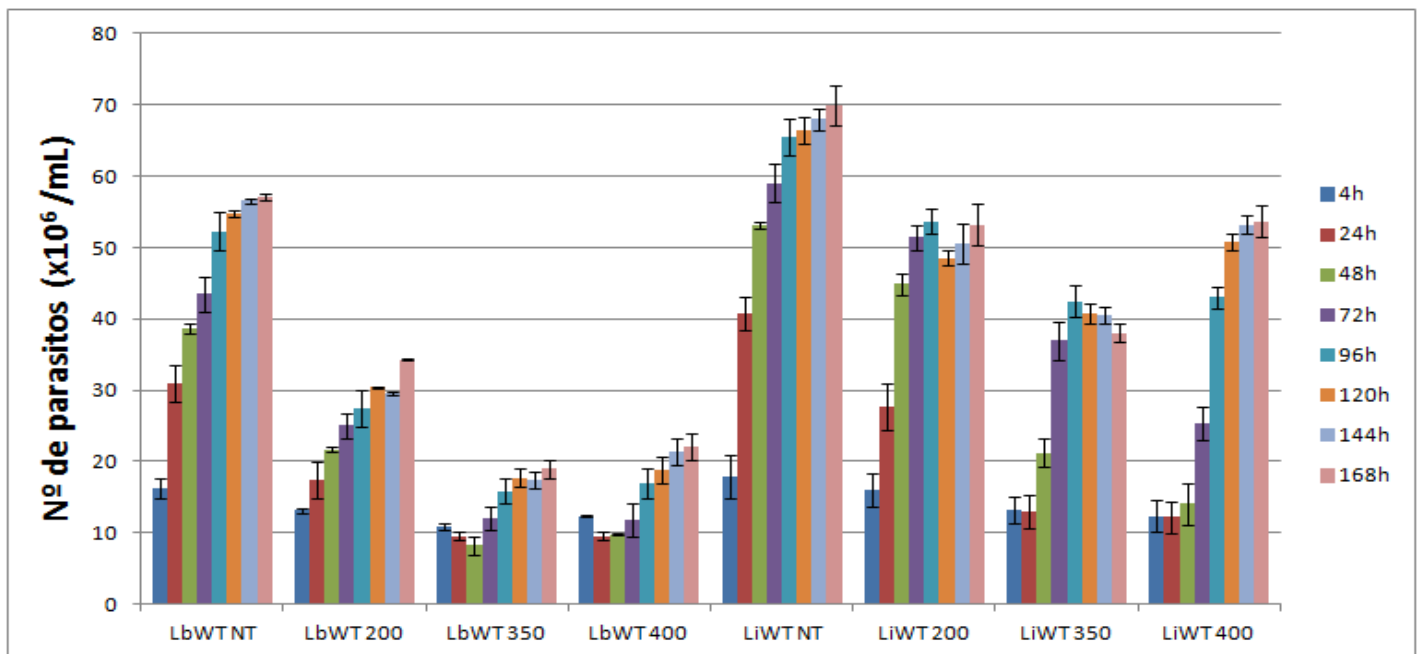


Figura 21: Gráfico de sobrevivência de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao tratamento com H_2O_2 (Parentais). Os parasitos foram tratados em diferentes concentrações de H_2O_2 por 20min e o crescimento foi avaliado em diferentes tempos (4 a 168 h). A concentração dos parasitos foi determinada através de contagem em contador automático (Z1 Coulter® Particle Counter). Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LbMutT – *L. braziliensis* superexpressora de MutT, LiWT – *L. infantum* Wild Type (Parental), LiMutT – *L. infantum* superexpressora de MutT, NT- Não tratado, 200 – Tratamento com 200 μM de H_2O_2 , 350 – Tratamento com 350 μM de H_2O_2 , 400 – Tratamento com 400 μM de H_2O_2 .

Análise comparativa entre os parasitos parentais e superexpressores de MutT para cada espécie de *Leishmania* mostrou que ambos clones de *L. braziliensis* superexpressores de MutT foram mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2 comparado com os parasitos parentais não-transfectados (FIG. 22A). Em relação a *L. infantum* o mesmo não acontece. O crescimento dos clones de *L. infantum* superexpressores de MutT na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 (200, 350 e 400 μM) é muito similar comparado ao crescimento dos parasitos selvagens LiWTS (FIG. 22B). Dessa forma observamos que a

Figura 22: Gráficos de sobrevivência de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao tratamento com H₂O₂. Os parasitos foram tratados em diferentes concentrações de H₂O₂ por 20min e o crescimento foi avaliado em diferentes tempos (4 a 168 h). A concentração dos parasitos foi determinada através de contagem em contador automático (Z1 Coulter® Particle Counter). Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LbMutT – *L. braziliensis* superexpressora de MutT, LiWT – *L. infantum* Wild Type (Parental), LiMutT – *L. infantum* superexpressora de MutT, NT- Não tratado, 200 – Tratamento com 200 µM de H₂O₂, 350 – Tratamento com 350µM de H₂O₂, 400 – Tratamento com 400µM de H₂O₂. Em **A** está representada a sobrevivência de *L. braziliensis* parental e seus respectivos clones e em **B** *L. infantum* parental e seus respectivos clones.

A figura 23 mostra apenas os resultados de *L. braziliensis* parental e clones superexpressores de MutT em relação ao tratamento com 200 µM, 350 µM e 400 µM de H₂O₂. O crescimento dos parasitos em relação às diferentes concentrações de H₂O₂ está junto para facilitar a análise dos dados. Como observado anteriormente, clones de *L. braziliensis* superexpressores de MutT tratados com as diferentes concentrações de H₂O₂ sobreviveram mais que os parasitos não transfectados. Na concentração de 200 µM, a diferença entre o crescimento é nítida a partir de 48h pós-tratamento, pois podemos verificar que os parasitos superexpressores crescem mais que o seu respectivo par não transfectado. Em 350 µM a diferença de crescimento dos superexpressores para o parental se inicia em 96h e persiste até 168h. Para a concentração de 400 µM a alteração acontece a partir das 120h. Os resultados, portanto nos levam a afirmar que a MutT em *L. braziliensis* é importante por conferir resistência ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂.

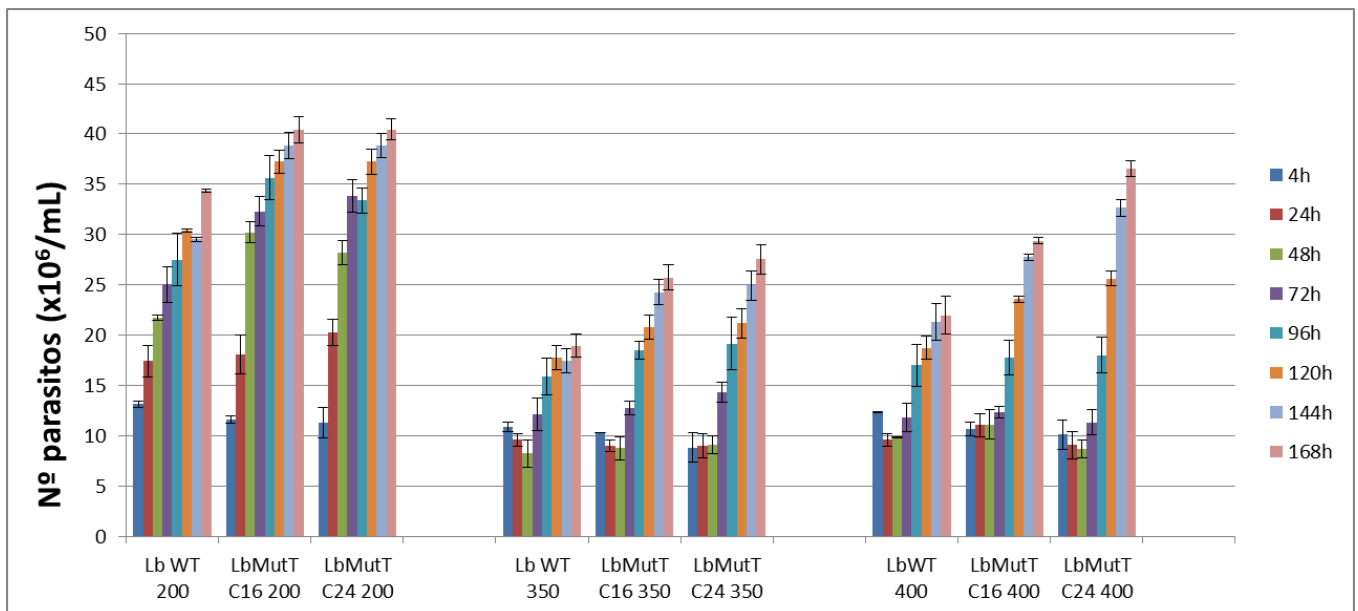


Figura 23: Teste de susceptibilidade de *L. braziliensis* ao H₂O₂. Os diferentes perfis de crescimento nas diferentes concentrações de H₂O₂. Os parasitos foram tratados em diferentes concentrações de H₂O₂ por 20min e o crescimento foi avaliado em diferentes tempos (4 a 168 h). Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LbMutT – *L. braziliensis* superexpressora de MutT, 200 – Tratamento com 200 µM de H₂O₂, 350 – Tratamento com 350µM de H₂O₂, 400 – Tratamento com 400µM de H₂O₂.

5.7 Análise do ciclo celular

O ciclo celular dos parasitos superexpressores de MutT e parentais foi analisado depois do tratamento com H_2O_2 . Os parasitos foram tratados com $350\mu M$ de H_2O_2 durante 20 min, posteriormente eles foram incubados em M199 durante 24, 48 e 72h. Após esse período, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo conforme descrito o item 4.17.

Os resultados comparativos entre as espécies *L. braziliensis* e a *L. infantum* (FIG.24), demonstraram que a *L. braziliensis* apresenta um perfil de ciclo celular não clássico. Essa espécie permanece por mais tempo na fase subG1, o que justifica o padrão apresentado por essa espécie nas análises de crescimento (FIG. 21, 22 e 23), que apresenta demora para retomar ao seu ritmo de crescimento normal. Acreditamos que isso ocorra devido a maior incorporação de 8-oxoG pela *L. braziliensis* que gera quebras de fitas-duplas do DNA. No tempo de 72h isso é claramente demonstrado pela parada dos parasitos tratados com H_2O_2 na fase subG1 que impossibilita a replicação dos parasitos. Já a *L. infantum* demonstrou um perfil mais próximo do clássico (FIG. 24), o que foi comprovado pela análise do crescimento dos parasitos (FIG. 21, 22 e 23), onde essa espécie retoma o seu crescimento rapidamente.

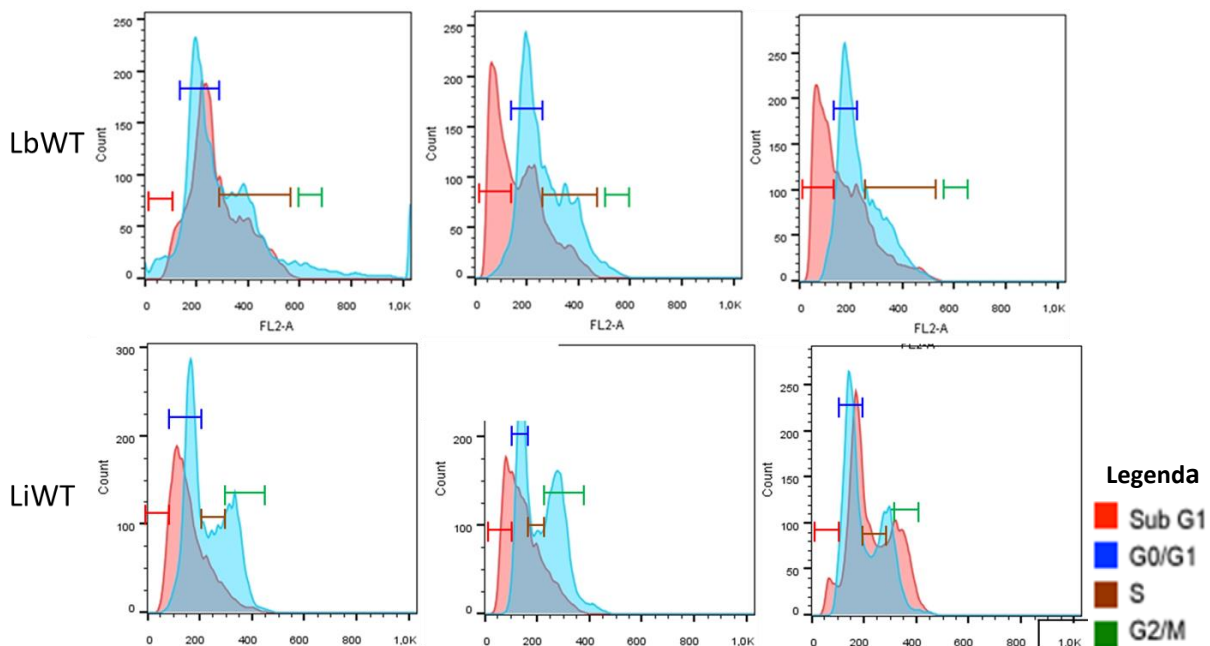


Figura 24: Análise comparativa do ciclo celular de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os parasitos foram tratados com $350\mu M$ de H_2O_2 por 20 minutos, lavados em PBS e incubados pelos períodos de 24, 48 e 72h de crescimento. Na figura acima podemos observar que a *L. braziliensis* apresenta um perfil não clássico, diferente da *L. infantum*. Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LiWT – *L. infantum* Wild Type (Parental), picos em azul claro: não tratados, picos em vermelho: tratados e azul escuro: sobreposição das curvas.

A comparação do ciclo celular de *L. braziliensis* não transfectada (parental) com os clones superexpressores de MutT após o tratamento com H₂O₂ (FIG. 25) demonstra, principalmente no tempo de 48h, que o perfil dos superexpressores é diferente do parental. Esses clones conseguem iniciar a fase de transcrição celular e se multiplicam, por outro lado os parasitos parentais param na fase subG1. Análise do perfil do ciclo celular de *L. infantum* parental tratada com H₂O₂ foi muito semelhante ao perfil dos clones superexpressores de MutT (dados não mostrados). Esse resultado corrobora com os dados mostrando que a superexpressão do gene MutT em *L. infantum* não afeta a susceptibilidade dos parasitos ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂.

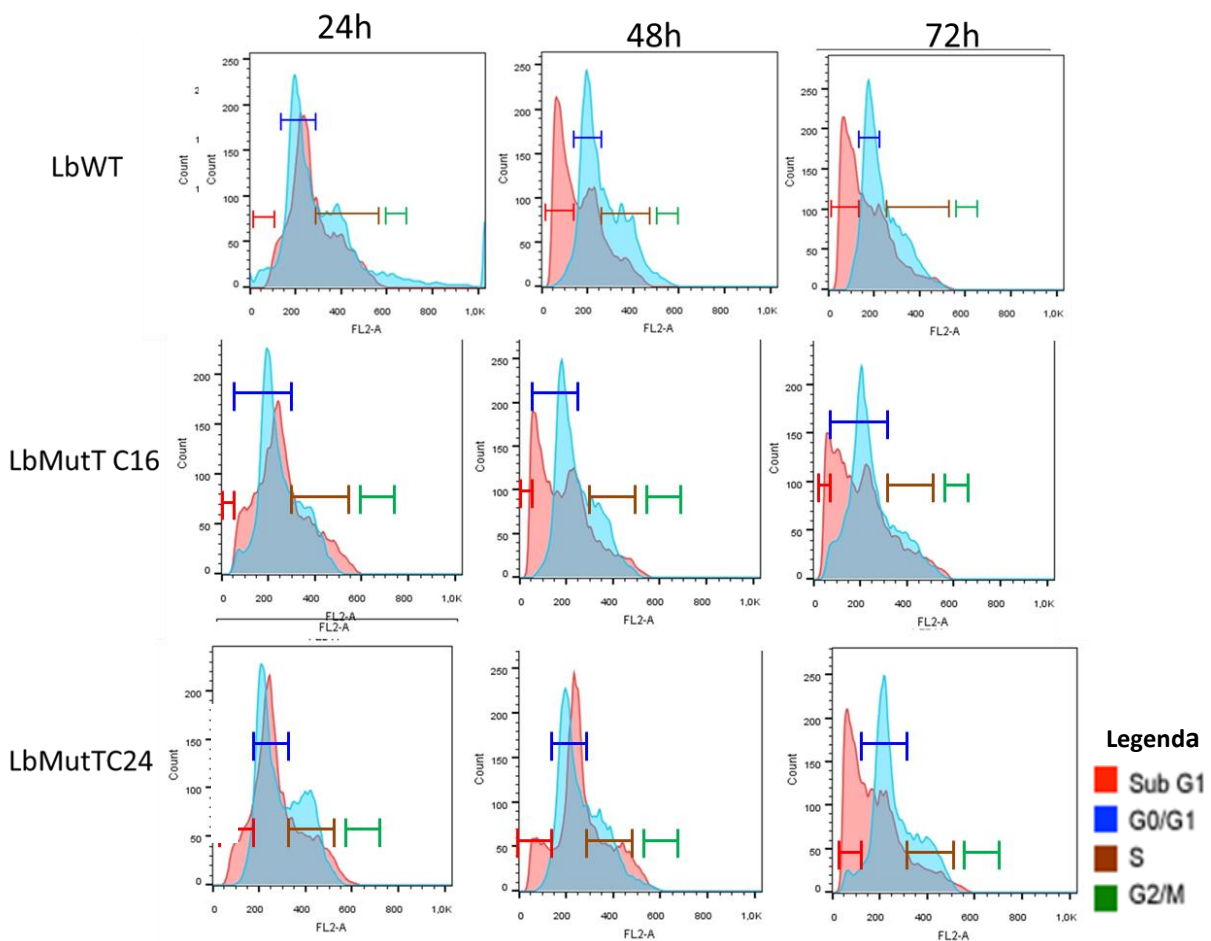


Figura 25: Análise comparativa do ciclo celular de *L. braziliensis* parental e seus clones superexpressores de MutT. Os parasitos foram tratados com 350µM de H₂O₂ e incubados pelos períodos de 24, 48 e 72h de crescimento. Na figura acima podemos observar que a *L. braziliensis* parental apresenta um perfil não clássico bem como seus clones superexpressores de MutT. Legenda: LbWT – *L. braziliensis* Wild Type (Parental), LbMutT C:16 – *L. braziliensis* superexpressora de MutT Clone 16, LbMutT C:16 – *L. braziliensis* superexpressora de MutT Clone 24, picos em azul: não tratados, picos em vermelho: tratados e azul escuro: sobreposição das curvas.

5.8 Análise do efeito do estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ no perfil cromossômico dos parasitos transfectados com o gene da MutT

O perfil cromossômico dos parasitos superexpressores do gene *mutT* e parentais foi analisado após o tratamento com H₂O₂. Inicialmente os parasitos foram tratados com 200 µM de H₂O₂ durante 20 min, posteriormente eles foram incubados em M199 durante 24h e 48h. Após esse período eles foram lavados e emblocados em agarose para análise do PFGE. Nesta etapa a concentração de parasitos foi determinada e a mesma quantidade de parasitos/mL foi ajustada para que não houvesse diferenças entre a concentração de parasitos por bloco.

Os resultados mostraram que o perfil cromossômico dos parasitos foi mais bem definido usando pulsos de maior tempo (90s por 18h, 200s por 18h, 400s por 22h e 600s por 7h, totalizando uma corrida de 65h) (FIG. 26 B) comparado com a condição 1 (60 s por 24h e 120 s por 24h, totalizando uma corrida de 48h.) (FIG. 26 A). Nas amostras de *L. braziliensis*, observamos um arraste ao fundo, mas foi possível verificar a presença de bandas cromossomais variando de 365 a 2.200 Kb.

A figura 26 B apresentou melhor resolução das bandas cromossomais e foi possível comparar os perfis dos parasitos. Os resultados mostraram que o perfil cromossômico foi similar entre os parasitos para ambas as espécies de *Leishmania* analisadas parentais e superexpressores tratados e não tratados com H₂O₂. Os resultados indicam que a superexpressão de MutT não protegeu os parasitos contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Observamos também que os perfis cromossomais, principalmente de *L. infantum* tratada (parasitos parentais e clones superexpressores), foram mais fracos, quando comparados com aqueles não tratados. Isto ocorreu possivelmente devido à influência do H₂O₂ nesses parasitos, uma vez que a quantidade dos mesmos nos blocos foi cuidadosamente ajustada para cada amostra e foi utilizada a mesma quantidade de parasitos por bloco.

Análise do perfil cromossômico dos parasitos superexpressores do gene *mutT* e parentais não foi avaliado após o tratamento com SbIII, uma vez que não observamos diferenças significativas na susceptibilidade desses parasitos ao antimônio.

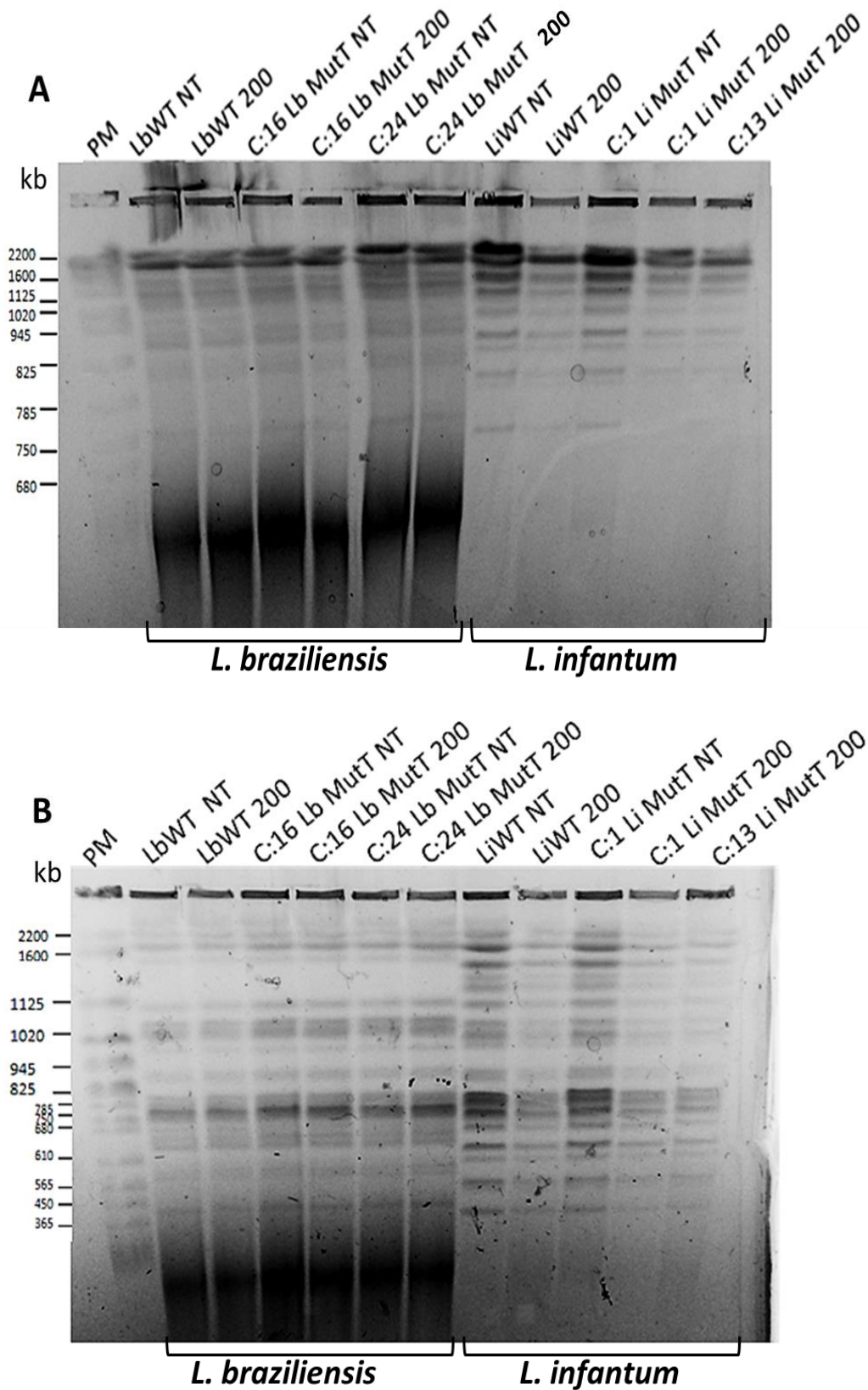


Figura 26: Perfil cromossômico por PFGE. As bandas cromossômicas de *L. braziliensis* e *L. infantum*, selvagens e os clones superexpressores de MutT, foram separadas por PFGE, após o tratamento com H_2O_2 em períodos de 24h – Condição 1 (A) e 48h – Condição 2 (B). O PFGE foi feito em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo. Como marcador molecular, foram utilizados os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*.

6 Discussão

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública nos países em que elas são endêmicas, sendo registrados 1.6 milhão de novos casos a cada ano e 310 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção dessas doenças (WHO, 2015). O esquema terapêutico adotado pelos países endêmicos para leishmaniose é baseado no uso dos antimoniais, que são atualmente as drogas de primeira escolha. O tratamento das leishmanioses com compostos derivados de antimônio é realizado desde a década de 40, porém, acredita-se que o abandono do tratamento, o uso de doses sub-letais e a administração inadequada do fármaco fazem com que a resistência aos antimoniais seja muito alta. Dessa forma, em países onde o índice de resistência é alto, a quimioterapia das leishmanioses é feita com a Anfotericina B (HERWALDT, 1999; SUNDAR *et al.*, 1994). A ausência de uma vacina eficiente para uso humano torna a quimioterapia a única forma de tratamento das leishmanioses. Assim, é necessária a descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos para melhorar o tratamento das leishmanioses.

A *Leishmania* necessita de um sistema de defesa antioxidante eficaz, pois o parasito está constantemente exposto a espécies reativas de oxigênio, sejam elas produzidas pelo uso de fármacos anti-leishmania ou de processos intrínsecos do hospedeiro. Após a infecção do hospedeiro vertebrado, as *Leishmanias* são fagocitadas por macrófagos ativos, desencadeando diversas reações do sistema de defesa do hospedeiro. No processo da infecção outros mecanismos celulares são ativados, como a explosão oxidativa, que se dá através da ação da NADPH oxidase em conjunto com citocinas como o IFN- γ e o TNF- α (ASSCHE *et al.*, 2011). Assim, ao ativar processos oxidativos, uma série de fatores se inicia, sendo o principal deles as lesões no DNA, que podem ser causadas, na maioria das vezes, pela incorporação da 8-oxoG uma vez que ela é uma das lesões oxidativas mais abundantes (NEELEY, ESSIGMAN, 2006). Portanto, é essencial a presença de uma enzima responsável por reparar essas lesões ou até mesmo preveni-las, como é o caso da enzima MutT, que tem a capacidade de hidrolisar a 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP presente no pool de nucleotídeos, prevenindo a incorporação da guanina oxidada no momento da replicação do DNA (MAKI, SEKIGUCHI, 1992).

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o papel da expressão heteróloga do gene *mutT* de *E. coli* na resistência ao antimônio e na resposta ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ em *L. braziliensis* e *L. infantum*. Dessa forma, foi realizada transfecção estável do gene da MutT nessas duas espécies de *Leishmania* e o fenótipo dos parasitos foi avaliado. Foti *et al.* (2012) realizou estudo em bactérias onde mostra que a presença de diversas lesões 8-oxoG no DNA são capazes de parar a forquilha de

replicação, devido ao fato dessas lesões não serem reparadas com eficiência, induzindo então a formação de quebras de dupla-fita (DSB) que geram morte celular.

Nesse estudo observamos que as linhagens de *Leishmania* spp. são sensíveis ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ em todas as concentrações utilizadas. Entretanto observamos que a espécie de *L. braziliensis* é mais suscetível à ação do peróxido quando comparada com a *L. infantum*. Porém, ao superexpressar o gene *mutT* de *E.coli*, a *L. braziliensis* apresentou resistência a ação do H₂O₂. Os resultados, portanto nos levam a afirmar que a MutT em *L. braziliensis* é importante por conferir resistência ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Esses dados corroboram os resultados de Aguiar *et al.* (2013), que mostraram que *T. cruzi* superexpressando MutT são mais resistentes a ação do H₂O₂ apresentando sobrevivência de 95% quando comparado com os parasitos selvagens.

A superexpressão do gene *mutT* de *E. coli* em *L. infantum* não alterou a susceptibilidade dos parasitos ao H₂O₂. Diferentemente de *L. braziliensis*, o crescimento dos clones de *L. infantum* superexpressores de MutT após o tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂ foi semelhante ao parental, mostrando que a susceptibilidade ao H₂O₂ se manteve inalterada. Acreditamos que esse resultado de *L. infantum* seja devido a uma resistência natural dessa espécie a agentes oxidantes e que a MutT não está envolvida na proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Isso é comprovado pelo perfil de ciclo celular dessa espécie, onde *L. braziliensis* tem uma tendência de recuperação da ação do H₂O₂ mais lenta que a *L. infantum*, conforme demonstrado na figura 24. Observamos que *L. infantum* é mais resistente à ação dos antioxidantes e consegue escapar mais rápido dos efeitos desses agentes.

Outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que *L. infantum* é mais resistente ao H₂O₂ comparado com *L. guyanensis*, espécie do mesmo subgênero (*Viannia*) da *L. braziliensis* (Maísa Fonseca *et al.* em preparação). Outro estudo demonstrou que a incubação de *L. braziliensis* com prolina (aminoácido que protege as células contra o estresse oxidativo) aumenta 4 vezes a resistência dos parasitos ao SbIII. Por outro lado, nenhuma alteração no fenótipo foi observada com *L. infantum*, demonstrando que essa espécie é mais resistente ao estresse oxidativo gerado pelo SbIII e a prolina nesse caso não aumenta a proteção contra o estresse oxidativo (Ellen Gonçalves *et al.* em preparação).

O uso de fármacos, no tratamento das leishmanioses, causa um ambiente hostil ao parasito, onde o mesmo tem que sobreviver a ação da droga e de processos oxidativos desencadeados pela droga ou pelo próprio parasito. Portanto, a quantidade de 8-oxoG formada aumenta a probabilidade de lesões, e para isso a dosagem do nível dessa base oxidada é muito importante, servindo de confirmação da indução de ROS pelas drogas usadas na quimioterapia das leishmanioses. Rajão *et al.* (2013) dosou a quantidade de 8-

8-oxoG em amostras de *T. cruzi* selvagens e superexpressores de MutT após tratamento com Benznidazol (BZ), e verificou que os superexpressores do gene *mutT* apresentavam níveis mais baixos de 8-oxoG. Confirmando então que esta droga é capaz de induzir a formação de 8-oxoG e que a superexpressão de MutT diminui a quantidade de 8-oxoG protegendo o parasito do efeito da droga, evitando a ocorrência de lesões no DNA. Em nosso estudo vamos dosar a quantidade de 8-oxoG nos parasitos parentais e superexpressores de MutT na ausência e presença de antimônio SbIII e H₂O₂. As amostras foram preparadas e enviadas para USP, entretanto devido a um defeito no equipamento elas ainda não foram analisadas.

Em relação ao teste de susceptibilidade ao SbIII, os resultados demonstraram que tanto os parasitos selvagens quanto os clones superexpressores de MutT, sofrem a mesma ação de inibição de crescimento quando exposto ao SbIII. Esses dados sugerem que a MutT em *Leishmania* não está diretamente envolvida na proteção dos parasitos ao efeito do SbIII. Em *T. cruzi* a MutT exerce importante função na defesa contra os efeitos provocados pelo BZ. Rajão *et al.* (2013), demonstrou que *T. cruzi* superexpressando o gene *mutT* de *E. coli* apresentaram um índice de resistência ao BZ 3 vezes maior que os parasitos parentais. Em outros estudos realizados pelo nosso grupo, foi demonstrado que a superexpressão de enzimas da via de defesa antioxidante, triparedoxina peroxidase (ANDRADE; MURTA, 2014) e ferro superóxido dismutase (TESSAROLLO *et al.*, 2015), aumentaram a resistência de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao antimonial. Esses dados demonstram o envolvimento dessas enzimas da defesa antioxidante no fenótipo de resistência de *Leishmania* spp. ao antimonial.

Nossos resultados demonstraram que a superexpressão do gene *mutT* em *L. braziliensis* conferiu maior resistência ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. É interessante ressaltar que clones de *L. braziliensis* superexpressores de triparedoxina peroxidase também são mais resistentes ao H₂O₂ (ANDRADE, MURTA, 2014). Esses dados mostram a importância desses genes na proteção dos parasitos contra o estresse gerado pelo H₂O₂.

Para verificar se a enzima MutT protege os parasitos contra as quebras no DNA genômico de *Leishmania* provocadas pelo H₂O₂, analisamos o perfil cromossômico dos parasitos parentais e superexpressores de MutT tratados ou não com H₂O₂ através da técnica de PFGE. Não observamos alteração no perfil cromossômico desses parasitos. Perfis semelhantes foram observados entre os parasitos parentais e superexpressores de MutT após o tratamento com H₂O₂, para ambas espécies de *Leishmania* analisadas. Rajão *et al.* (2013) observaram que o BZ gera uma degradação cromossômica representado por um

arraste no gel de PFGE, entretanto *T. cruzi* superexpressando o gene *mutT* não apresenta esse perfil de degradação, devido à proteção dos parasitos pela enzima MutT.

Foti *et al.* 2012, relatou em seu estudo com *E. coli*, que a incorporação de 8-oxodGTP durante a fase S do ciclo celular pode levar a quebras de dupla-fita (DSB) devido aos altos níveis de lesões ineficientemente reparadas. Nesse contexto analisamos o ciclo celular dos parasitos parentais e superexpressores de MutT após o tratamento com H₂O₂. É interessante ressaltar que *L. braziliensis* após o tratamento com H₂O₂ permanece por mais tempo na fase subG1, impossibilitando a replicação dos parasitos e apresentando demora para retornar o seu ritmo normal de crescimento. Acreditamos que isso ocorra devido a maior incorporação de 8-oxoG pela *L. braziliensis* que gera quebras de fitas-duplas do DNA. Já a *L. infantum* apresentou um perfil clássico de ciclo celular e os parasitos após o tratamento com H₂O₂ retornam ao seu perfil normal de crescimento. Assim, provavelmente essa espécie incorpora menos 8-oxoG, apresenta menos quebras duplas no DNA sendo portanto mais resistente ao tratamento com H₂O₂. Para melhor compreender esses resultados seria importante fazer novas análises de citometria de fluxo com essas espécies de *Leishmania* tratadas com drogas capazes de inibir as fases de replicação e transcrição do ciclo celular.

A comparação do ciclo celular de clones de *L. braziliensis* superexpressores de MutT após o tratamento com H₂O₂ mostrou que esses parasitos conseguem iniciar a fase de transcrição celular e se multiplicam, por outro lado os parasitos parentais param na fase subG1. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada entre o perfil do ciclo celular de *L. infantum* parental e os clones superexpressores de MutT. Esses resultados corroboram com os dados mostrando que a superexpressão do gene MutT protege *L. braziliensis* contra o estresse oxidativo, mas não *L. infantum*. Diante dos resultados obtidos nesse projeto, propomos um modelo para explicar as diferenças do estresse oxidativo entre *L. braziliensis* e *L. infantum*. (FIG. 27).

Dessa forma acreditamos que são necessários mais estudos sobre o papel dessa enzima na via de reparo de DNA em *Leishmania* para obter um melhor entendimento da resposta ao estresse oxidativo e replicativo nesses parasitos e a resistência ao antimonial. Estudos aprofundados são essenciais devido à grande importância das Leishmanioses no contexto da saúde pública. A partir de novos conhecimentos sobre as vias de reparo de DNA e defesa contra o estresse oxidativo desse parasito pretendemos descobrir mecanismos de resistência a drogas e novos alvos para o tratamento dessa importante doença negligenciada.

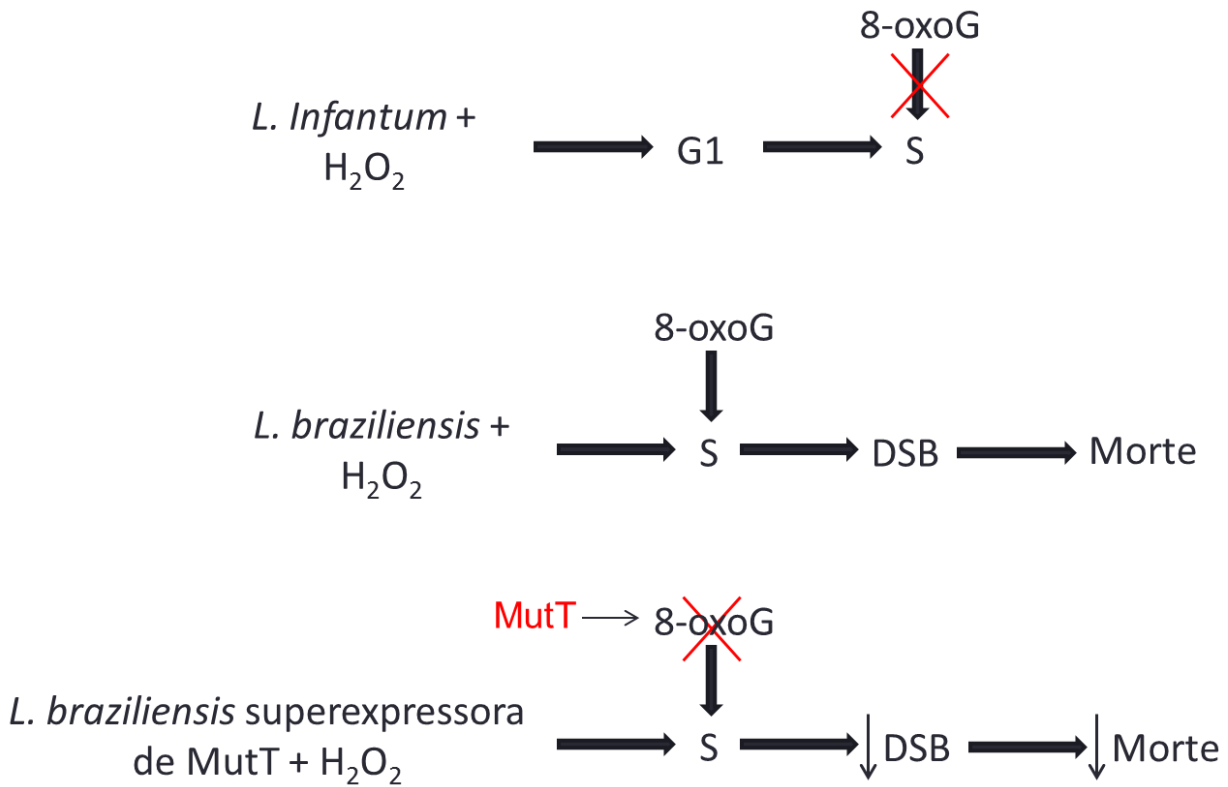


Figura 27: Modelo proposto para explicar as diferenças da resposta ao estresse oxidativo em *L. braziliensis* e *L. infantum*. *L. infantum* tanto parental quanto superexpressora de MutT, tratadas com H_2O_2 conseguem chegar a fase S por incorporarem menos 8-oxoG. A *L. braziliensis* parental tratada com H_2O_2 durante a fase S do ciclo celular, incorpora 8-oxoG, que gera a quebra de dupla-fitas de DNA (DSB) ocasionando então a morte dos parasitos. Por outro lado, *L. braziliensis* superexpressora de MutT ao ser tratada com H_2O_2 não incorpora tanto 8-oxoG (pois a enzima MutT hidrolisa essa base no pool de nucleotídeos, impedindo que ela seja incorporada no DNA momento da replicação) e com isso diminui as quebras de dupla-fita (DSB) diminuindo consequentemente a morte dos parasitos.

7 Resumo dos resultados

- A expressão heteróloga de MutT de *E. coli* em promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* não alterou o fenótipo de resistência de ambas espécies ao tratamento com antimônio.
- *L. infantum* é mais resistente ao estresse gerado pelo H₂O₂ do que *L. braziliensis*.
- As formas promastigotas de *L. braziliensis* superexpressoras do gene *mutT* de *E. coli* foram mais resistentes ao tratamento com H₂O₂.
- A enzima MutT de *L. infantum* parece não estar diretamente envolvida na proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂.
- *L. braziliensis* após o tratamento com H₂O₂ permanece por mais tempo na fase subG1 do ciclo celular, apresentando demora para retornar o seu ritmo normal de crescimento.
- *L. infantum* apresentou um perfil clássico de ciclo celular e os parasitos após o tratamento com H₂O₂ retornam ao seu crescimento normal.
- Os perfis das bandas cromossomais na presença e ausência de estresse foram similares entre os parasitos parentais e os superexpressores de MutT.

8 Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que a MutT está envolvida na proteção contra o estresse oxidativo em *L. braziliensis*, mas não em *L. infantum*. Essa enzima não está diretamente associada com o fenótipo de resistência de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao antimônio trivalente. A espécie *L. infantum* é mais resistente ao estresse gerado pelo H_2O_2 do que *L. braziliensis*. Provavelmente isso é devido à menor incorporação de 8-oxoG pela *L. infantum* que gera menor número de quebras de fitas-duplas no DNA comparado com *L. braziliensis*.

9 Perspectivas

- Determinar os níveis de 8-oxoG produzidos pelos parasitos não transfectados e transfectados com o gene *mutT*.
- Realizar novas análises de citometria de fluxo e PFGE com as espécies de *L. braziliensis* e *L. infantum* tratadas com drogas capazes de inibir as fases de replicação e transcrição do ciclo celular.

Referências

- AGUIAR, P. H. *et al.* Oxidative stress and DNA lesions : the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. **Plos Neglected Tropical Diseases**. 2013.
- ANDRADE, Juvana M.; MURTA, Silvana, M. F. Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasites and Vectors**. 2014. v.7, n 1. 406p.
- ASSCHE, T. V., *et al.* *Leishmania*-macrophage interactions : insights into the redox biology. **Free Radical Biology e Medicine**. v.51, p.337-351, 2011.
- BARAK, *et al.* Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 141, n. 1, p. 99–108. 2005.
- BARBOSA *et al.* Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. **Biochimica et Biophysica Acta**. p.462-471, 2010.
- BATES, P.A., ROGERS, BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev Infect Dis**. v.10, n.3, p.560-86, 1988.
- BERMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1985, v. 27, n. 6, p. 916-920.
- BERMAN, J.D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J.M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochemical Pharmacology**, 1987, v. 36, n. 2, p. 197-201.
- BESSMAN, M.J., FRICK, D.N., O'HANDLEY, S.F. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. **J. Biol. Chem.** n.271, p.25059–62. 1996.
- BIRBEN, E. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of World Allergy Organization**. v. 5, p.9–19. 2012.
- BOITEUX, S., O'CONNOR, T. S., LAVAL, J. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* : cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. **EMBO Journal**. v.6, n.10, p.3177-3183, 1987.
- BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasil: [s.n.], 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar americana**. 2 ed. Brasil: [s.n.], 2007.
- CHAPPUIS, F., *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**. v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CROFT, SL.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**. n.17, p.1478-1483. 2011.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**. v. 447, n.7147, p.941-50, 2007.

DESJEUX P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**. n.27, p.305-318, 2004.

FINKEL T., HOLBROOK N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. n.408, p.239–47, 2000.

FINZI, J. K. *et al.* Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol Biochem Parasitol**. v.133, n.1, p.37-43, 2004.

FOTI J.J., DEVADOSS B., WINKLER J. a., COLLINS J.J., WALKER G.C. (2012) Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. **Science** 336: 315–319.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**. v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**. 1999, v. 354, p. 1191-1199.

HUBER, W; KOELLA, J.C. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. 1993. **Acta Trop**. v.55, p.257-261.

JOHN,Lijo; JOHN,George J.; KHOLIA, Trupti. A Reverse Vaccinology Approach for the Identification of Potencial Vaccine Candidates from *Leishmania* spp. **Appl Biochem Biotechnol**. n.167, p.1340-1350, 2012.

KLAUNIG, J.E., KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. n.44, p.239–67, 2004.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. **Nature**. n.227,p.680-685, 1970.

MCLENNAN, A. G. The Nudix hydrolase superfamily. **Cell Mol Life Sci**. v.63, n.2, p.123-43, 2006.

MILDVAN, A.S. *et al.* Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.433, p.129-143. 2005.

MICHALICK, Marilene Susan Marques. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.41-46. cap.7.

MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R., SARAIVIA, N.G. **Advances in leishmaniasis**. 2005. Lancet 366, 1561-1577.

MUTT. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5590913> > Acesso em: 09 maio 2014.

- NOVO, E., PAROLA, M. (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis Tissue Repair**. 1: 5.
- OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat**. 2004; 7:257-266.
- RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 2013.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed.1991. p.182-226.
- REY L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3 ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001. p. 137-150.
- ROBERTS, W.L., MCMURRAY, W.J., RAINEY, P.M. 1998. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (Glucantime). **Antimicrob Agents Chemother**. 42: 1076-1082.
- ROBINSON, K.A., BEVERLEY, S.M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v.128, n.2, p.217-28, 2003.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. 2001. Molecular Cloning. 3ed. 3 vol. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.
- SANTOS O. D., *et al.* Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. **Parasitol Res**. n.103, p.1- 10, 2008.
- SETOYAMA, D., ITO R., TAKAGI, Y., SEKIGUCHI, M. Molecular actions of *Escherichia coli* MutT for control of spontaneous mutagenesis. **Mutat. Res**. v.707, p.9-14, 2011.
- SERENO, D; HOLZMULLER, P; MANGOT, I. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2001, v. 45, n. 7, p. 2064- 2069
- SHIBUTANI, Shinya; TAKESHITA, Masaru; GROLLMAN, Arthur P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**. v.349, p.431 – 434, 1991.
- SMITH, C.L., KLCO, S.R., CANTOR, C.R., 1988. Pulsed-field electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In: Davies, K.E., (Ed.), **Genome Analysis: a practical approach**, IRL Press, Oxford, England. pp. 41-72.
- SOUZA W. de, CARREIRO I.P., MIRANDA K., SILVA N.L. **Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*** . Anais da Academia Brasileira de Ciências. n.72 p.421- 432, 2000.
- SUNDAR, S; THAKUR, BB; TANDON, AK. *et al.* Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. **British Medical Journal**, 1994, v. 308, n. 6924, p. 307.
- TESSAROLLO, N.G.; ANDRADE, J.M. ; MOREIRA, D.S. ; MURTA, S.M.F. . Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasitology International**, v. 64, p. 125-129, 2015.

TIUMAN TS, SANTOS AO, NAKAMURA TU, FILHO BPD, NAKAMURA CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int. J. Infect. Dis.** 2011; 15: e525- e532.

TOWBIN, H., STAHELIN T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76:4350-4.

TRITRYPDB. Disponível em: <<http://tritypdb.org/tritypdb/>> Acesso em: 05 jan 2015

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects of Medicine.** 2004. 25:211-220.

VAN LOON, B., MARKKANEN, E., HÜBSCHER U. (2010). Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair** 9: 604–16.

VAN DER KEMP, P. A., THOMAS, D., BARBEY, R., OLIVEIRA, R., BOITEUX, S., 1996. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.93, 5197-5202p.

WYLLIE, S; CUNNINGHAM, ML; FAIRLAMB, AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **The Journal of biological chemistry**, 2004, v. 279, n. 38, p. 39925-32.

WYLLIE S, MANDAL G, SINGH N, SUNDAR S, FAIRLAMB A H, CHATTERJEE M. Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive. *Leishmania donovani* field isolates. **Mol Biochem Parasitol.** 2010; 173: 152-164.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em: 29 dez 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.**2015. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 29 dez 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 29 dez 2015.