

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Marianna Kunrath Lima**

**O Sistema GO em *Trypanosoma cruzi*:  
caracterização dos genes *TcOGG1* e *TcMYH***

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado**

**Belo Horizonte**

**Dezembro de 2013**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

**O SISTEMA GO EM *Trypanosoma cruzi*:  
CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *TcOGG1* E *TcMYH***

**Marianna Kunrath Lima**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

Dezembro de 2013



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIANNA KUNRATH LIMA.** Aos dezesseis dias do mês de dezembro de 2013 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O sistema GO em *Trypanosoma cruzi*: caracterização dos genes TcOGG1 e TcMYH", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Débora de Oliveira Lopes (Universidade Federal de São João Del-Rei), aprovada; Dr. Riva de Paula Oliveira (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2013.

Dr. Débora de Oliveira Lopes (Universidade Federal de São João Del-Rei)

Dr. Riva de Paula Oliveira (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz  
 Coordenador de Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

Dedico esta dissertação àqueles que me incentivaram  
e me ajudaram durante o progresso deste trabalho.

## Agradecimentos

Poderia dizer que muitas foram as pessoas que, direta, ou indiretamente, tiveram alguma influência sobre o desenvolvimento de minha dissertação, porém, aquelas que efetivamente deixaram sua marca foram poucas.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Renato Machado pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Já são mais de cinco anos de parceria, nos quais tive o prazer de aprender a ser cientista, o que modificou incrivelmente meu modo de interpretar a vida.

Também gostaria de agradecer aos meus mestres (que na verdade são doutores), Carolina Furtado e Matheus Rajão, que mesmo com a distância mantiveram-se presentes em minha vida. Espero que nunca deixem de me dar seus preciosos conselhos!

Meu grupo de consultores sêniores: Pedro, Ceres, Isabela, João Pedro. Além de saberem tudo sobre tudo, são ótimos amigos! Para os momentos de discussão de resultados e para os momentos em que eu queria esquecer os resultados.

Meu irmão científico, Bruno, que faz pose de durão, mas no fundo é um doce de pessoa. Sei que sempre posso contar com sua ajuda.

Aos colegas do grupo de reparo, Anna, Bruno, Ceres, Egídio, Héllida, Isabela, João Pedro, Samuel, Selma, Paula, Pedro, agradeço pelas dicas e pela companhia sempre agradável.

Às professoras do laboratório, Andréa Macedo e Glória Franco, obrigada pelos conselhos e críticas dados nas reuniões de laboratório, que auxiliaram em um melhor desenvolvimento do projeto.

À Neuza, sou grata pelas instruções iniciais e por me lembrar que sempre devemos estar atentos a tudo que fazemos, pois todas nossas ações geram consequências. Também agradeço pelo trabalho de organização do laboratório, sem o qual seria impossível trabalhar. À Kátia, Camila, Ana Carolina e Sabrina pelo apoio técnico e disponibilidade para ajudar.

Aos colegas de laboratório que, além de me ajudarem nas questões científicas, também fizeram esta jornada mais alegre, com piadas, viagens a congressos, chocolates e confraternizações. Gostaria de agradecer especialmente a Mika, Mari Boroni, Mari Costa, Elizângela, Sílvia, Rodrigo, Maíra, Isabella e Heron pela amizade e companheirismo.

Aos laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas, principalmente do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que auxiliaram com o empréstimo de materiais e também com o compartilhamento de conhecimento.

Aos meus amigos da graduação, especialmente Zazu e Pat, pelos momentos de distração e pelo compartilhamento dos anseios e projetos para o futuro.

Aos meus amigos do Magnum, o BDVA, que com nossos encontros me fizeram lembrar que existe vida além do laboratório!

Finalmente, irei agradecer à minha família, que é o que me dá a base para que eu alcance meus objetivos. Aos meus pais, Anna e Geraldo, pelo apoio incondicional e por terem me ensinado a sempre dar o melhor de mim, mesmo nos momentos em que as adversidades parecem ser intransponíveis. Vocês dois são meus maiores exemplos, tenho muito orgulho de ser filha de vocês! Ao meu cunhado Denis, pelo companheirismo e por sempre tentar elevar minha autoestima! À minha irmã Graciela, por me consolar nos meus momentos de angústia, por opinar sobre meus experimentos e me dar dicas para trilhar o tortuoso caminho de ser cientista.

Muito obrigada a todos!

***“Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time.”***

***“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas mais uma vez.”***

**Thomas Edison**

## Sumário

Resumo.....	i
Abstract .....	iii
Lista de figuras .....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Danos ao DNA e estresse oxidativo .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.Reparo de danos oxidativos: o reparo por excisão de bases (BER).....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. A lesão 8-oxoguanina .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2.O sistema GO.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1.Estresse oxidativo e <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2.Reparo de danos oxidativos em <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2.1. O sistema GO em <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Alinhamento de sequências de aminoácidos e predição de localização subcelular .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Células e meios de cultura .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Oligonucleotídeos e amplificação de DNA por PCR .....</b>	<b>25</b>

3.4. Plasmídios e clonagem de fragmentos de DNA .....	28
3.4.1. Vetores plasmidiano .....	28
3.4.2. Clonagem.....	28
3.5. Transformação de bactérias eletrocompetentes .....	29
3.6. Obtenção de DNA plasmidiano .....	29
3.7. Digestão de plasmídios com enzimas de restrição.....	30
3.8. Purificação de DNA de bandas de gel de agarose .....	30
3.9. Dosagem de DNA .....	30
3.10. Sequenciamento de DNA.....	31
3.11. Ensaio em <i>Escherichia coli</i> .....	31
3.11.1. Taxa de mutação espontânea – Complementação funcional heteróloga.....	32
3.12. Expressão e purificação de proteínas .....	32
3.13. Ensaio <i>in vitro</i> com <i>TcMYH</i> .....	33
3.14. Ensaio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
3.14.1. Transformação de leveduras .....	34
3.14.2. Análise do efeito da expressão de <i>TcOGG1</i> sobre o crescimento de leveduras.....	35
3.14.3. Frequências de mutações espontâneas – Complementação funcional heteróloga.....	35
3.15. Ensaio com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
3.15.1. Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	35
3.15.2. Transfecção.....	36
3.15.3. Extração de RNA total e Northern blot.....	37
3.15.4. Curva de crescimento.....	38
3.15.5. Curvas de sobrevivência.....	38
3.15.6. Tratamento com peróxido de hidrogênio .....	38
3.15.7. Tratamento com benzonidazol .....	39

3.15.8. Análise do número de lesões por QPCR .....	39
3.15.8.1. Tratamento genotóxico para análise de número de lesões .....	39
3.15.8.2. Extração de DNA de alto peso molecular .....	40
3.15.8.3. Dosagem das amostras de DNA .....	40
3.15.8.4. Amplificação por QPCR.....	41
3.15.8.5. Análise dos resultados .....	43
3.16. Microscopia confocal e de fluorescência.....	44
3.17. Análise estatística .....	45
4. RESULTADOS .....	46
4.1. <i>TcOGG1</i> .....	47
4.1.1. <i>TcOGG1</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
4.1.2. <i>TcOGG1</i> em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
4.1.1.1. A superexpressão de <i>TcOGG1</i> não altera a resposta de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com benzonidazol.....	54
4.1.1.2. Análise das lesões no DNA mitocondrial e nuclear de <i>T. cruzi</i> superexpressor de <i>OGG1</i> .....	54
4.1.1.3. <i>TcOGG1</i> localiza-se no núcleo e na mitocôndria de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
4.2. <i>TcMYH</i> .....	60
4.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> possui um homólogo de <i>MutY</i> .....	60
4.2.2. <i>TcMYH</i> complementa bactérias deficientes em <i>MutY</i> .....	63
4.2.3. <i>TcMYH</i> é capaz de excisar uma adenina pareada com 8-oxoguanina .....	65
4.2.4. <i>TcMYH</i> em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	70
4.2.4.1. A superexpressão de <i>TcMYH</i> aumenta a sensibilidade de <i>T. cruzi</i> a peróxido de hidrogênio.....	70
4.2.4.2. A superexpressão de <i>TcMYH</i> não altera a sensibilidade de <i>T. cruzi</i> a benzonidazol .....	73

4.2.4.3. <i>TcMYH</i> está localizada no núcleo e nos sítios antipodais de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	73
5. DISCUSSÃO .....	77
6. REFERÊNCIAS.....	87
7. ANEXOS .....	100
7.1. Anexo 1- pGEM <sup>®</sup> - T Easy Vector .....	101
7.2. Anexo 2- pMAL-c2g .....	102
7.3. Anexo 3- pYEDP .....	103
7.4. Anexo 4- pROCKGFP .....	104
7.5. Anexo 5- pTREXGFP .....	105
7.6. Anexo 6- Artigo publicado na revista PLoS ONE .....	106

## Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasita, causador da Doença de Chagas. Assim como a maioria dos organismos vivos, é susceptível ao estresse oxidativo e precisa adaptar-se a diferentes ambientes. Portanto, o reparo de DNA é essencial para sua sobrevivência e aumento da sua capacidade de infecção (Aguiar et al., 2013).

Dada a importância do reparo de DNA para *T. cruzi*, decidimos investigar se o parasito possui homólogos das enzimas OGG1 (*TcOGG1*) e MutY (*TcMYH*). Primeiramente, foram feitos ensaios de complementação funcional heteróloga. Para OGG1, foram feitos experimentos em *Escherichia coli*, porém, a expressão de *TcOGG1* foi tóxica tanto para células selvagens (WT - AB1157) quanto para células *fpg* <sup>-/-</sup> (BH20). Entretanto, a expressão de *TcOGG1* não foi tóxica para *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras mutantes *ogg1* <sup>-/-</sup> (CD138) possuem uma alta taxa de mutação espontânea, mas quando expressam *TcOGG1* esta taxa fica similar à observada para as células selvagens (WT – FF18733). Por outro lado, a expressão de *TcMYH* não foi tóxica para *E. coli* e complementou bactérias *MutY* <sup>-</sup>, reduzindo as frequências de mutantes para níveis similares às das células WT. Em ensaios *in vitro*, *TcMYH* foi capaz de remover uma adenina pareada com 8-oxoguanina. Também foram construídas linhagens de *T. cruzi* que superexpressam *OGG1* ou *MYH*. Embora em condições-padrão estas linhagens possuam crescimento similar às células controle, os superexpressores são mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio do que o controle. Quando tratados com benzonidazol, a droga utilizada no tratamento da Doença de Chagas, os superexpressores não demonstraram mudança em seu crescimento, em relação ao controle. Além disso, *T. cruzi* superexpressor de *TcOGG1* exibiu menores níveis de danos no DNA nuclear, mas não no kDNA (DNA do cinetoplasto (mitocôndria)). Isto pode estar relacionado à quantidade de enzima presente nestes compartimentos celulares, bem como à distribuição desigual de outras proteínas de reparo no núcleo e no kDNA. Experimentos de localização com *TcOGG1* ou *TcMYH* em fusão com GFP mostraram que ambas as enzimas encontram-se no núcleo e na mitocôndria do parasito.

Estes resultados sugerem que *T. cruzi* possui proteínas 8-oxoguanina DNA glicosilase e MutY DNA glicosilase funcionais, sendo que estas participam do BER nuclear e mitocondrial do parasito.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is a protozoan parasite, causative of Chagas disease. Like most living organisms, it is susceptible to oxidative stress, and needs to adapt to distinct environments. Hence, DNA repair is essential for its survival and improvement of infection (Aguiar et al., 2013).

Given the importance of DNA repair to *T. cruzi*, we decided to study if this protozoan has homologous of the enzymes OGG1 (*TcOGG1*) and MYH (*TcMYH*). First, we performed heterologous complementation assays. For OGG1, experiments were carried out in *Escherichia coli*, however, expression of *TcOGG1* was toxic both to wild type (WT) cell (AB1157) and to *fpg* *-/-* cells (BH20). Nevertheless, expression of *TcOGG1* was not toxic to *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast mutants *ogg1* *-/-* (CD138) have an increased spontaneous mutation frequency, but when they expressed *TcOGG1*, this frequency was similar to the one seen for the WT cell (FF18733). On the other hand, *TcMYH* was not toxic to *E. coli* and complemented the bacterial *MutY*- strain, reducing the mutation frequencies to a level similar to the wild type's frequencies. In *in vitro* assays, *TcMYH* was able to remove an adenine that was opposite to 8-oxoguanine. We have also constructed *T. cruzi* lineages that overexpress *OGG1* or *MYH*. Although in standard conditions these lineages have similar growth in comparison with control cells, the overexpressors are more sensitive to hydrogen peroxide than control. When overexpressor parasites were treated with benznidazole, the drug used in Chagas disease treatment, they exhibited no phenotype. Also, *TcOGG1*-overexpressor *T. cruzi* exhibited lower levels of DNA damage in the nucleus, but not in the kDNA (kinetoplast (mitochondrial) DNA). This might be related to the quantity of the enzyme present in each subcellular compartment and to the unequal distribution of other repair proteins in the nucleus and kDNA. Localization experiments with *TcOGG1* or *TcMYH* fused to GFP showed that the protozoan's enzymes are both nuclear and mitochondrial.

These data suggest that *T. cruzi* has functional 8-oxoguanine and MutY DNA glycosylases, which participate in nuclear and mitochondrial BER.

## Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do reparo por excisão de bases – BER..	4
Figura 2: Mecanismo de ação das glicosilases mono e bifuncionais, exemplificadas pela proteínas MutY (MYH) e OGG1.....	6
Figura 3: A lesão 8-oxoguanina.....	7
Figura 4: Sistema GO.....	9
Figura 5: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
Figura 6: A expressão de <i>TcOGG1</i> é tóxica para bactérias.....	16
Figura 7: Curvas de crescimento e de sobrevivência a peróxido de hidrogênio do clone CL Brener transfectado com pROCK ou com pROCK_ <i>TcOGG1</i> .....	18
Figura 8: Níveis de 8-oxoG nos genomas nuclear e mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i> , com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio.....	19
Figura 9: A expressão de <i>TcOGG1</i> não é tóxica em leveduras.....	48
Figura 10: Ensaio de mutação (complementação funcional heteróloga) com leveduras FF18733 (WT) e CD138 ( <i>ogg1</i> -) - qualitativo.....	50
Figura 11: Ensaio de mutação (complementação funcional heteróloga) com leveduras FF18733 (WT) e CD138 ( <i>ogg1</i> -) - quantitativo.	
Figura 12: Superexpressão de <i>TcOGG1</i> em <i>T. cruzi</i> .....	53
Figura 13: A superexpressão de <i>TcOGG1</i> não altera a resposta de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com benzonidazol.....	55
Figura 14: <i>T. cruzi</i> superexpressor de OGG1 possui maiores níveis de lesões no DNA nuclear, mas não no DNA mitocondrial.....	57
Figura 15: Localização de <i>TcOGG1</i> em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	59

Figura 16: Alinhamento das sequências protéicas de MutY de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>L. major</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> e <i>E. coli</i> .....	61
Figura 17: Amplificação e clonagem de <i>TcMYH</i> .....	62
Figura 18: Alinhamento das sequências de <i>TcMYH</i> obtidas por sequenciamento e da sequência de <i>TcMYH</i> depositada no banco de dados.....	64
Figura 19: <i>TcMYH</i> complementa bactérias deficientes em MutY.....	66
Figura 20: Expressão e purificação de MBP- <i>TcMYH</i> e de MBP.....	67
Figura 21: Excisão de uma adenina pareada com 8-oxoguanina por <i>TcMYH</i> ....	69
Figura 22: Curva de crescimento do clone CL Brener transfectado com pROCK-HIGRO_ <i>TcMYH</i> .	
Figura 23: Curva de sobrevivência do clone CL Brener transfectado com pROCK_ <i>TcMYH</i> em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio.....	72
Figura 24: A superexpressão de <i>TcMYH</i> não altera a sensibilidade de <i>T. cruzi</i> ao tratamento com benzonidazol.....	74
Figura 25: Localização subcelular de <i>TcMYH</i> .....	76
Figura 26: Comparação entre os domínios das proteínas Fpg de <i>E. coli</i> e OGG1 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>H. sapiens</i> .....	80

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1: Organismos e números de acesso das sequências utilizadas no alinhamento de MutY/MYH. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 2: Organismos e números de acesso das sequências utilizadas no alinhamento de Fpg e OGG1. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados para TcOGG1. Os sítios de restrição estão sublinhados. ....</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 4: Sequências dos iniciadores e oligonucleotídeos utilizados para TcMYH. Os sítios de restrição estão sublinhados. GO = 8-oxoguanina. O número 6 no início da sequência indica marcação com fluoresceína. ....</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 5: Aplicação dos diferentes pares de iniciadores/oligonucleotídeos. ...</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 6: Sequências dos iniciadores utilizados para sequenciar TcMYH. Os sítios de restrição estão sublinhados. ....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 7: Iniciadores usados no ensaio de QPCR. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 8: Aplicação dos diferentes pares de iniciadores. ....</b>	<b>42</b>

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>2xYT</b>	Meio de cultura <i>Yeast Tryptone 2x</i>
<b>8-oxodGMP</b>	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
<b>8-oxoG/8-oxoG</b>	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
<b>AP</b>	Apurínico/apirimidínico
<b>AP endonuclease</b>	Endonuclease de sítios apurínicos/apirimidínicos
<b>BER</b>	Reparo por excisão de bases
<b>BHI</b>	<b>Brain Heart Infusion</b> (Infusão de Cérebro e Coração)
<b>BLAST</b>	<b>Basic Local Alignment Search Tool</b> (Ferramenta de procura de alinhamento básico local)
<b>BSA</b>	<b>Bovine Serum Albumin</b> (Soroalbumina bovina)
<b>DAPI</b>	4-6-diamino-2-fenilindol
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Água duplamente destilada
<b>ddNTPs</b>	Didesoxirribonucleotídeo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DSB</b>	Quebra de dupla fita de DNA
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra-acético
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>GFP</b>	<b>Green fluorescent protein</b> (proteína verde fluorescente)
<b>GO</b>	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
<b>HU</b>	Hidroxiuréia
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>LIT</b>	<b>Liver infusion tryptone</b> (Tryptona de infusão de fígado)
<b>MBP</b>	<b>Maltose Binding Protein</b> (Proteína ligadora de maltose)
<b>MMR</b>	Reparo de Erros de Pareamento
<b>MOPS</b>	Ácido 3-(N-morpholino) propanosulfônico
<b>MSH</b>	Homólogo de MutS
<b>MTH</b>	Homólogo de MutT

<b>MutY</b>	MutY DNA glicosilase
<b>MYH</b>	Homólogo de MutY
<b>NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeos
<b>NIR</b>	Reparo por incisão de nucleotídeos
<b>OGG</b>	8-oxoguanina DNA glicosilase
<b>ORF</b>	Janela aberta de leitura
<b>PBS</b>	<b>Phosphate-buffered saline</b> (Salina tamponada com fosfato)
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células em proliferação
<b>PEG</b>	Poliétileno glicol
<b>QPCR</b>	<b>Quantitative PCR</b> (PCR quantitativa)
<b>SD</b>	<b>Synthetic Drop-Out Media</b> (Meio sintético)
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</b> (Eletroforese de gel de poliácridamida de sulfato dodecil de sódio)
<b>SNPs</b>	<b>Single Nucleotide Polymorphisms</b> (Polimorfismos de nucleotídeo único)
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutase</b>
<b>SSB</b>	Quebra de fita simples de DNA
<b>SSC</b>	<b>Saline sodium citrate</b> (Salina de citrato de sódio)
<b>TLS</b>	Reparo de síntese translesão
<b>UTR</b>	Região não traduzida
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta
<b>WT</b>	<b>Wild type</b> (Tipo selvagem)
<b>YNB</b>	<b>Yeast Nitrogen Base</b>
<b>YPD</b>	Meio de cultura para levedura a base de peptona, extrato de levedura e dextrose

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Danos ao DNA e estresse oxidativo

A manutenção da integridade do material genético é essencial para a sobrevivência e perpetuação dos organismos vivos (Lindahl, 1993). Porém, esta estabilidade pode ser alterada por danos causados ao DNA. Estes danos podem ser gerados por reações espontâneas (geralmente através de hidrólise), por produtos do metabolismo celular, como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (NOS), e por agentes exógenos físicos ou químicos, por exemplo, radiação ultravioleta (UV) e radiação ionizante (Hoeijmakers, 2009). Existem diversos tipos de danos, como quebras simples e duplas no DNA, erros de pareamento, formação de *crosslinks* e modificação de bases, como a 8-oxoguanina (Jackson & Bartek, 2009; Fry et al., 2005). Dentre os agentes modificadores da estrutura do DNA, o estresse oxidativo figura como um dos mais prevalentes (Gasche et al., 2001; Friedberg, 2003), devido ao fato de que a maioria dos organismos está susceptível a este, seja ele gerado endogenamente, ou exogenamente.

Espécies reativas de oxigênio são constantemente geradas, através da respiração celular, de reações redox cíclicas do tipo Fenton, catalisadas por metais, e de exposição a agentes ambientais, como radiação ionizante, produtos químicos oxidantes e metais de transição (Valko et al., 2007; Ercal et al., 2001; Klaunig & Kamendulis, 2004). EROs também podem ser gerados como resposta de neutrófilos e macrófagos a inflamações e infecções (Kawanishi et al., 2006). Durante o metabolismo aeróbio que ocorre na mitocôndria, a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) é convertida em duas moléculas de água. Porém, entre 0,2 e 2% do oxigênio molecular é convertido em EROs, devido à redução incompleta de  $O_2$ , o que gera ânions superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), que podem ser transformados em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), de forma espontânea, ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), sendo que esta molécula de  $H_2O_2$  pode gerar tanto água quanto radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ), sendo estes radicais oxidantes fortes (Michiels et al., 1994). Ânions superóxido e peróxido de hidrogênio não são tão reativos quanto radicais hidroxila (Storr et al., 2013), mas também são capazes de oxidar moléculas orgânicas, como lipídios, proteínas, DNA e RNA.  $H_2O_2$  possui uma grande capacidade de difusão através de

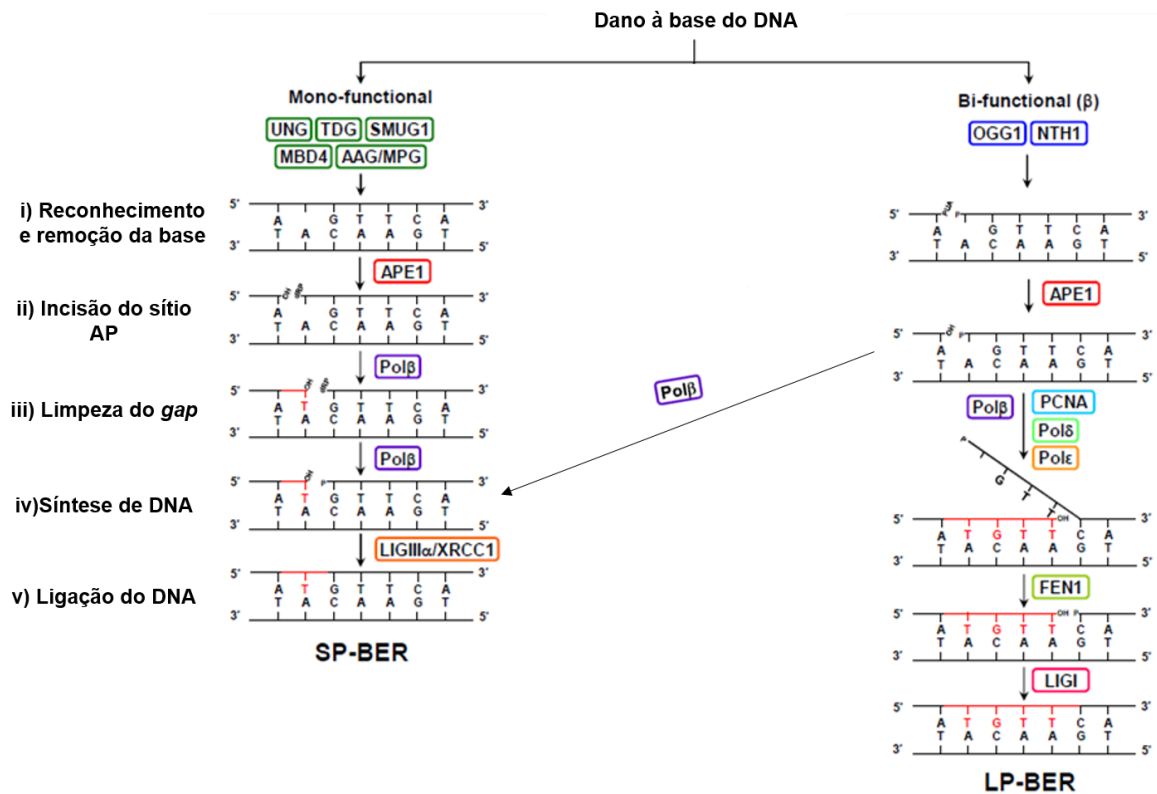
membranas biológicas, o que possibilita que atinja rapidamente outros compartimentos celulares, como o núcleo (Boveris et al., 2006).

Para reduzir os efeitos deletérios que podem ser gerados por EROs, os organismos tiveram várias características selecionadas, como a produção de substâncias antioxidantes (SOD, glutathiona peroxidase, catalase, peroxiredoxinas; Finkel & Holbrook, 2000) e o desenvolvimento de mecanismos de reparo de DNA. Danos oxidativos ao DNA podem ser removidos por várias vias de reparo, como o reparo por excisão de bases (BER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o reparo de erros de pareamento (MMR), embora o BER seja reconhecido como o mecanismo primário de reparo de danos oxidativos, tanto no DNA nuclear, quanto no DNA mitocondrial (Friedberg, 2003; Svilar et al., 2011; Storr et al., 2013).

### **1.1.1. Reparo de danos oxidativos: o reparo por excisão de bases (BER)**

O reparo por excisão de bases (BER) é o principal mecanismo envolvido no reparo de bases oxidadas, como, por exemplo, a 8-oxoguanina (Lindahl & Wood, 1999). Esta via de reparo funciona como uma série de complexos proteicos transientes que se formam em um sítio de lesão no DNA (Hitomi et al., 2007). Apesar de existirem diferentes vias de BER, todas contam com 5 passos: i) reconhecimento e remoção, por uma DNA glicosilase, de uma base incorreta ou danificada, gerando um sítio abásico intermediário; ii) incisão do sítio abásico (AP) por uma AP endonuclease ou AP liase; iii) remoção do fragmento de açúcar por uma liase ou fosfodiesterase; iv) preenchimento do gap por uma DNA polimerase; v) ligação por uma DNA ligase (Kim & Wilson III, 2012).

Há duas vias principais de BER: a longa, ou *long-patch*, onde de dois a treze nucleotídeos são substituídos, e a curta, ou *short-patch* (Figura 1), que é a mais comum, na qual apenas um nucleotídeo é excisado (Frome & Verdine, 2004; David et al., 2007). Embora o reconhecimento das bases danificadas seja similar nas duas vias, diferentes proteínas estão envolvidas nas fases posteriores, incluindo ligase 1 (LIG1) para o long-patch, e ligase 3 (LIG3) para o short-patch (Storr et al., 2013).

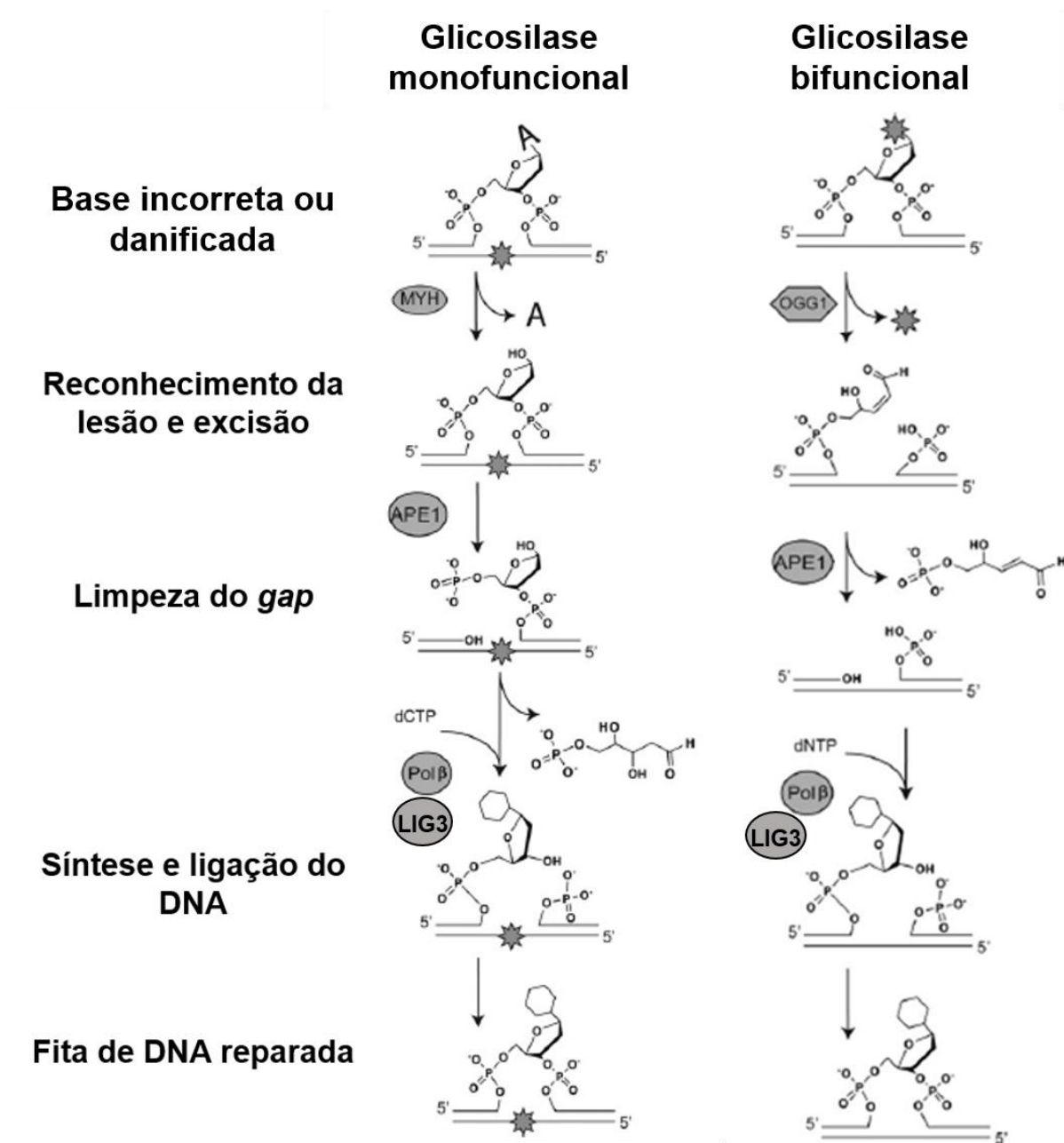


**Figura 1: Representação esquemática do reparo por excisão de bases – BER.** i) A base lesionada ou incorreta é retirada do DNA por glicosilases mono ou bifuncionais, sendo que as últimas, além de clivarem a base também realizam uma incisão na região 3' do sítio AP. ii) Após a excisão da base pela DNA glicosilase, a AP endonuclease hidrolisa o sítio AP. iii) Ocorre a remoção do fragmento de açúcar por uma liase ou fosfodiesterase. iv) Em seguida, o gap é preenchido por uma DNA polimerase  $\beta$  e v) o reparo é concluído pela DNA ligase, que liga o nucleotídeo ao restante da fita de DNA. Adaptado de Kim & Wilson III, 2012.

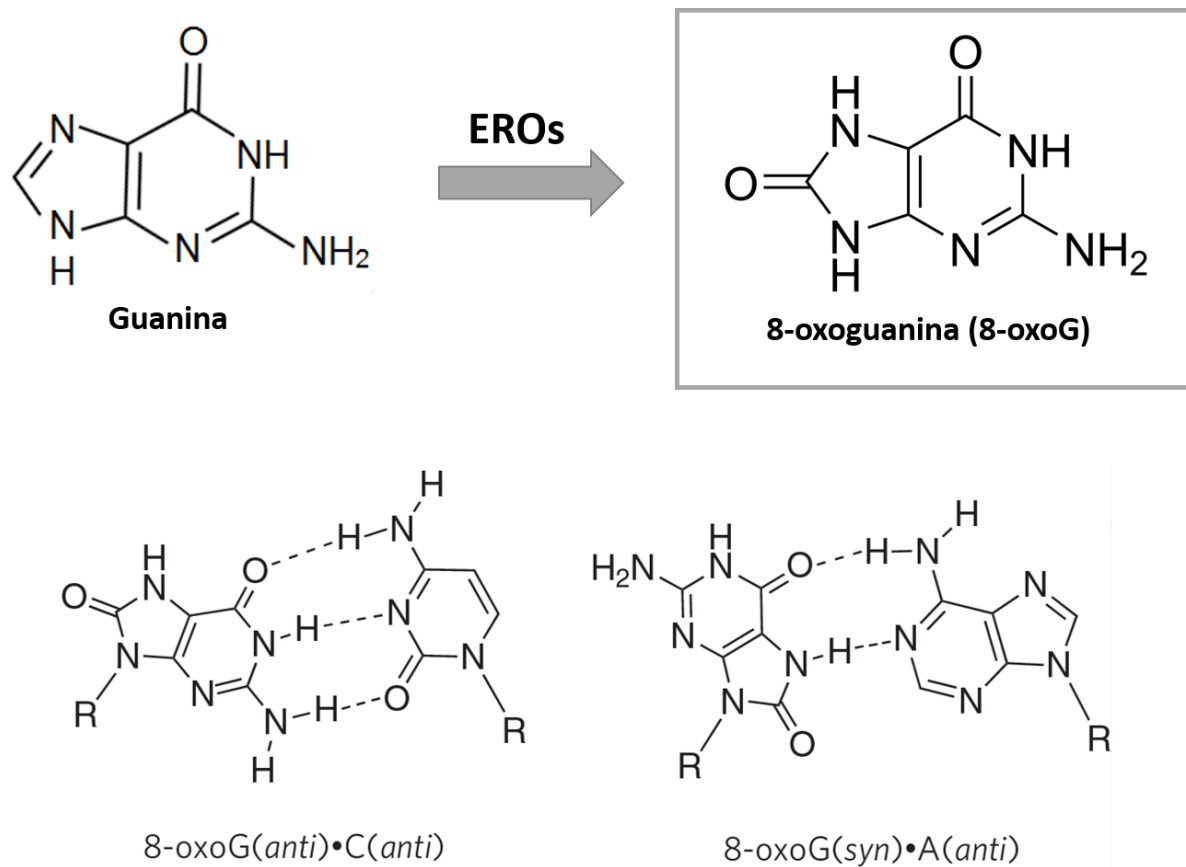
O BER inicia-se com a ação de uma DNA glicosilase específica, que reconhece seletivamente um tipo de base e cliva a ligação N-glicosídica entre a base e a 2'-deoxirribose, deixando no DNA o esqueleto de açúcar-fosfato e gerando um sítio AP (apurínico/apirimidínico). As DNAs glicosilases podem ser monofuncionais ou bifuncionais, sendo que elas diferem entre si pelo mecanismo catalítico e pela capacidade de realizar atividade de AP liase. As DNA glicosilases monofuncionais (Figura 2) usam uma molécula de água como nucleófilo para atacar o carbono aromático da base “alvo” a fim de promover a liberação da mesma, formando um sítio abásico que é idêntico ao gerado por depurinação ou depirimidinação espontânea do DNA. Esse sítio abásico é alvo para uma AP endonuclease. As DNA glicosilases bifuncionais (Figura 2) utilizam uma amina do sítio catalítico como nucleófilo para excisar a base, e geram um intermediário base de Schiff-proteína durante o processo catalítico. Essa classe de DNA glicosilases não apenas retira a base, como também é capaz de incisar o sítio AP, criando uma quebra de fita simples (SSB) com um terminal 3' não convencional. Após a atividade das glicosilases, o sítio AP é hidrolisado por uma AP endonuclease (APE1 ou APN1), a fim de gerar um grupo iniciador 3'OH. Feito isto, o *gap* gerado é “limpo”, isto é, suas extremidades são processadas por proteínas especializadas, como a DNA polimerase  $\beta$ , a fim de criar extremidades ideais para a síntese de DNA. Posteriormente, são inseridos um ou mais nucleotídeos pela DNA polimerase  $\beta$ , permitindo que uma DNA ligase (LIG 1 ou LIG3A/XRCC1) ligue o nucleotídeo ao restante da fita de DNA (Wood et al., 2005; Kim & Wilson III, 2012), completando o processo de reparo.

## 1.2. A lesão 8-oxoguanina

Das lesões geradas no DNA por estresse oxidativo, uma das mais frequentes é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina, ou apenas **8-oxoguanina** (8-oxoG, ou GO; Figura 3). A guanina é a base nitrogenada com o menor potencial redox (David et al., 2007; Storr et al. 2013), o que a torna um alvo para substâncias oxidantes, como as EROs. Por ser abundante, esta lesão é bem caracterizada (Dizdaroglu et al., 2002). Estima-se que em tecidos normais, no estado basal, sejam criadas, por dia, cerca de  $10^3$  lesões 8-oxoG por célula e que em tecidos cancerosos esse número seja aumentado para  $10^5$  lesões/célula (Lindahl & Barnes, 2000).



**Figura 2: Mecanismos de ação das glicosilases mono e bifuncionais, exemplificadas pela proteínas MutY (MYH) e OGG1.** A proteína MutY reconhece uma adenina pareada com a lesão 8-oxoguanina (\*), enquanto a proteína OGG1 reconhece a lesão 8-oxoguanina. A química da lesão e os intermediários do reparo são mostrados, enfatizando os passos do BER (esquerda). Adaptado de Svilar et al., 2011.



**Figura 3: A lesão 8-oxoguanina.** A oxidação da guanina por EROS leva à formação de 8-oxoguanina. Na conformação *anti*, 8-oxoG pareia com citosina, seguindo o pareamento Watson-Crick. Na conformação *syn*, a base modificada pareia com adenina, em um pareamento do tipo Hoogsteen. As linhas pontilhadas indicam pontes de hidrogênio. Adaptado de David et al., 2007.

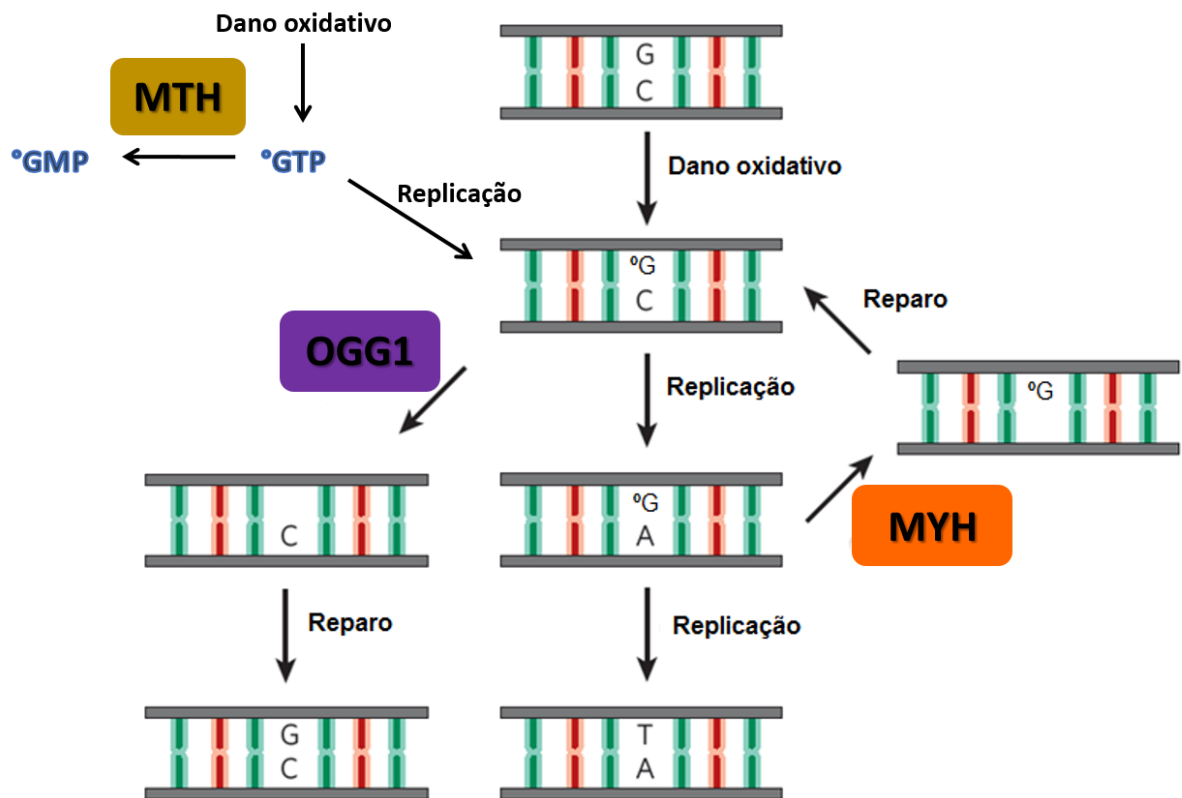
A 8-oxoguanina é formada pela oxidação da guanina por moléculas oxidantes, principalmente pela ação de  $\bullet\text{OH}$ , que levam à introdução de um oxigênio no carbono 8 e de um hidrogênio no nitrogênio da posição 7. DNA polimerases replicativas, como  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$  e  $\gamma$  são capazes de inserir eficientemente adenina ou citosina frente a 8-oxoG (Svilar et al., 2011). Em geral, esta lesão é pouco citotóxica, mas particularmente mutagênica, pois, quando na conformação *syn*, pode parear erroneamente com uma adenina durante a replicação do DNA (Figura 3), o que, após um segundo *round* de replicação, pode levar a uma mutação por transversão G.C  $\rightarrow$  T.A (van Loon et al., 2010).

A presença de 8-oxoguanina no DNA é geralmente utilizada como um biomarcador de estresse oxidativo. Além disso, muitos tipos de cânceres e outras doenças, como câncer colorretal e polipose adenomatosa familiar, possuem altos níveis de transversões G.C  $\rightarrow$  T.A, resultantes da ausência ou da ineficiência do reparo de 8-oxoG (van Loon et al., 2010; Svilar et al., 2011). Assim, a fim de reduzir os efeitos mutagênicos desta lesão, vários organismos possuem o chamado Sistema GO, composto por três enzimas: OGG1 (Fpg ou MutM em bactérias), MutY e MutT (Michaels & Miller, 1992).

### 1.2.2.O sistema GO

O Sistema GO (Figura 4) foi primeiramente descrito em *Escherichia coli*, sendo este sistema composto por duas glicosilases pertencentes ao BER, Fpg (seu homólogo funcional em eucariotos é chamado OGG1) e MutY, e por uma hidrolase, MutT (Michaels & Miller, 1992).

MutT, ou MTH (homólogo de MutT), é uma 8-oxo-dGTPase que cliva 8-oxodGTP existente no *pool* nucleotídico, transformando-o em 8-oxodGMP, o que impede a inserção da base lesionada à fita de DNA (Maki & Sekiguchi, 1992). MutY, ou MYH (homólogo de MutY), é uma adenina DNA glicosilase monofuncional (Figura 2), isto é, ela retira do DNA a adenina que está pareada com 8-oxoG, permitindo a inserção de uma citosina em frente à lesão, levando ao pareamento correto (Michaels et al., 1990; Lu et al., 2006). OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase) é a enzima que efetivamente retira 8-oxoG do DNA, quando esta encontra-se pareada com uma



**Figura 4: Sistema GO.** MTH (homólogo de MutT) hidrolisa 8-oxodGTP do pool nucleotídico em 8-oxodGMP, prevenindo a incorporação da lesão 8-oxoG no DNA. MYH (homólogo de MutY) retira a adenina pareada com 8-oxoG, permitindo que as DNA polimerases da via de reparo insiram uma citosina em frente à lesão. OGG1 retira a 8-oxoG pareada com citosina do DNA, e a síntese subsequente pode restaurar o par G.C original. Adaptado de David et al., 2007.

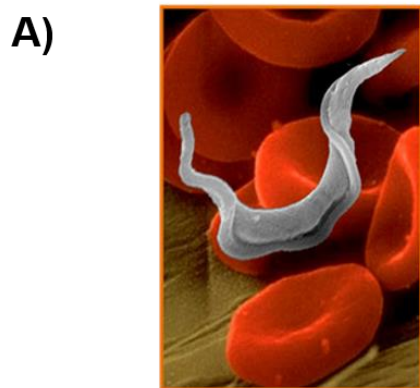
citocina (Boiteux et al., 1987; Tchou et al., 1991). Além da atividade glicosilásica, OGG1 também possui atividade AP liásica, uma vez que é uma glicosilase bifuncional (Figura 2). Na presença de outras proteínas das etapas subsequentes do reparo, como APE1 e XRCC1, a função glicosilásica de OGG1 é estimulada, enquanto que a AP liásica é reduzida (Hill et al., 2001), mostrando que interações entre as enzimas de diferentes etapas da via de reparo modulam as funções destas proteínas (Wilson & Kunkel, 2000).

A importância do sistema GO é evidenciada pela geração de altas frequências de mutações em linhagens deficientes nos genes *Ogg1* (*Fpg*), *MutY* e *MutT*, em diferentes organismos, como *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Mus musculus* (Nghiem et al., 1988; Thomas et al., 1997; Klungland et al., 1999). Em *E. coli*, por exemplo, as frequências de transversões G.C → T.A e A.T → G.C são até 800 vezes maiores em duplo mutantes *fpg-mutY-* (Michaels & Miller, 1992) e até 1000 vezes maiores em mutantes *mutT-* (Akiyama et al., 1987), em comparação às células selvagens.

### **1.3. *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi* (Figura 5A) é um protozoário flagelado, causador da Doença de Chagas. Essa doença afeta cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina e tem se espalhado para outras partes do mundo. Além disso, entre 10000 e 14000 pessoas morrem por ano devido à Doença de Chagas (Rassi et al., 2010; Hotez et al., 2012). Este parasito pode infectar seres humanos através das fezes contaminadas de triatomíneos hematófagos, por transfusões de sangue, por via congênita, ou, mais raramente, por meio de transplantes de órgãos, de acidentes laboratoriais e da ingestão de alimentos contaminados (Prata, 2001).

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve um hospedeiro invertebrado, pertencente a apenas algumas das cerca de 130 espécies de hemípteros reduviídeos da subfamília Triatominae, e um hospedeiro vertebrado mamífero, incluindo mais de 150 espécies domésticas e selvagens (Rassi et al., 2010; Figura 5B). A doença humana apresenta um quadro clínico bem variável (Figura 5C), que vai desde sintomas brandos e inespecíficos a manifestações mais graves, como megacólon e miocardite (Prata,



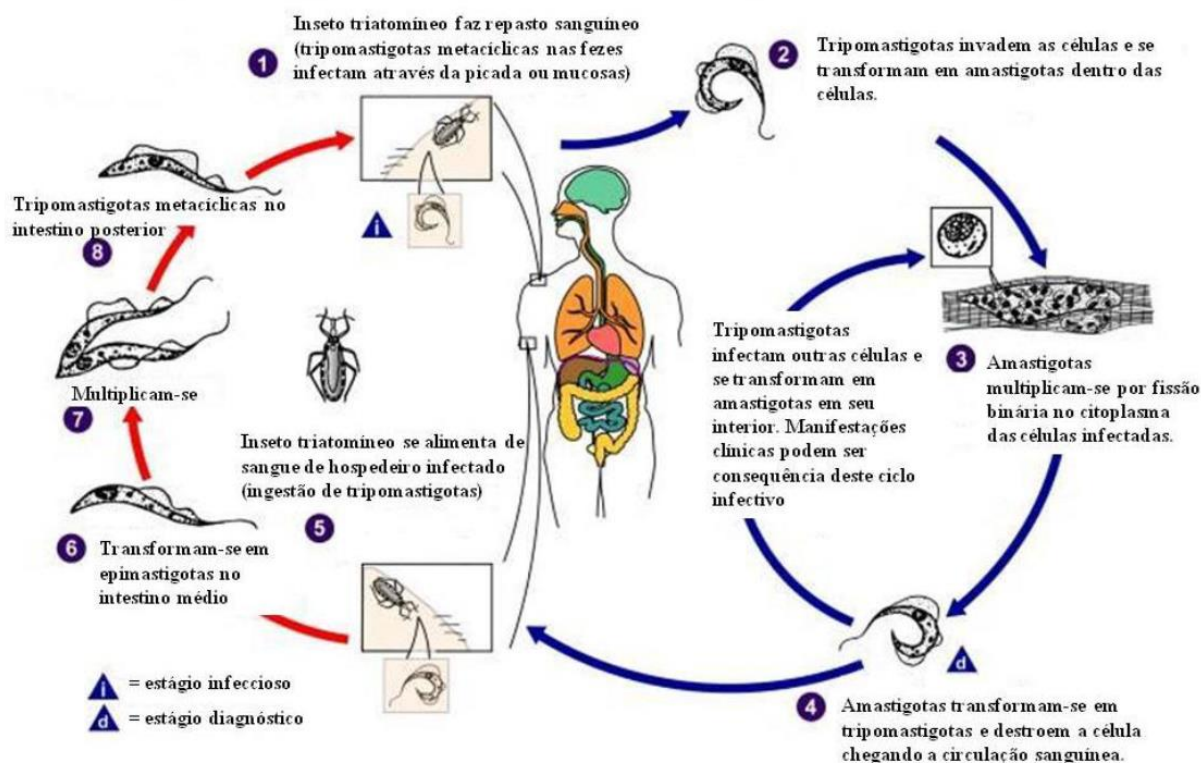
**C)**



**B)**

**Estágios no inseto triatomíneo**

**Estágios no humano**



**Figura 5: Trypanosoma cruzi.** **A)** Fotografia de *T. cruzi* junto a hemácias feita por microscopia eletrônica. Imagem feita por Rubem Figueiredo. **B)** Esquema do ciclo de vida de *T. cruzi*, mostrando seus hospedeiros e as diferentes formas do parasito (tripomastigota, epimastigota, tripomastigota metacíclica e amastigota). Modificado de CDC (Center for Disease Control and Prevention - <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>). **C)** Sintomas da Doença de Chagas. Acima, sinal de Romana, à esquerda, megacólon, e à direita, a comparação entre um coração de um paciente chagásico (maior) com um coração normal (menor).

2001). Ainda não se sabe como esta diversidade de sintomas é gerada, mas acredita-se que possa estar envolvida com aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro, bem como com a heterogeneidade populacional existente em *T. cruzi* (Macedo et al., 2004).

A variabilidade existente em *Trypanosoma cruzi* pode ser vista em sua morfologia, cinética de crescimento, tropismo celular, curso da infecção em modelos experimentais, susceptibilidade a quimioterápicos, constituição antigênica, propriedades bioquímicas e moleculares, dentre outros. Esta diversidade dificulta a classificação das várias cepas já descritas. Na tentativa de organizar as cepas do parasito em diferentes grupos, um encontro para a revisão da nomenclatura ocorreu em 2009 (Satellite Meeting, Zingales et al.) e determinou que estas devem ser incluídas em uma das seis unidades discretas de tipificação (DTUs) estabelecidas para *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi* I-VI).

O tratamento da doença de Chagas começou nas décadas de 60 e 70 com o uso das drogas Nifurtimox (Lampit®, Bayer) e Benzonidazol (Radanil® – Argentina, ou Rochagan® – Brasil, Roche). Estas drogas agem de maneiras diferentes, mas ambas causam estresse oxidativo, através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos que afetam proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos do parasito e do hospedeiro (Apt et al., 2010). Porém, tanto o Nifurtimox quanto o Benzonidazol não são considerados ideais para o tratamento da doença de Chagas pelos seguintes motivos: apresentam sérios efeitos colaterais; não são eficazes na fase crônica da doença; precisam ser administrados por longos períodos sob supervisão médica; possuem alto custo; e cepas diferentes podem apresentar diferentes suscetibilidades a essas drogas. Atualmente, vários tipos de drogas estão sendo estudadas como candidatas para o combate à doença de Chagas, estas drogas seriam principalmente: inibidores do metabolismo de tripanotona; inibidores de cisteína protease; inibidores de fosfolípidos; inibidores do metabolismo de pirofosfato; inibidores da síntese de proteínas ou purinas; e inibidores de ergosterol (Coura & Castro, 2002; Apt, 2010; Maya et al., 2010).

Apesar do grande número de estudos envolvendo a descrição e a classificação das diversas cepas de *T. cruzi*, a origem da variabilidade intraespecífica do parasito é pouco estudada, mas é de grande importância, pois auxilia na melhor compreensão

da interação existente entre este protozoário e seus hospedeiros, principalmente os vertebrados, permitindo o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas.

A baixa frequência de reprodução sexuada em *Trypanosoma cruzi* leva a crer que a estabilidade do genoma do parasito seja mantida por mecanismos de controle de mutações, como as vias de reparo de DNA. Desse modo, nosso grupo de pesquisa tem feito estudos acerca deste assunto.

### **1.3.1. Estresse oxidativo e *T. cruzi***

O *T. cruzi* possui um complexo ciclo de vida, no qual tem que lidar com variações ambientais. Em todos estes ambientes o parasito tem que enfrentar o estresse oxidativo, a fim de manter-se vivo (Piacenza et al., 2009; Gupta et al., 2009; Rassi et al. 2010; Garcia et al., 2010).

No hospedeiro vertebrado, diversos mecanismos de defesa são utilizados contra a infecção por *T. cruzi*. Macrófagos produzem óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio, como  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , sendo que estas moléculas podem produzir intensos danos aos componentes celulares do parasito, como oxidação de proteínas, lipídeos e do DNA (Bogdan & Rölinghoff, 1999). Além disso, cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* produzem altos níveis de EROs, devido a distúrbios no potencial de membrana das mitocôndrias, constituindo mais uma fonte de estresse oxidativo para o parasito (Gupta et al., 2009).

No hospedeiro invertebrado o *T. cruzi* também tem que lidar com o estresse oxidativo, sendo este proveniente de enzimas das glândulas salivares e do estômago do triatomíneo, como fatores hemolíticos e catepsinas, e das alterações do pH intestinal do hospedeiro (Ratcliffe et al., 1996; Garcia et al., 2010).

Para conseguir sobreviver a todas essas fontes de estresse oxidativo, além do estresse gerado por seu próprio metabolismo celular, o *Trypanosoma cruzi* apresenta uma série de defesas bioquímicas. O parasito conta com enzimas do sistema redox, que convertem as espécies reativas em substâncias mais estáveis e menos danosas. Este sistema antioxidante é baseado em vias interligadas entre os diferentes compartimentos celulares, nas quais os equivalentes redutores de NADPH

são levados às enzimas através da tripanotiona (T(SH)<sub>2</sub>), um ditiol de baixo peso molecular que está presente nos tripanossomatídeos (Flohé, 2012). Dentre as enzimas envolvidas neste sistema, é possível citar as superóxido dismutases, que metabolizam O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, as peroxidases dependentes de tripanotiona, que reduzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a triparredoxina peroxidase, que reduz peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre outras (Irigoín et al., 2008). Para conter os danos causados por espécies reativas que não foram neutralizadas, o *T. cruzi* possui um sistema de reparo de DNA eficiente contra o estresse oxidativo. Assim, o entendimento do metabolismo de DNA do *Trypanosoma cruzi* pode auxiliar em um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na infectividade do parasito (Aguar et al., 2013).

### **1.3.2. Reparo de danos oxidativos em *T. cruzi***

O sequenciamento completo do genoma de *Trypanosoma cruzi* por El-sayed e colaboradores em 2005 revelou que este parasito apresenta a maioria dos genes da maquinaria de reparo de DNA, inclusive do reparo de lesões oxidativas. Uma revisão destes genes foi feita por Passos-Silva e colaboradores em 2010. Vários dos componentes do reparo de danos oxidativos em *T. cruzi* já foram caracterizados por grupos de pesquisa.

Em relação ao BER, que é a principal via de reparo de danos oxidativos, não se sabe se a via curta (*short-patch*) pode ser realizada no núcleo, uma vez que homólogos de LIG3 e XRCC1 não foram identificados nesse parasito e que a DNA polimerase beta de *T. cruzi* (*TcPolβ*) foi identificada no cinetoplasto, mas não no núcleo (Lopes et al., 2008). A enzima *TcPolβ* mostrou atividade de polimerização de DNA e desoxiribose fosfato liase e foi localizada no cinetoplasto do parasito, ao contrário das *Polβ* de eucariotos superiores que se localizam no núcleo, evidenciando a importância do reparo mitocondrial em *T. cruzi*. Também foram descritas duas AP endonucleases de *T. cruzi* (*TcAP1* e *TcAP2*), que se mostraram presentes e ativas em todas as formas do parasito (tripomastigota, amastigota e epimastigota) e possuem localização nuclear (Sepúlveda et al., 2013). Além disso, a superexpressão de *TcAP1* aumentou a viabilidade de epimastigotas submetidas a tratamento com EROs e espécies reativas de nitrogênio.

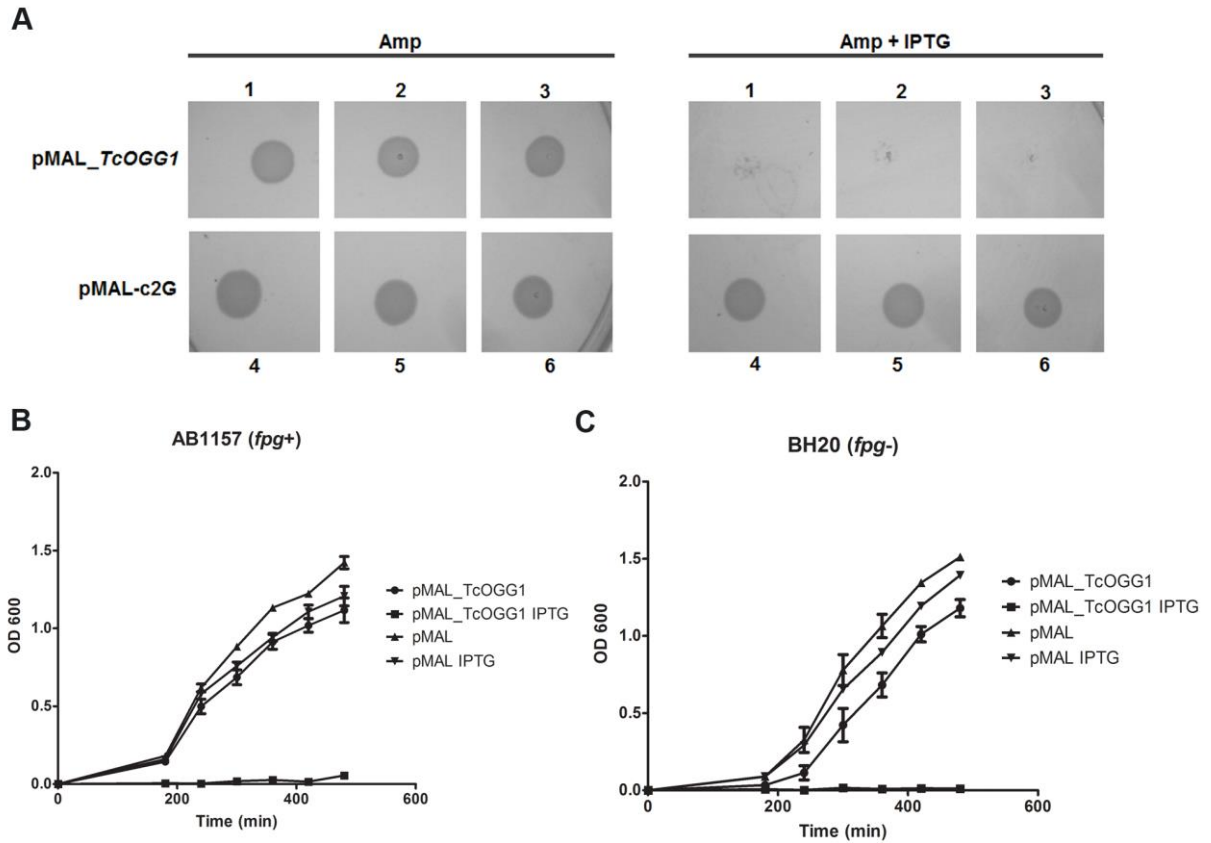
Outras vias de reparo envolvidas na resposta ao dano oxidativo em *T. cruzi* também foram descritas, como o reparo por erro de pareamento (MMR), a recombinação homóloga (HR) e a síntese translesão (TLS) (Schofield & Hsieh, 2003; Passos-Silva et al., 2010). A enzima *TcMSH2* foi largamente caracterizada e mostrou possuir um papel no combate ao estresse oxidativo, sendo esta função independente da sua atuação no MMR (Machado-Silva et al., 2008; Campos et al., 2011). Em relação à recombinação homóloga, *TcRad51* exibiu uma relação com a susceptibilidade do parasito a peróxido de hidrogênio (Regis-da-Silva et al., 2006). As polimerases de síntese translesão *TcPolk* e *TcPolη* foram capazes de sintetizar através da lesão 8-oxoG e aumentaram a resistência do parasito a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando superexpressas (Rajão et al., 2009; de Moura et al., 2009).

### **1.3.2.1. O sistema GO em *Trypanosoma cruzi***

A anotação do genoma de *Trypanosoma cruzi* em 2005 (El-Sayed et al.) mostrava que o parasito possuiria homólogos apenas das proteínas OGG1 e MutY. Porém, estudos realizados por nosso grupo demonstraram que *T. cruzi* também possui um homólogo da proteína MutT (Aguiar et al., 2013).

A proteína MutT de *T. cruzi*, *TcMTH*, quando superexpressa nos parasitos, é capaz de aumentar a resistência destes a peróxido de hidrogênio, em relação às células controle. Além disso, *TcMTH* complementa bactérias deficientes para MutT (Aguiar et al., 2013). Estes resultados, em adição a outros demonstrados no artigo da caracterização desta proteína, mostram que *Trypanosoma cruzi* possui um homólogo de MutT, que é importante para a manutenção da viabilidade celular do parasito.

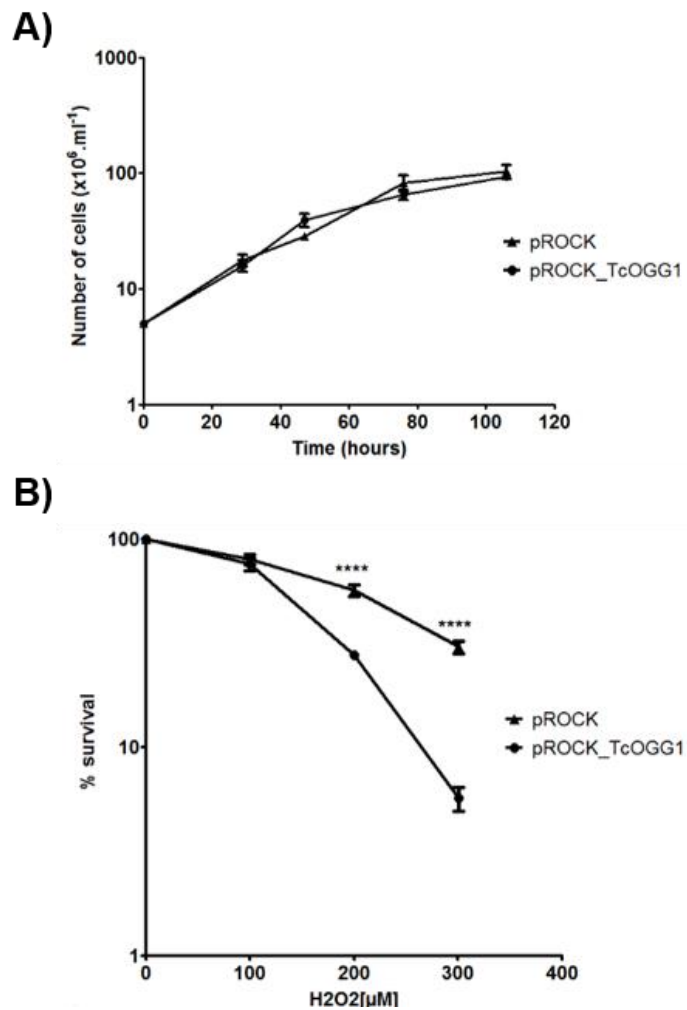
A descrição de *TcOGG1* foi iniciada no doutorado de Carolina Furtado (2009). Primeiramente, foi observado que a expressão de *TcOGG1* em bactérias *E. coli* DH5α e em bactérias selvagens e deficientes em *Fpg* foi tóxica para as bactérias (Figura 6). Tendo em vista esta toxicidade, passou-se para o modelo leveduriforme, como pode ser visto na seção Resultados, para a realização de ensaios de complementação funcional heteróloga.



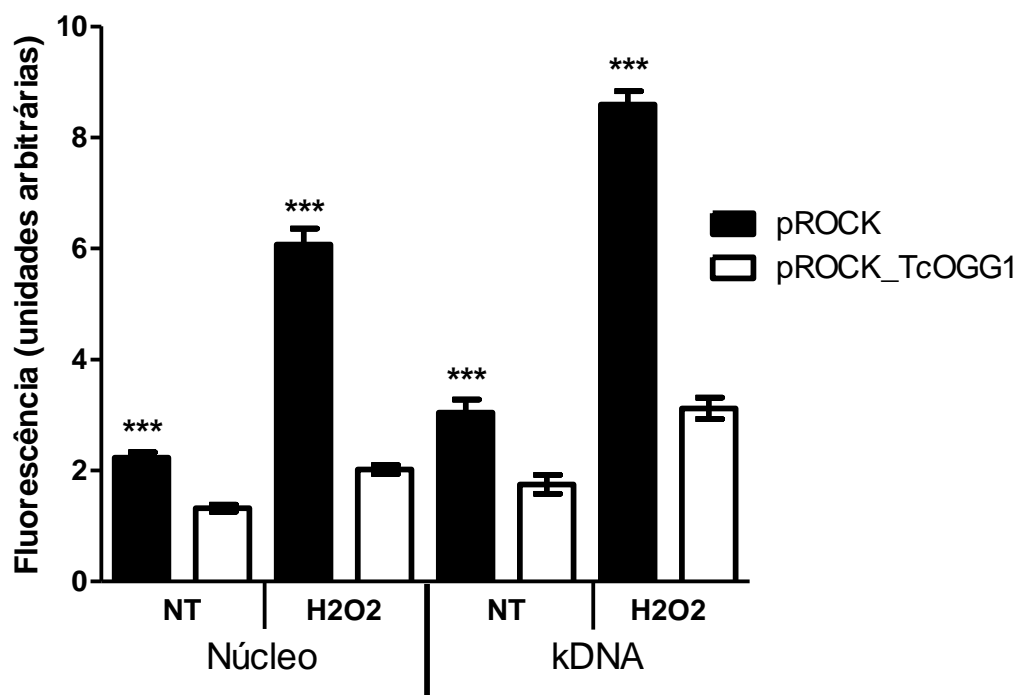
**Figura 6: A expressão de *TcOGG1* é tóxica para bactérias.** Bactérias *E. coli* eletrocompetentes foram transformadas com vetor vazio (pMAL-c2G) ou com pMAL\_ *TcOGG1* e em seguida foram crescidas em meio sólido ou líquido, com ou sem IPTG. Pode-se observar que para bactérias contendo o gene de *T. cruzi*, na presença de IPTG (expressão do plasmídeo; Anexo 2), o crescimento é nulo ou insignificante. **A)** Crescimento de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  em placas de ágar contendo ampicilina (Amp), ou ampicilina+IPTG. Os diferentes números referem-se a diferentes clones. **B)** Crescimento de bactérias *E. coli* AB1157 (*fpg+*) em meio líquido, com ou sem IPTG. **C)** Crescimento de bactérias *E. coli* BH20 (*fpg-*) em meio líquido, com ou sem IPTG. OD600: densidade óptica em 600 nm.

Em seguida, foi construída uma linhagem de *Trypanosoma cruzi* CL Brener superexpressora de *TcOGG1*. Foram realizadas curvas de crescimento e de sobrevivência a peróxido de hidrogênio com estes parasitos (Figura 7). Apesar de possuírem crescimento similar ao de parasitos controle (plasmídio vazio), quando tratados com água oxigenada os superexpressores de *TcOGG1* mostraram-se mais sensíveis do que o controle. Também foram medidos os níveis de 8-oxoguanina no núcleo e na mitocôndria dos superexpressores de *TcOGG1* (Figura 8). Em ambas as organelas, com ou sem tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a superexpressão de *TcOGG1* reduziu os níveis da lesão 8-oxoG, quando comparados com os níveis obtidos para o controle.

Nesse trabalho, prosseguimos com a caracterização da DNA glicosilase OGG1, assim como estudamos a DNA glicosilase MutY. O entendimento de como o *Trypanosoma cruzi* é capaz de lidar com as lesões oxidativas no DNA é importante para entendermos como a geração de variabilidade genética ocorre no parasito. Além disso, estes estudos poderão fornecer informações importantes sobre a biologia do *T. cruzi* e a doença de Chagas.



**Figura 7: Curvas de crescimento e de sobrevivência a peróxido de hidrogênio do clone CL Brener transfetado com pROCK ou com pROCK\_TcOGG1. A)** As culturas foram crescidas em meio líquido sem tratamento com agentes genotóxicos. Os parasitos vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina, após 0, 29, 47, 76 e 106 horas. Não houve diferença de crescimento entre as diferentes linhagens. **B)** As culturas foram submetidas ao tratamento com 0, 100, 200 e 300 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 72h, os parasitos vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos porcentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. A célula transfetada com o gene *TcOGG1* foi mais sensível a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a célula controle, o que pode ser visto pela menor sobrevivência daquela em relação a esta. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.



**Figura 8: Níveis de 8-oxoG nos genomas nuclear e mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*, com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio.** As linhagens transfectada com *TcOGG1* (pROCK\_*TcOGG1*, barras brancas) e selvagem (pROCK, barras pretas) passaram por tratamento com 200  $\mu$ M de  $H_2O_2$  por 20 minutos (células tratadas). As células, tratadas e não-tratadas, foram fixadas em lâminas e incubadas por uma hora com FITC-avidina. Feito isto, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi mensurada com o programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e foi plotada como unidades arbitrárias de fluorescência (intensidade de fluorescência média medida em 100 células, após a subtração da intensidade média do background). Pode-se observar que na linhagem transfectada com pROCK\_*TcOGG1* houve redução dos níveis de 8-oxoG tanto no núcleo quanto na mitocôndria (kDNA), em parasitos tratados ( $H_2O_2$ ) e não-tratados (NT). A diferença na quantidade de 8-oxoG vista entre a linhagem superexpressora e a linhagem selvagem foi estatisticamente significativa (\*\*\*) = p value < 0,001). Os gráficos foram gerados utilizando-se a média de diferentes experimentos, com o desvio-padrão, e as análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5, com o teste de Mann Whitney.

## 2. OBJETIVOS

---

## 2.1. Objetivo geral

Estudar os homólogos das proteínas 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) e MutY DNA glicosilase de *Trypanosoma cruzi* e caracterizar estes homólogos através de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

## 2.2. Objetivos específicos

1- Verificar a conservação existente entre as sequências protéicas de OGG1 e de MYH de *Trypanosoma cruzi* e as sequências de enzimas de outras espécies.

2- Verificar o efeito de *TcOGG1* em leveduras e de *TcMYH* em bactérias.

3- Analisar a ação de *TcMYH* em ensaios *in vitro*.

4- Investigar os efeitos da superexpressão de *TcOGG1* e de *TcMYH* em *Trypanosoma cruzi*.

5- Localizar as proteínas *TcOGG1* e *TcMYH* em *T. cruzi*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1. Alinhamento de sequências de aminoácidos e predição de localização subcelular

O alinhamento de sequências e a análise de resíduos conservados foram feitos por meio do uso das interfaces Multalin (Corpet, 1988; disponível em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e Boxshade 3.21 (Hofmann & Baron, 1992; disponível em [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). A análise de domínios foi feita com os softwares Pfam (Punta et al., 2012; disponível em <http://pfam.sanger.ac.uk/>) e CDD (Conserved Domains Database, Marchler-Bauer et al., 2013; disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). Foram utilizadas as sequências listadas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1: Organismos e números de acesso das sequências utilizadas no alinhamento de MutY/MYH.**

<b>Organismo</b>	<b>Número de acesso NCBI/GenBank</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_193010.2
<i>Escherichia coli</i>	YP_491160.1
<i>Homo sapiens</i>	Q9UIF7.1
<i>Leishmania major</i>	XP_001684497.1
<i>Mus musculus</i>	NP_001153053.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	CAD59974.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_807715.1

**Tabela 2: Organismos e números de acesso das sequências utilizadas no alinhamento de Fpg e OGG1.**

<b>Organismo</b>	<b>Número de acesso NCBI/GenBank</b>
<i>Escherichia coli</i>	NP_418092.1
<i>Homo sapiens</i>	NP_002533.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAC49312.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_804159.1

Para a predição da localização subcelular de TcOGG1 e de TcMYH foram utilizadas as sequências de *T. cruzi* citadas nas Tabelas 1 e 2, que foram analisadas pelos softwares Mitoprot (Claros & Vincens, 1996; disponível em <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) e NucPred (Brameier et al., 2007; disponível em <http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>).

### **3.2. Células e meios de cultura**

#### **3.2.1. *Escherichia coli***

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste estudo foram DH5 $\alpha$  (*supE44*, *lacU169*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*) (Hanahan, 1983), AB1157 (*F- thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *argE3*, *his-G4*,  $\Delta$ (*gpt-proA*), *62lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *ara-14*, *rpsL31*, *kdgK51 mtl-1*, *txs-33*, *supE44* (*str<sup>R</sup>*) *rfbD1*) (Bachmann, 1972) e BH980 (como CC104 (*ara* $\Delta$ (*gpt-lac*)5 (*F' lacI378lacZ461 pro A+B<sup>+</sup>*)), mas *mutY::kan<sup>R</sup>*) (Cupples & Miller, 1989), provenientes do laboratório do Dr. Serge Boiteux (Laboratoire de Radiobiologie de l'ADN, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, Centre National de la Recherche Scientifique, France).

As bactérias foram crescidas a 37°C, sob agitação constante (180 rpm), em meio 2xYT (1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,0) (Sambrook, 2001) esterilizado por autoclavagem. Dependendo da linhagem utilizada, foi adicionado ao meio ampicilina (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), kanamicina (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou estreptomicina (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para a confecção de meio 2xYT sólido, foi adicionado 1,5% de ágar, anteriormente ao processo de autoclavagem. O crescimento bacteriano em meio sólido foi realizado em estufa a 37°C.

#### **3.2.2. *Saccharomyces cerevisiae***

As linhagens haplóides de *S. cerevisiae* utilizadas foram FF18733 (*MATa, his7, leu2, lys1, ura3, strp1*) (Aboussekhra *et al.*, 1992) e sua derivada CD138 (*MATa, his7, leu2, lys1, ura3, ogg1::TRP1*) (Thomas *et al.*, 1997).

As leveduras foram crescidas a 30°C, sob agitação constante (240 rpm), em meio rico líquido YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, pH 7,0 e 2% de glicose ou galactose) esterilizado por autoclavagem. Também foram utilizados meio rico sólido YPD (acrescido de 2% ágar) e meio mínimo sólido SD (*Synthetic Drop-Out Medium*; 0,5% de sulfato de amônio, 0,17% de YNB (*yeast nitrogen base*), 2% de ágar, pH 5,8 e 2% de glicose ou galactose), esterilizados por autoclavagem. O meio mínimo foi suplementado com histidina (20 µg.mL<sup>-1</sup>), leucina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e triptofano (20 µg.mL<sup>-1</sup>) (Thomas, *et al.*, 1997).

### **3.2.3. *Trypanosoma cruzi***

Neste estudo foi utilizada a cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, originária do laboratório do Prof. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. As culturas foram mantidas a 28°C por passagens regulares em meio LIT (0,5% de *liver digested neutralized*, 0,5% de triptona, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCl, 0,8% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 µg.mL<sup>-1</sup> de hemina, pH 7,3) esterilizado por filtração com filtro de 0,2 µm, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab; Gibco) e acrescido de penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen), como descrito por Camargo (1964).

### **3.3. Oligonucleotídeos e amplificação de DNA por PCR**

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, que estão listados nas Tabelas 3 e 4, foram sintetizados pelas empresas Alpha DNA e Sigma-Aldrich. Eles foram desenhados utilizando-se as sequências putativas de 8-oxoguanina DNA glicosilase (número de acesso no GenBank: XM\_799066.1) e MutY DNA glicosilase de *Trypanosoma cruzi* (número de acesso no GenBank: XM\_802622.1). Os oligonucleotídeos foram diluídos em água deionizada e estocados a -20°C, em

alíquotas na concentração de 200 pmol.µL<sup>-1</sup>. A utilização de cada par de iniciadores/oligonucleotídeos está indicada na Tabela 5.

**Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados para TcOGG1.** Os sítios de restrição estão sublinhados.

Iniciador	Sequência
<i>TcOgg.Xba-F</i>	5' - <u>TCT AGA</u> ATG CAC GCG TGG TAT GCG - 3'
<i>TcOgg.Bam-F</i>	5' - <u>GGA TCC</u> ATG CAC GCG TGG TAT G - 3'
<i>TcOgg.Sac-R</i>	5' - <u>GAG CTC</u> TCA GTT GTC TCT TTG CC - 3'
<i>TcOgg.Xho-R</i>	5' - <u>CTC GAG</u> TCA GTT GTC TCT TTG CCC - 3'
<i>TcOgg.Mfe-R</i>	5' - <u>CAA TTG</u> GTT GTC TCT TTG CCC TCT TCG - 3'

**Tabela 4: Sequências dos iniciadores e oligonucleotídeos utilizados para TcMYH.** Os sítios de restrição estão sublinhados. **GO** = 8-oxoguanina. O número 6 no início da sequência indica marcação com fluoresceína.

Iniciador	Sequência
<i>TcMutY.Xba-F</i>	5' - <u>TCT AGA</u> ATG AAT GAG CTT TAC CGG GC - 3'
<i>TcMutY.Eco-R</i>	5' - <u>GAA TTC</u> CTT ATC ACC GGT TTT TCT TAA GTT TTT CC - 3'
<i>TcMutY.Hind-R</i>	5' - <u>AAG CTT</u> TTA CTT ATC ACC GGT TTT TCT TAA GTT - 3'
<i>TcMutY.XhoI-R</i>	5' - <u>CTC GAG</u> TTA CTT ATC ACC GGT TTT - 3'
<b>8-oxoguanina</b>	5' - GAT CCT CTA GAG TC( <b>GO</b> ) ACC TGC AGG CAT GCA - 3'
<b>AdeninaFluor</b>	5' - <b>6</b> TGC ATG CCT GCA GGT AGA CTC TAG AGG ATC - 3'
<b>CitosinaFluor</b>	5' - <b>6</b> TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC - 3'

**Tabela 5: Aplicação dos diferentes pares de iniciadores/oligonucleotídeos.**

Par de iniciadores	Uso
<i>TcOgg.Bam-F</i> e <i>TcOgg.Sac-R</i>	Clonagem de <i>TcOGG1</i> em pYEDP

<b><i>TcOgg.Xba-F e TcOgg.Xho-R</i></b>	Clonagem de <i>TcOGG1</i> em pROCK-HIGRO
<b><i>TcOgg.Xba-F e TcOgg.Mfe-R</i></b>	Clonagem de <i>TcOGG1</i> em pTREX-GFP
<b><i>TcMutY.Xba-F e TcMutY.Hind-R</i></b>	Clonagem de <i>TcMYH</i> em pMAL-c2G
<b><i>TcMutY.Xba-F e TcMutY.Xho-R</i></b>	Clonagem de <i>TcMYH</i> em pROCK-HIGRO
<b><i>TcOgg.Xba-F e TcOgg.Eco-R</i></b>	Clonagem de <i>TcMYH</i> em pTREX-GFP
<b><i>8-oxoguanina e AdeninaFluor</i></b>	Ensaio <i>in vitro</i> <i>TcMYH</i>
<b><i>8-oxoguanina e CitosinaFluor</i></b>	Ensaio <i>in vitro</i> <i>TcMYH</i>

As ampliações de DNA para clonagem em vetores plasmídicos foram feitas a partir de 50ng de DNA genômico ou 2 ng de DNA plasmídico, em reações de 20 µL contendo 5 pmol de iniciador *forward*, 5 pmol de *reverse*, 200µM de cada dNTP, 1X de tampão IB (Phoneutria; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH8,4) e 0,1% de Triton X-100) e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria).

Nas reações de amplificação executadas para confirmar a presença de insertos em clones transformados de bactérias (PCR de colônia), pequenas porções de colônias isoladas foram adicionadas a 10µL de reação contendo 2,5 pmol de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 1X de tampão IB. Nas PCRs de colônia de leveduras, colônias isoladas foram colocadas em reações de 50 µL contendo 15 pmol de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 1X de tampão IB.

Em algumas reações de amplificação, às quais denominamos “PCR de colônia de *T. cruzi*”, utilizamos como molde o DNA genômico de populações clonais de *T. cruzi* presente em baixo grau de pureza em uma alíquota (2-6 µL) de lisado celular. Essas reações continham 5 pmol de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 1X de tampão IB e 2U de Taq DNA polimerase em um volume final de 20 µL.

As ampliações foram realizadas em termocicladores M.J. Research PTC-100 (GMI Inc.). O programa de amplificação utilizado foi o seguinte:

- 1- 5 minutos (min) de desnaturação inicial a 94°C.
- 2- 30 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (55°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min).
- 3- 10 minutos de extensão final a 72°C.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 1%, com o padrão de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio e analisados sob luz UV.

### **3.4. Plasmídios e clonagem de fragmentos de DNA**

#### **3.4.1. Vetores plasmidianos**

Os plasmídios utilizados neste estudo foram pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega; Anexo 1), pMAL-c2G (New England BioLabs Inc.; Anexo 2), pYEDP (cedido gentilmente pelo Dr. Francisco Nóbrega, da Universidade do Vale da Paraíba (UNIVAP), São Paulo; Anexo 3), pROCK-HIGRO e pTREX-GFP (DaRocha *et al.*, 2004; Anexos 4 e 5).

#### **3.4.2. Clonagem**

Nas clonagens de DNA no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, uma alíquota (2,5 µL) dos produtos de PCR foi utilizada em reações contendo 50 ng do vetor, 3U de T4 DNA ligase e 1X de tampão *Rapid Ligation Buffer* (30mM de Tris-HCl (pH7,8), 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP e 5% de PEG MW8000), com um volume final de 10 µL. As reações foram mantidas a 4°C, durante 16 horas. Todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante Promega.

As clonagens nos plasmídios pMAL-c2G, pYEDP, pROCK-HIGRO e pTREX-GFP foram incubadas por 16 horas, a 4°C, em reações de 15 µL contendo 50 ng do vetor linearizado, 5 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), 1X de tampão *Reaction Buffer* (Invitrogen; 50mM de Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de ATP, 1 mM de DTT e 5% de PEG 8000) descongelado no gelo e vortexado, e o inserto, presente em uma razão molar de 3:1 em relação ao vetor. Os vetores foram previamente digeridos (ver seção 7) pelo par de enzimas de restrição adequado, o que também foi feito com o vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy para a liberação dos insertos. Os produtos das digestões foram

purificados de géis de agarose (item 8) e dosados em um NanoDrop™ (item 9). O cálculo da quantidade de inserto a ser utilizada foi feito da seguinte forma:

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

Uma alíquota de 3 µL das ligações foi utilizada para a transformação de bactérias eletrocompetentes (item 3.5).

### **3.5. Transformação de bactérias eletrocompetentes**

As bactérias das linhagens previamente citadas (item 2) foram transformadas seguindo o protocolo descrito por Sambrook em 2001. Uma cultura de bactérias em fase exponencial de crescimento (DO<sub>600</sub> entre 0,6 e 0,8) foi centrifugada a 7500G por 10 minutos e lavada 3 vezes com água deionizada a 4°C. Feito isto, as células foram lavadas, solubilizadas em glicerol 10% e armazenadas a -80°C.

Uma alíquota destas bactérias foi incubada por 5 minutos no gelo na presença do DNA de interesse. A mistura foi transferida para uma cubeta *Gene Pulser* de 0,2 cm (BioRad) e submetida a um pulso de 2,5 kV (MicroPulser, BioRad). Após a eletroporação, as células foram colocadas em microtubos de ensaio contendo 500 µL de meio 2xYT e incubadas por 45 minutos, a 37°C, sob agitação constante (180 rpm). Feito isto, 150 µL da cultura foram plaqueados em meio 2xYT sólido suplementado com ampicilina, além de, dependendo da linhagem, kanamicina, ou estreptomicina. As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C.

Colônias isoladas resultantes de cada transformação foram testadas para a presença dos plasmídios contendo os insertos de interesse por meio de PCR de colônia (item 3).

### **3.6. Obtenção de DNA plasmidiano**

Bactérias contendo os plasmídios com os genes de interesse foram crescidas em 5 mL de meio 2xYT suplementado com os antibióticos necessários, sob agitação constante (180 rpm), a 37°C, por 16 horas. Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação a 10000G por 2 minutos, passaram por lise alcalina e cerca de 20 µg de DNA plasmidiano foram purificados em coluna de afinidade utilizando o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Para extrações em larga escala utilizou-se o *kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega) e aproximadamente 1 mg do plasmídio de interesse foi obtido a partir de 500 mL de cultura em fase estacionária, que foram centrifugados a 5000G por 10 minutos, o que foi seguido pela execução dos outros passos descritos no *kit*.

### **3.7. Digestão de plasmídios com enzimas de restrição**

As digestões de DNA foram realizadas nas proporções de 1,5 U de cada enzima de restrição para cada 1 µg de DNA, contendo também 100 µg.mL<sup>-1</sup> de BSA (albumina bovina sérica) e 1X do tampão especificado pelo fabricante (Fermentas), a 37°C, por 4 horas.

### **3.8. Purificação de DNA de bandas de gel de agarose**

Bandas relativas a fragmentos de DNA e plasmídios de interesse foram excisadas de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e o DNA contido nas amostras foi purificado em membranas de fibra de vidro, utilizando-se o *kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences).

### **3.9. Dosagem de DNA**

DNA em solução foi quantificado através do uso do espectrofotômetro NanoDrop™ NP 1000 (Thermo Fisher Scientific), em leitura da absorbância a 260 nm. O grau de pureza das amostras foi estimado pela razão das leituras em 260 e 280 nm.

### 3.10. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA plasmidiano e de produto de PCR foi realizado em ambas as direções, de acordo com o método descrito por Sanger et al. (1977), através do sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Para isso, adicionou-se 100 ng de DNA plasmidiano purificado ou 10 ng de PCR purificada para cada 100 pb de amostra e 10 pmol de cada iniciador específico (*forward* ou *reverse*; Tabela 6) a microtubos de 0,2 mL. As amostras foram encaminhadas à empresa Myleus Biotechnology (<http://www.myleus.com>), que procedeu com o sequenciamento e nos retornou as sequências obtidas. Tais sequências foram analisadas no *software* DNA Baser v3 (DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012); disponível em <http://www.dnabaser.com>).

**Tabela 6: Sequências dos iniciadores utilizados para sequenciar *TcMYH*.** Os sítios de restrição estão sublinhados.

Iniciador	Sequência
<i>TcMutY.Xba-F</i>	5'- <u>TCT AGA</u> ATG AAT GAG CTT TAC CGG GC - 3'
<i>TcMutY200R</i>	5' - GAT ACC CAC CTT TGA AAG TAA GAA - 3'
<i>TcMutY400F</i>	5' - CCG GTA TTG GTC CAT ACA CT - 3'
<i>TcMutY900R</i>	5' - CAA CAT GCC ACC CAA TAA CCC - 3'
<i>TcMutY1100F</i>	5' - GAA GAG CCC AAA ACC ATA TC - 3'
<i>TcMutY.Hind-R</i>	5' - <u>AAG CTT</u> TTA CTT ATC ACC GGT TTT TCT TAA GTT - 3'

### 3.11. Ensaio em *Escherichia coli*

### 3.11.1. Taxa de mutação espontânea – Complementação funcional heteróloga

Clones de bactérias AB1157 ou BH980 transformadas com pMAL vazio (Anexo 2) ou pMAL\_*TcMYH* foram crescidos em 5 mL de meio 2xYT/ampicilina sob agitação, por 16 horas, a 37°C. Em seguida, 100µL de cada cultura foram diretamente espalhados em 1 placa de Petri pequena de meio 2xYT/ampicilina sólido acrescido de rifampicina (100 µg.µL<sup>-1</sup>, diluída em DMSO - dimetilsulfóxido). O restante de cada cultura foi sucessivamente diluído em meio 2xYT até a razão de 1:10<sup>6</sup> (v/v). Da suspensão celular mais diluída foi retirada uma alíquota de 100 µL, a qual foi inoculada em 1 placa de meio 2xYT/ampicilina sólido. As placas foram então incubadas a 37°C e após 18 horas de crescimento o número de clones em cada placa foi determinado por contagem manual.

Finalmente, foi calculada a taxa de mutação usando  $r_0 = M (1,24 + \ln M)$ , onde  $r_0$  é o número médio de mutações que conferem resistência a rifampicina em um número de culturas independentes e  $M$  é o número médio de mutações por cultura. O valor de  $M$  é resolvido por interpolação utilizando o valor de  $r_0$  conhecido e utilizado, então, para calcular a taxa de mutação  $r$ , onde  $r = M/N$  e  $N$  é o número final de células viáveis (Lea & Coulson, 1949).

### 3.12. Expressão e purificação de proteínas

Bactérias BH980 (item 2), transformadas com o plasmídeo pMALc2g\_*TcMYH* ou com pMALc2g vazio foram cultivadas por uma noite em 10mL de meio 2xYT contendo 10µL de ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e 1µL de kanamicina (10 µg.mL<sup>-1</sup>) a 37°C e 180rpm. No dia seguinte, esse volume foi diluído 50 vezes em 500mL de meio 2xYT contendo 500µL de ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e 50 µL de kanamicina (10 µg.mL<sup>-1</sup>; apenas BH980). Essa cultura foi incubada a 37°C, 180rpm, até atingir a DO<sub>600</sub> de 0,6. Em seguida, foi adicionado IPTG obtendo-se uma concentração final de 0,6mM.

Após a indução da superexpressão da proteína recombinante com a adição de IPTG, as culturas foram crescidas por 4 horas, a 30°C, 180 rpm. Durante esse período,

foram retiradas alíquotas da cultura a cada 1 hora. Em seguida, a cultura foi centrifugada por 10 minutos, a 4°C, 9000G. O *pellet* foi ressuspendido em 25mL de tampão de coluna (Tris HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM e EDTA 1 mM). As células bacterianas foram lisadas pelo tratamento com lisozima (concentração final de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 15 minutos a temperatura ambiente. Além disso, as células foram submetidas a três choques térmicos (congelamento a -80°C e descongelamento a 37°C) e sonicadas em três ciclos de 15 segundos, a uma amplitude de 30%, com 15 segundos de intervalo entre os ciclos. O extrato solúvel foi separado do extrato total, através da centrifugação do lisado bacteriano a 9000G, 4°C, 30 min.

Para a purificação da proteína recombinante MBP-*TcMYH*, o extrato solúvel obtido foi diluído 5x em tampão de coluna e passado em uma coluna de resina de amilose (*New England Biolabs*). Após 3 lavagens com 500 mL de tampão de coluna, a proteína recombinante foi eluída, em alíquotas de 1 mL, pela solução de eluição (10mM de maltose em tampão de coluna). As frações eluídas foram analisadas por gel SDS-PAGE 10% e dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### **3.13. Ensaio *in vitro* com *TcMYH***

A habilidade da DNA glicosilase de *T. cruzi* de reconhecer e retirar do DNA uma adenina pareada a GO foi avaliada pela retirada de nucleotídeos de um oligonucleotídeo marcado com fluoresceína (Lopes Dde *et al.*, 2007; Schamber-Reis *et al.*, 2012). Para isso, a proteína purificada em fusão com a MBP (MBP-*TcMYH*) foi incubada com o *duplex* de dois oligonucleotídeos: um de 30-mer que possui uma base 8-oxoguanina e um de 30-mer (marcado com fluoresceína) que corresponde à fita complementar do primeiro, contendo uma adenina ou uma citosina pareada à GO (Tabela 4). Esses oligonucleotídeos foram anelados na seguinte solução: 10 $\mu\text{L}$  de Tris-HCl (100mM), 1 $\mu\text{L}$  de EDTA (100mM), 10 $\mu\text{L}$  de NaCl (1M), 71 $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O e 4 $\mu\text{L}$  de cada oligo (20 $\mu\text{M}$ ). Em seguida, essa mistura foi incubada ao abrigo de luz em um banho a 80°C, que foi resfriado gradativamente, até voltar para a temperatura ambiente.

As reações para a averiguação da função de TcMYH foram montadas da seguinte forma: 1 µL de cada *duplex* de oligonucleotídeos diluído 1:25 foi adicionado a 1 µL de proteína a 0,5 µg.µL<sup>-1</sup>, 1 µL de tampão 10X REC™ Buffer 4 (10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 100 mM KCl, 10 mM EDTA; R&D Systems, Inc.) e 7 µL de água deionizada. As proteínas utilizadas foram EcMutY (R&D Systems, Inc.), TcMYH e MBP (purificadas como descrito no item 11.2). Tais reações foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Após este período, foram adicionados a cada reação 2 µL de NaOH 1M (com o objetivo de finalizar a quebra da fita marcada) e as amostras foram incubadas a 90°C por 30 minutos ou 1 hora. As reações foram interrompidas por adição de 4 µL de solução de parada (95% Formamida/ 20mM EDTA/ 0,05% Bromofenol/ 0,05% Xileno cianol) e pelo aquecimento a 90°C por 2 minutos, seguido de resfriamento no gelo. Em seguida, as amostras foram resolvidas em gel de acrilamida desnaturante, com uréia e formamida, no aparelho de sequenciamento automático ALF DNA (Amersham Biosciences). Foram utilizados padrões de tamanho de 34 e de 17 pb. As análises dos resultados foram realizadas no *software* AlleleLocator, versão 1.0.3 (Amersham Pharmacia, atualmente GE Healthcare).

### **3.14. Ensaio em *Saccharomyces cerevisiae***

#### **3.14.1. Transformação de leveduras**

As leveduras foram transformadas com o tratamento de acetato de lítio (Gietz & Woods, 2002). Células em crescimento exponencial foram sedimentadas por centrifugação a 3000G, por 5 min, e então passaram por diversas lavagens com água deionizada. Em seguida, para cada transformação, adicionou-se a 10<sup>7</sup> células 240 µL de PEG 3500 50%, 36 µL de LiAc (1 M), 50 µL de DNA de esperma de salmão (2 mg.mL<sup>-1</sup>) fervido e resfriado em gelo e 1 µg do plasmídeo de interesse em solução aquosa, resultando em volume máximo de 34 µL. Esta mistura foi homogeneizada e submetida a choque térmico a 42°C por 45 min. Após uma breve centrifugação (3000 G, 30 seg), o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de água deionizada. Foram plaqueados 5, 50 e 500 µL desta suspensão em meio seletivo (placas com meio sólido SD – URA).

### **3.14.2. Análise do efeito da expressão de *TcOGG1* sobre o crescimento de leveduras**

As leveduras das linhagens CD138 (*ogg1*-) e FF18733 (WT) contendo vetor vazio ou pYEDP\_*TcOGG1* foram crescidas até a fase estacionária (densidade celular determinada por contagem em câmara de Neubauer) em meio YPD líquido, a 30°C, sob agitação (240 rpm). As culturas foram gotejadas (5 µL de cultura, contendo cerca de  $5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>) em placas de meio YPD, com glicose ou galactose, e incubadas a 30°C por 3 dias (glicose) ou por 5 dias (galactose). As placas foram retiradas da estufa e fotografadas com câmera digital.

### **3.14.3. Frequências de mutações espontâneas – Complementação funcional heteróloga**

Colônias de leveduras das linhagens CD138 (*ogg1*-) e FF18733 (WT) contendo vetor vazio ou pYEDP\_*TcOGG1* foram crescidas até a fase estacionária (número de células determinado por contagem em câmara de Neubauer) em meio YPD líquido, a 30°C, sob agitação (240 rpm). As culturas foram plaqueadas em placas de meio SD ágar, sem lisina, com glicose ou galactose, em uma densidade celular de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Todas as placas foram suplementadas com histidina (20 µg.mL<sup>-1</sup>), leucina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e triptofano (20 µg.mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias (glicose) ou por 5 dias (galactose) e em seguida as colônias de revertentes Lis<sup>+</sup> foram contadas.

## **3.15. Ensaio com *Trypanosoma cruzi***

### **3.15.1. Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi***

O DNA genômico de epimastigotas da cepa CL Brener foi obtido em alto grau de pureza através de três etapas principais: lise celular, desproteinização e precipitação, como descrito por Andrade e colaboradores (1999). Cerca de  $1 \times 10^8$  parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados três vezes com PBS, sedimentados a 1500 g por 10 min a 4°C e incubados com 200 µL de solução de lise (0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 µM EDTA) contendo 20 µg.mL<sup>-1</sup> de RNase, por 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se Proteinase K (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e o lisado foi incubado a 50°C por 3 horas. A desproteinização ocorreu em três estágios. No primeiro deles, adicionou-se 200 µL de fenol ao lisado, homogeneizando vagorosamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 1500G, por 10 minutos, a 4°C, gerando duas fases. A fase aquosa foi coletada e a não aquosa, descartada. No segundo estágio adicionou-se à fase aquosa 200 µL de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) e foram repetidos os procedimentos de homogeneização, centrifugação e coleta da fase aquosa. O terceiro estágio consistiu na adição de 200 µL de clorofórmio e repetição dos demais procedimentos. A precipitação foi feita com etanol absoluto, na qual adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) às soluções, seguido por incubação a -20°C por 16 horas. O precipitado de DNA foi obtido após centrifugação a 20000 g por 15 min a 4°C. O DNA foi lavado duas vezes com etanol 70%, solubilizado em água e quantificado no NanoDrop™.

A extração de DNA genômico de *T. cruzi* em baixo grau de pureza para realização de “PCRs de colônia” (item 3) foi feita a partir de culturas de epimastigotas em fase estacionária de crescimento. Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi centrifugada a 5000G por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de água miliQ. A suspensão de células foi fervida por 10 min e então centrifugada por 3 min a 11000G. O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado na reação de PCR.

### **3.15.2. Transfecção**

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por eletroporação, conforme descrito por DaRocha e colaboradores em 2004. Como preparação para a

etapa de transfecção, 100 µg do vetor pROCK-HIGRO possuindo o gene de interesse foram linearizados com *NotI*, precipitados em isopropanol e solubilizados em 50 µL de água miliQ estéril. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM de Hepes, 2 mM de EDTA pH 8,0 e 5 mM de MgCl<sub>2</sub>), a uma concentração final de 1X10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Em uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser* de 0,2 cm (BioRad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de DNA de interesse. Em seguida, foi aplicado o choque elétrico de dois pulsos de 0,3 kV e 500 µF, intercalados por 30 seg. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo, no qual sofreram seleção, por cerca de 6 semanas, através do cultivo na presença de 200 µg.mL<sup>-1</sup> de higromicina.

### 3.15.3. Extração de RNA total e Northern blot

RNA total foi purificado de epimastigotas selvagens ou transfectadas com pROCK\_ *TcOGG1* ou pROCK vazio, tratadas ou não tratadas com 300 µM de peróxido de hidrogênio, usando Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O Northern blot foi feito de acordo com protocolo anteriormente descrito (Ausubel et al., 1997). Após extração do RNA total, foi feita eletroforese de 15 µg de RNA em gel de agarose (1,2% agarose e 2% formaldeído em tampão MOPS 1x (MOPS 10x - 200mM de MOPS, 50mM de acetato de sódio 10Mm, EDTA pH 8,0)). O gel foi tratado por 20 minutos em SSC 10x (SSC 20x - NaCl 3M, citrato trissódico.2H<sub>2</sub>O 0,3M, pH 7,0) e posteriormente transferido para uma membrana Hybond-N+ (GE Healthcare), por capilaridade, por uma noite.

A sonda de *TcOGG1* foi obtida por PCR do vetor pGEM\_ *TcOGG1* com os iniciadores *TcOgg.Xba-F* e *TcOgg.Mfe-R* e purificando a banda referente a *TcOGG1* por eletroforese em gel de agarose. A marcação da sonda com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP foi feita usando o Kit MegaPrimer (Amersham), conforme especificações do fabricante. A membrana de Northern blot foi submetida à pré-hibridização por 1 hora a 60°C. Após desnaturação com NaOH 1 M, a sonda radioativa foi adicionada aos tubos contendo as membranas e foi feita hibridização por 24 horas a 60°C.

Após hibridização, foi feita lavagem das membranas com SSC 1x (0,1% SDS) e em seguida a leitura no aparelho STORM 840 (Amersham Biosciences).

#### **3.15.4. Curva de crescimento**

O crescimento de populações clonais de *T. cruzi* pROCK e pROCK\_*TcOGG1* foi comparado por sete dias em meio líquido, na ausência de agentes mutagênicos. Culturas contendo inicialmente  $5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> foram incubadas a 28°C e contadas diariamente por 8 dias. Os ensaios foram feitos em placas de 24 poços, em triplicatas, e cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura. As culturas foram contadas em câmara citométrica na presença do corante vital eritrosina.

#### **3.15.5. Curvas de sobrevivência**

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio ou benzonidazol. Em seguida, a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das culturas controle não tratadas crescidas sob as mesmas condições.

#### **3.15.6. Tratamento com peróxido de hidrogênio**

Os ensaios foram feitos em placas de 24 poços, em triplicatas.  $2 \times 10^8$  células de cada cultura foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Cada cultura foi ressuspensa em 20 mL de PBS 1X estéril (PBS 10X - 0,15M KCl, pH 7,2, 0,003M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,092M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15M NaCl), que foram distribuídos em tubos do tipo Falcon, 4 mL por tubo. Em cada tubo foi adicionada a quantidade apropriada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solubilizada em água estéril, ou nenhuma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada, no caso do controle. As concentrações utilizadas foram 75, 100 e 125 µM de peróxido de hidrogênio. Tais

amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de meio LIT completo. Essa ressuspensão foi distribuída na placa de cultura, 1 mL em cada poço (1 mL de cultura à densidade de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>). As placas foram vedadas e incubadas a 28°C, por 72 horas. Após o período de crescimento, as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer. Os valores de *y* foram determinados como a sobrevivência das culturas tratadas, em termos percentuais, em relação às culturas não tratadas. Foram realizados 3 experimentos independentes.

### **3.15.7. Tratamento com benzonidazol**

Os ensaios foram feitos em placas de 24 poços, em triplicatas. Cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura à densidade de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. Nos poços tratados, foi adicionada a quantidade apropriada de benzonidazol (BZ), em um volume fixo, solubilizado em DMSO. As concentrações utilizadas foram 60, 120 e 240 µM de BZ. Nos poços controle, foi adicionado apenas o solvente, em um volume correspondente ao utilizado no tratamento. As placas foram vedadas e incubadas a 28°C, por 48 ou 72 horas. Após o período de crescimento, as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer. Os valores de *y* foram determinados como a sobrevivência das culturas tratadas, em termos percentuais, em relação às culturas não tratadas. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

### **3.15.8. Análise do número de lesões por QPCR**

#### **3.15.8.1. Tratamento genotóxico para análise de número de lesões**

Culturas de parasitos contendo  $1 \times 10^7$  células foram coletadas através de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Para cada ponto do experimento, 5 mL de cultura foram coletados. O meio sobrenadante (meio condicionado) foi guardado para

uso posterior e as células foram então ressuspensas em PBS. As células foram tratadas através da adição de 200  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio ao PBS, durante 15 minutos. As células foram então coletadas imediatamente após o tratamento ou deixadas para recuperar por até 24 horas (neste caso, na presença do meio condicionado original). Todas as células coletadas (*pellets*) foram guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do DNA.

### **3.15.8.2. Extração de DNA de alto peso molecular**

Os procedimentos de extração, quantificação, amplificação por QPCR e análise dos resultados foram realizados como descrito por Santos e colaboradores (2006). O DNA genômico foi isolado usando o kit *QIAGEN Genomic Tip Kit*. Este *kit* permite a purificação de fragmentos longos de DNA (de até 150 kb) sem o uso de fenol ou clorofórmio (que danificam o DNA), possibilitando uma posterior amplificação de longos trechos de ácido desoxirribonucléico. O protocolo utilizado neste trabalho é baseado no protocolo de extração de tecido – sugerido pelo fabricante – com algumas alterações. Após a eluição do DNA, a etapa de precipitação em isopropanol foi realizada incubando os tubos com o mesmo a  $-80^{\circ}\text{C}$  por uma noite. Após as etapas de lavagem com etanol 70%, as amostras de DNA ficaram dissolvendo em 50  $\mu$ L de TE por pelo menos 2 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.15.8.3. Dosagem das amostras de DNA**

Após a extração de DNA, as amostras tiveram suas concentrações acertadas para 3 ng/ $\mu$ L. Para tal, foi feita uma dosagem aproximada de cada amostra extraída, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop. De posse da concentração aproximada de cada amostra, foi feita uma diluição das mesmas para a concentração de 3 ng/ $\mu$ L. Em seguida, foi realizada uma dosagem precisa dessas amostras diluídas fazendo uma curva padrão, usando o corante específico para DNA dupla fita, *PicoGreen* (Invitrogen). A leitura da curva padrão foi obtida no fluorímetro de placa Synergy 2

(Biotek), através da leitura dos picos de fluorescência na região do espectro entre 505 e 525 nm. As amostras diluídas tiveram sua concentração corrigida – diluindo ou concentrando – de forma que a diferença de concentração entre a amostra mais concentrada e a menos concentrada deve ser menor que 5%.

#### 3.15.8.4. Amplificação por QPCR

O ensaio de quantificações de lesões foi realizado comparando-se a amplificação de um fragmento longo de DNA de uma amostra tratada com a amplificação de um controle não tratado. Uma reação “branco”, sem DNA molde, também foi amplificada visando descontar a presença de iniciadores e dNTP das outras reações. Iniciadores específicos foram utilizados para amplificar fragmentos longos (de aproximadamente 10 kb) e curtos (de aproximadamente 250 pb) dos genomas do núcleo e da mitocôndria do *T. cruzi*, e estão listados na tabela abaixo.

**Tabela 7: Iniciadores usados no ensaio de QPCR.**

Iniciador	Sequência
<b><i>QPCRNuc2F</i></b>	5' - GCA CAC GGC TGC GAG TGAC CAT TC AAC TTT - 3'
<b><i>QPCRNuc2R</i></b>	5' - CCT CGC ACA TTT CTA CCT TGT CCT TCA ATG CCT GC - 3'
<b><i>QPCRNuc2Int</i></b>	5' - TCG AGC AAG CTG ACA CTC GAT GCA ACC AAA G - 3'
<b><i>QPCRMitF</i></b>	5' - TTT TAT TTG GGG GAG AAC GGA GCG - 3'
<b><i>QPCRMitR</i></b>	5' - TTG AAA CTG CTT TCC CCA AAC GCC - 3'
<b><i>QPCRMitInt</i></b>	5' - CGC TCT GCC CCC ATA AAA AAC CTT - 3'

A amplificação do fragmento nuclear longo foi realizada com o par de iniciadores *QPCRNuc2F* e *QPCRNuc2R*. A amplificação do fragmento mitocondrial longo foi realizada com o par de iniciadores *QPCRMitF* e *QPCRMitR*. Como a probabilidade da ocorrência de danos em uma região pequena de DNA é muito baixa, os fragmentos curtos (250 pb) foram usados para normalizar os resultados das amplificações obtidos com os fragmentos longos (10 kb). Isso foi feito para eliminar qualquer viés resultante de alterações nas proporções entre os genomas nuclear e

mitocondrial do parasito. O fragmento nuclear curto foi amplificado com o par de iniciadores *QPCRNuc2Int* e *QPCRNuc2R*. O fragmento mitocondrial curto foi amplificado com o par de iniciadores *QPCRMitInt* e *QPCRMitR* (tabela abaixo).

**Tabela 8: Aplicação dos diferentes pares de iniciadores.**

Par de iniciadores	Uso
<i>QPCRNuc2F</i> e <i>QPCRNuc2R</i>	Amplificação do fragmento nuclear longo
<i>QPCRNuc2Int</i> e <i>QPCRNuc2R</i>	Amplificação do fragmento nuclear curto
<i>QPCRMitF</i> e <i>QPCRMitR</i>	Amplificação do fragmento mitocondrial longo
<i>QPCRMitInt</i> e <i>QPCRMitR</i>	Amplificação do fragmento mitocondrial curto

Todas as reações de amplificação foram feitas utilizando o kit *GeneAmp XL PCR Kit* (Applied Biosystems), em reações do tipo *hot start*, utilizando as seguintes quantidades de reagentes para cada reação de 50  $\mu$ L: 9,6  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O, 15  $\mu$ L de 3.3x Buffer, 5  $\mu$ L de BSA (1 mg.mL<sup>-1</sup>), 4  $\mu$ L de dNTP (2,5 mM cada nucleotídeo), 2,4  $\mu$ L de MgO(Ac)<sub>2</sub> (25 mM), 2  $\mu$ L de iniciador *forward* (10 $\mu$ M), 2  $\mu$ L de iniciador *reverse* (10  $\mu$ M). A DNA polimerase é adicionada depois (*hot start*), em seu devido tampão, e as quantidades para cada reação de 50  $\mu$ L são: 0,5  $\mu$ L de *rTth XL DNA Polymerase*, 3,13  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O e 1,36  $\mu$ L de 3.3x Buffer.

As amplificações dos fragmentos de DNA foram feitas em termocicladores, usando um número de ciclos no qual a reação termina ainda na fase exponencial da amplificação. Dessa forma, para cada experimento é feito um controle de 50%, constituído de uma reação de QPCR contendo 50% do DNA não-tratado. A amplificação é considerada válida quando a amplificação deste DNA controle gera um produto de amplificação com 40 – 60% do valor da amplificação da reação contendo 100% do DNA não-tratado. As reações de QPCR foram realizadas utilizando os programas descritos a seguir.

Fragmentos longos (10 kb):

**Passo 1:** 75°C por 1 min e 30 segundos

**Passo 2:** pausa em 75°C para adição da DNA polimerase *rTth XL*

**Passo 3:** 94°C por 1 minuto

**Passo 4:** 94°C por 15 segundos

**Passo 5:** 64°C (fragmento nuclear) ou 60°C (mitocondrial) por 12 minutos

**Passo 6:** aproximadamente 28 ciclos (fragmento nuclear) ou 21 ciclos (mitocondrial) entre os passos 4 e 5

**Passo 7:** 72°C por 10 minutos

**Passo 8:** 4°C indefinidamente

Fragmentos curtos (250 pb):

**Passo 1:** 75°C por 1 minuto e 30 segundos

**Passo 2:** pausa em 75°C para adição da DNA polimerase *rTth XL*

**Passo 3:** 94°C por 1 minuto

**Passo 4:** 64°C (fragmento nuclear) ou 60°C (mitocondrial) por 45 segundos

**Passo 5:** 72°C por 45 segundos

**Passo 6:** aproximadamente 22 ciclos (fragmento nuclear) ou 19 ciclos (mitocondrial) entre os passos 3 e 5

**Passo 7:** 72°C por 10 minutos

**Passo 8:** 4°C indefinidamente

As amostras amplificadas foram quantificadas por fluorimetria, como descrito anteriormente.

#### **3.15.8.5. Análise dos resultados**

A análise do número de lesões foi feita comparando a amplificação dos fragmentos longos das amostras tratadas em relação à amplificação do controle não tratado. Para tal, além de descontar o valor de amplificação da reação “branco” dos valores obtidos em todas outras amplificações, foi feita a normalização usando os fragmentos curtos. Dessa forma foi obtido o valor de amplificação relativa (amplificação tratado/amplificação não tratado). O número de lesões por 10 kb foi obtido aplicando a fórmula  $-\ln(\text{amplificação relativa})$ , uma vez que o aparecimento de lesões no DNA segue uma distribuição de Poisson. Os valores apresentados para cada amostra são a média dos valores obtidos através de duas reações de QPCR de dois experimentos biológicos diferentes.

### **3.16. Microscopia confocal e de fluorescência**

Formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas com pTREX-GFP ou com pTREX-GFP\_*TcOGG1* foram, 24 horas após a eletroporação, lavadas uma vez em PBS e centrifugadas a 3000G por 10 minutos. Os precipitados celulares foram ressuspensos em PBS de forma a concentrar as amostras em cerca de 100 vezes e então foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 15 min a 4°C. Estas células foram lavadas com PBS, tratadas com 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de RNase por 15 min a 37°C e incubadas com 20 µg.mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídeo por 15 min, para corar o DNA. Estas epimastigotas foram novamente lavadas em PBS e colocadas em lâminas. As imagens foram capturadas por microscópio Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss AG), utilizando-se lasers de 488 e 543 nm para excitação das sondas, com abertura de *pinhole* ajustada para 0,5 µm. As imagens foram analisadas através do uso do software Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss AG).

Para *TcMYH*, 1 mL ou 100 µL de formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas com pTREX-GFP ou com pTREX-GFP\_*TcOGG1* foram, 24 ou 48 horas após a eletroporação, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em PBS 1X, em volume igual ao inicial, e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Esse passo de lavagem foi repetido mais uma vez, e em seguida as células foram ressuspensas em 100 µL de paraformaldeído (PFA) 4%. Aplicou-se 40 ou 10 µL da cultura em lâminas e incubou-se por 30 minutos a 4°C. A gota de PFA+cultura

foi retirada das lâminas e estas foram lavadas com PBS. Foram adicionados 40 µL de DAPI (4-6-diamino-2-fenilindol, Invitrogen) diluído 1:1000 em PBS, seguido por 1 minuto de incubação a temperatura ambiente. Feito isto, as lâminas foram lavadas com PBS por três vezes e o *anti-fading* (*Slowfade Antifade kit*, Invitrogen) foi adicionado. Lamínulas foram posicionadas sobre as lâminas e a selagem foi feita com esmalte incolor. As imagens foram capturadas por microscópio Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc.), utilizando-se lasers de 408 e 561 nm para excitação das sondas, com abertura de *pinhole* ajustada para 1 µm. As imagens foram analisadas através do uso dos softwares NIS Elements (Nikon Instruments Inc.) e ImageJ (Schneider et al., 2012). Todas as imagens foram feitas no CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG).

### **3.17. Análise estatística**

Nos ensaios de complementação funcional heteróloga em *S. cerevisiae*, os gráficos foram gerados utilizando-se mediana e as análises estatísticas foram feitas com o teste de Kruskal-Wallis de análise de variância simples (One way ANOVA). Para as curvas de crescimento e de sobrevivência de *T. cruzi*, bem como para os experimentos de QPCR, utilizou-se teste *t* não-pareado. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.

## 4. RESULTADOS

---

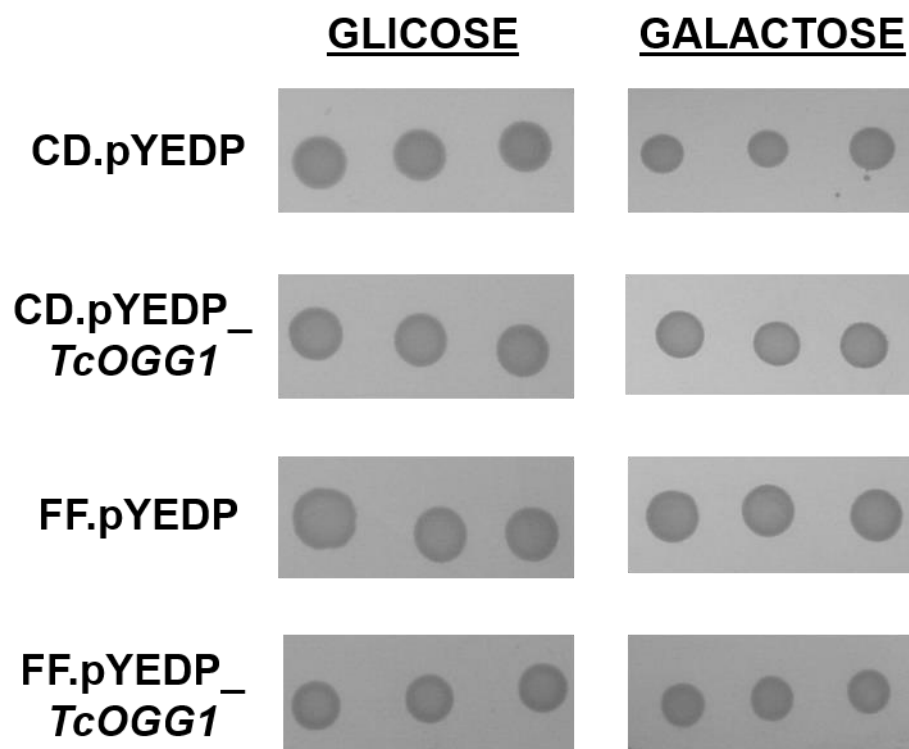
## 4.1. *TcOGG1*

### 4.1.1. *TcOGG1* em *Saccharomyces cerevisiae*

Como descrito na introdução, uma vez que a expressão de *TcOGG1* mostrou-se tóxica para bactérias, decidiu-se averiguar se esta expressão também seria tóxica para leveduras. Caso não houvesse toxicidade, os ensaios de complementação funcional heteróloga seriam realizados com *S. cerevisiae*, a fim de gerar mais evidências da funcionalidade de *TcOGG1*.

Para os experimentos em *Saccharomyces cerevisiae*, foram utilizadas leveduras selvagens (FF18733) e leveduras deficientes para *OGG1* (CD138). Estas linhagens foram transformadas com o plasmídio pYEDP (Anexo 3) vazio, ou contendo o gene de *T. cruzi* (pYEDP\_*TcOGG1*), que foi inserido com a utilização das enzimas *Bam*HI e *Sac*I. Este plasmídio possui promotor indutível por galactose. Assim, o gene clonado neste vetor é expresso apenas na presença deste açúcar.

Células de *S. cerevisiae* selvagens e *ogg1*- transformadas com pYEDP ou pYEDP\_*TcOGG1* foram plaqueadas em meio contendo glicose ou galactose. Após o período de incubação, observou-se o crescimento de colônias. Na Figura 9, pode-se ver que o crescimento nos dois tipos de meio foi similar. Isto demonstra que a expressão de *TcOGG1* não interferiu no crescimento das leveduras, tanto para células WT (FF18733) quanto em células deficientes (CD138, *ogg1*-), ambas portando pYEDP\_*TcOGG1*. Desse modo, deu-se prosseguimento aos estudos com *S. cerevisiae*.



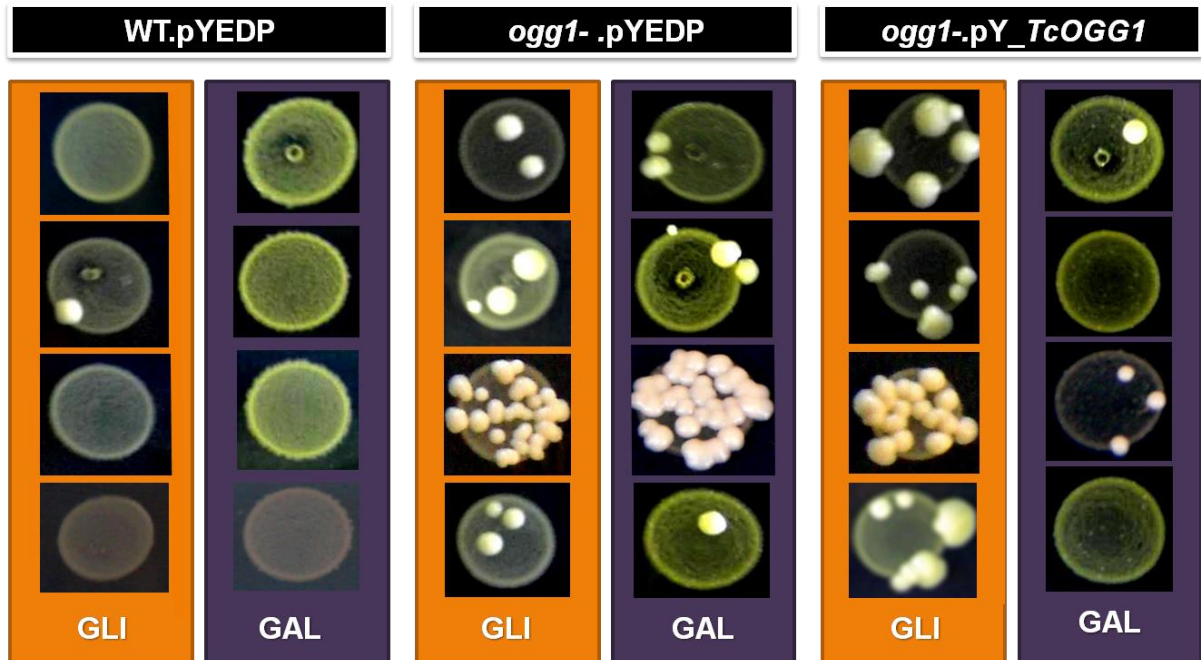
**Figura 9: A expressão de *TcOGG1* não é tóxica em leveduras.** As linhagens CD138 (*ogg1*-) e FF18733 (WT) de *Saccharomyces cerevisiae*, transformadas com pYEDP ou pYEDP\_*TcOGG1*, foram gotejadas e crescidas, a 30°C, em placas ágar YPD, com glicose (fotos à esquerda) ou galactose (fotos à direita). O crescimento foi similar em ambas as placas, mostrando que a expressão de *TcOGG1*, na placa com galactose, não interferiu no crescimento das leveduras. Em ambas as placas foram utilizados os mesmos clones para cada tipo de célula.

No ensaio de complementação funcional heteróloga, também referido aqui como ensaio de mutação, utiliza-se uma linhagem deficiente no gene em estudo, na qual o gene de outra espécie é inserido. Em seguida, é verificado se este gene exógeno é capaz de complementar a linhagem deficiente, isto é, se ele leva ao fenótipo selvagem, observado na linhagem WT. Se o gene inserido complementar as células deficientes, ele possui atividade similar ao gene que foi deletado.

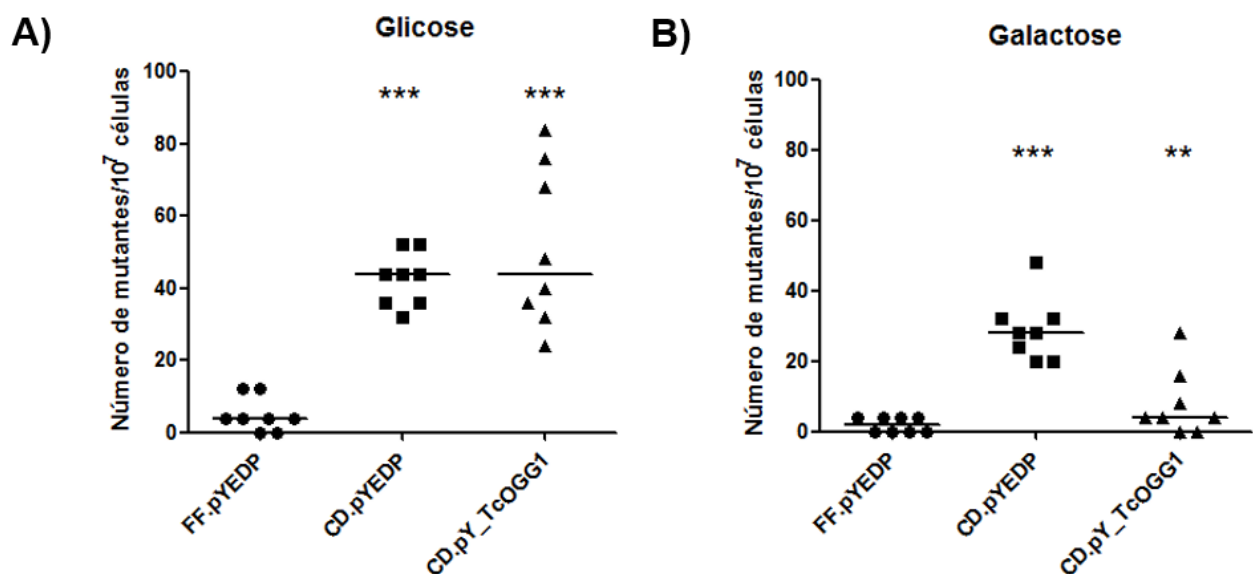
Neste trabalho, empregou-se o ensaio de mutação de lisina (Thomas *et al.*, 1997) para a observação da geração de mutantes espontâneos. As linhagens CD138 e FF18733 são auxotróficas para lisina, portanto, se crescidas em meio sem este aminoácido, os mutantes espontâneos Lis<sup>+</sup>, que são capazes de sintetizar lisina, são selecionados. A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente no gene *OGG1* (CD138; Thomas *et al.*, 1997) possui níveis de mutação maiores que a WT (FF18733), devido à deficiência no sistema de reparo de DNA. Portanto, se *TcOGG1* possuísse atividade de 8-oxoguanina DNA glicosilase, esperava-se que fosse capaz de reduzir as taxas de mutantes Lis<sup>+</sup> das leveduras *ogg1*-.

As leveduras foram crescidas em meio YPD líquido (meio rico) até a fase estacionária e então foram plaqueadas em meio SD ágar (meio mínimo) contendo os aminoácidos necessários (com exceção da lisina, que estava ausente), e glicose ou galactose, permanecendo a 30°C por 3 a 5 dias. Em seguida, as placas foram fotografadas e os clones mutantes contados (Figuras 10 e 11).

Em placas com glicose, onde não há expressão do plasmídio, as frequências de mutantes são similares para *ogg1*- com pYEDP vazio (CD.pYEDP) e com pYEDP\_ *TcOGG1* (CD.pY\_ *TcOGG1*), sendo que não houve diferença estatística entre estas células. Porém, as duas linhagens mostraram maiores números de mutantes do que a célula WT (FF.pYEDP) (*p value* < 0,001 para ambas) (Figura 11).



**Figura 10: Ensaio de mutação (complementação funcional heteróloga) com leveduras FF18733 (WT) e CD138 (*ogg1*-) - qualitativo.** As células foram transformadas com pYEDP (WT e *ogg1*-) e com pYEDP\_*TcOGG1* (apenas *ogg1*-). As leveduras foram gotejadas e cresceram em placas SD ágar contendo glicose (sem expressão do plasmídeo) ou galactose (expressão do gene contido no plasmídeo, devido ao promotor de galactose), sem lisina (crescimento apenas de mutantes *Lis*<sup>+</sup>), a 30°C. Como pode ser observado, a expressão de *TcOGG1* (CD.pY\_*TcOGG1* em galactose) reduziu a quantidade de colônias mutantes em células *ogg1*-. GLI: placas contendo glicose como fonte de açúcar; GAL: placas contendo galactose como fonte de açúcar.



**Figura 11: Ensaio de mutação (complementação funcional heteróloga) com leveduras FF18733 (WT) e CD138 (*ogg1*-) - quantitativo.** Os mutantes obtidos no ensaio mostrado na Figura x foram contados, originando os gráficos acima. **A)** Número de mutantes a cada  $10^7$  células, nas placas contendo glicose. Os resultados de CD.pYEDP (*ogg1*- com vetor vazio) e CD.pY\_TcOGG1 (*ogg1*- com pYEDP\_TcOGG1) foram estatisticamente diferentes (\*\*\*) de FF.pYEDP (WT), mas não diferiram entre si. **B)** Número de mutantes a cada  $10^7$  células, nas placas contendo galactose. O número de mutantes de CD.pYEDP foi estatisticamente diferente de FF.pYEDP (\*\*\*) e o número de mutantes de CD.pY\_TcOGG1 diferiu de CD.pYEDP (\*\*), mas não houve diferença estatística entre CD.pY\_TcOGG1 e FF.pYEDP, mostrando que a expressão de *TcOGG1* foi capaz de reduzir a frequência de mutação em leveduras *ogg1*-. Os gráficos foram gerados utilizando-se mediana e as análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5, com o teste de Kruskal-Wallis de análise de variância simples (One way ANOVA). \*\* = *p value* < 0,01; \*\*\* = *p value* < 0,001.

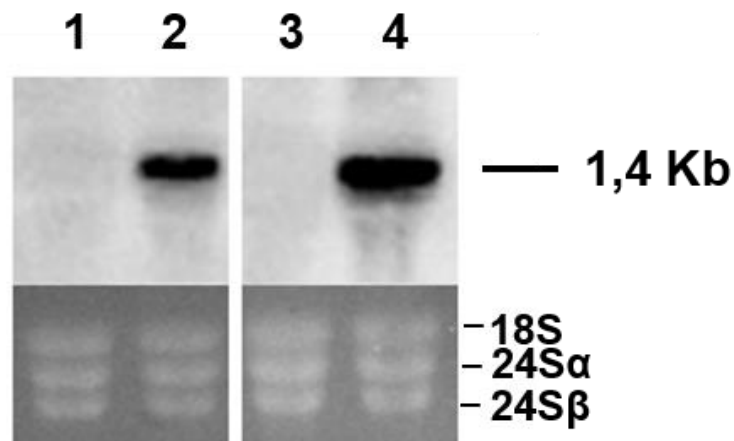
Em galactose, onde há a expressão do gene inserido no plasmídio, a expressão de *TcOGG1* na linhagem deficiente reduziu a frequência de mutantes para níveis similares aos da linhagem WT, não havendo diferença estatística entre CD.pY\_ *TcOGG1* e FF.pYEDP. Porém, a frequência de mutantes diferiu entre *ogg1-* com o plasmídio vazio e *ogg1-* com pYEDP\_ *TcOGG1* (*p value* < 0,01) e entre CD.pYEDP e WT (*p value* < 0,001) (Figura 11). Assim, *TcOGG1* complementou leveduras deficientes em *OGG1*, pois foi capaz de reduzir o número de mutantes Lis<sup>+</sup>, mostrando que a proteína em estudo provavelmente possui atividade glicosilásica.

#### **4.1.2. *TcOGG1* em *Trypanosoma cruzi***

Na introdução deste trabalho, pode-se ver que para os estudos com *TcOGG1* em *T. cruzi* foi construída uma linhagem do parasito que superexpressa este gene. Foram observados alguns fenótipos desta linhagem, como o aumento da sensibilidade a peróxido de hidrogênio e a redução da quantidade de 8-oxoguanina no núcleo e na mitocôndria do parasito, em comparação com células selvagens. Desse modo, nesta dissertação foi dada continuidade aos experimentos com esta linhagem superexpressora, para melhor caracterizá-la.

Para confirmar a superexpressão do gene *TcOGG1* em *T. cruzi*, foi utilizada a técnica de *Northern Blot*. Amostras de RNA total de epimastigotas não tratadas e tratadas com 300 µM de peróxido de hidrogênio foram extraídas e utilizadas para sintetizar o RNA usado nos experimentos.

Após a incubação das amostras com a sonda radioativa específica para *TcOGG1*, pôde-se observar bandas no tamanho esperado para o gene (cerca de 1,4 Kb) apenas na linhagem superexpressora não tratada e tratada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 12, canaletas 2 e 4). Este resultado mostra que os parasitos superexpressores apresentam uma quantidade maior de RNA mensageiro de *TcOGG1* do que as células controle (transfectadas com o plasmídio vazio).



**Figura 12: Superexpressão de *TcOGG1* em *T. cruzi*.** Formas epimastigotas tratadas por 20 minutos com 300  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio ou não tratadas tiveram seus RNAs totais extraídos, que foram utilizados para sintetizar o RNA usado nos experimentos. Sondas radioativas específicas para *TcOGG1* foram incubadas com tais amostras. A revelação da membrana mostrou que há bandas do tamanho esperado para o gene *TcOGG1* (aproximadamente 1,4 Kb) apenas no parasito superexpressor. Parte superior da figura: revelação da membrana de Northern Blot. Parte inferior: gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo contendo os RNAs extraídos. **1:** *T. cruzi* pROCK não tratado; **2:** *T. cruzi* pROCK\_*TcOGG1* não tratado; **3:** *T. cruzi* pROCK tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **4:** *T. cruzi* pROCK\_*TcOGG1* tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

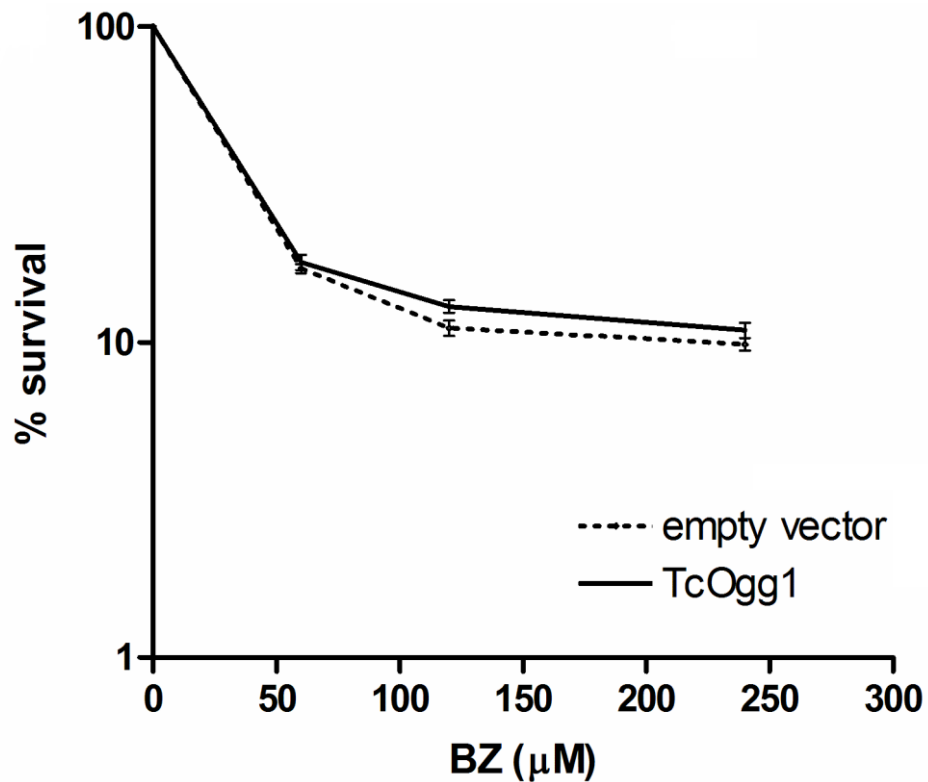
#### **4.1.1.1. A superexpressão de *TcOGG1* não altera a resposta de *T. cruzi* ao tratamento com benzonidazol**

Benzonidazol (BZ) (Coura & Castro, 2002) é uma das drogas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas. Acredita-se que o benzonidazol possui ação tripanossomacida pela geração de estresse oxidativo. Assim, decidiu-se avaliar o efeito desta droga sobre os parasitos superexpressores de *TcOGG1*.

Formas epimastigotas de CL Brener pROCK e CL Brener pROCK\_*TcOGG1* em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 0, 60, 120 e 240  $\mu\text{M}$  de benzonidazol. Foram feitas contagens 48 e 72 horas após o tratamento das células. Como poder ser visto na Figura 13, não houve diferença entre os parasitos controle e os parasitos superexpressores, em quaisquer concentrações de droga.

#### **4.1.1.2. Análise das lesões no DNA mitocondrial e nuclear de *T. cruzi* superexpressor de *OGG1***

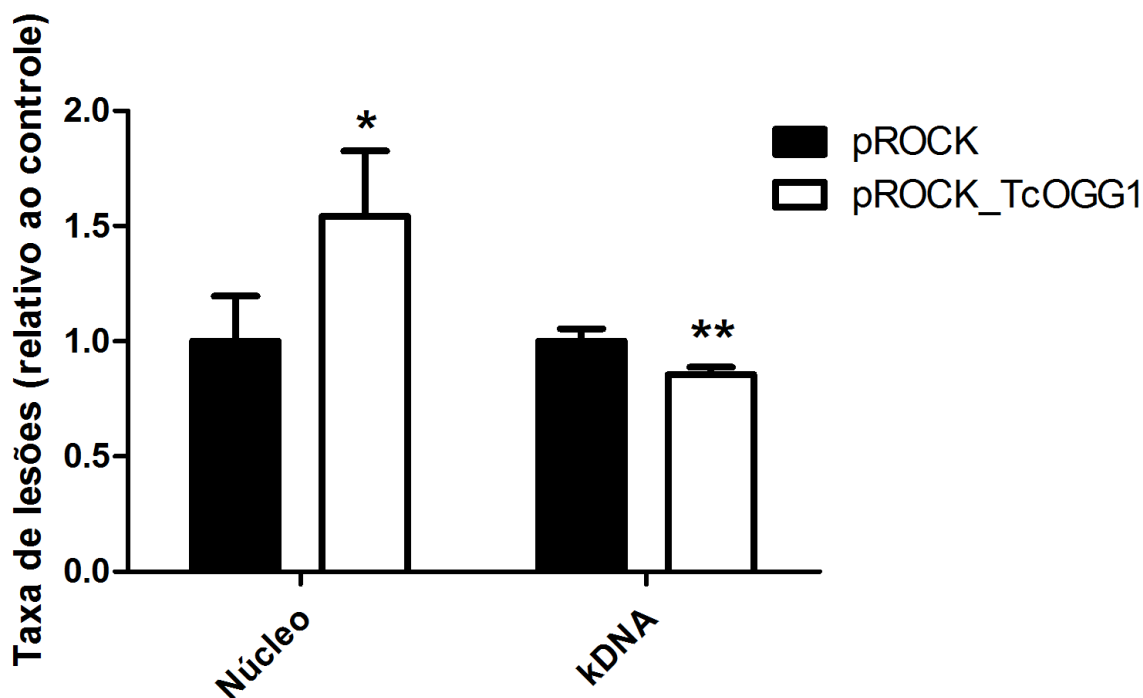
A técnica de análise de dano no DNA por PCR quantitativa (QPCR) foi empregada para comparar a extensão de lesões nos genomas mitocondrial e nuclear das linhagens de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho. Este ensaio baseia-se no princípio de que muitos tipos de lesões no DNA podem atrasar ou bloquear a progressão da DNA polimerase durante a amplificação do material genético (Santos et al., 2006). Sendo assim, se quantidades iguais de DNA de amostras diferentes são amplificadas por QPCR em condições iguais, o DNA que possuir menos lesões vai apresentar uma amplificação maior do que o DNA mais danificado. A técnica de QPCR tem como vantagem uma alta sensibilidade, uma vez que utiliza a metodologia de PCR longa, com a amplificação de fragmentos de DNA de 10 Kb ou mais. Isto permite a detecção de baixos níveis de lesões (aproximadamente 1 por  $10^5$  Kb). Outra vantagem é a possibilidade do uso de pequenas quantidades de amostra de DNA genômico total (poucos nanogramas), por se tratar de uma técnica baseada em PCR. Este método foi padronizado por nosso grupo de pesquisa para a análise de lesões em *T. cruzi*



**Figura 13: A superexpressão de *TcOGG1* não altera a resposta de *T. cruzi* ao tratamento com benzonidazol.** Epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas com vetor vazio (empty vector, linha tracejada) ou pROCK\_*TcOGG1* (TcOgg1, linha cheia) foram tratadas com 0, 60, 120 e 240 µM de benzonidazol. Foram feitas contagens 48 e 72 horas após o tratamento das células, em câmara de Neubauer com corante vital eritrosina. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. Em quaisquer concentrações de droga, não houve diferença na resposta entre parasitos controle (empty vector) e superexpressores (TcOgg1). Os gráficos foram gerados utilizando-se média e as barras representam o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5 utilizando-se teste *t* não-pareado.

(Rajão, M., tese de doutorado da Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, 2011) e mostrou-se bastante eficiente na mensuração de danos oxidativos no DNA deste parasito (Furtado et al., 2012; Aguiar et al., 2013; Rajão et al., *in press*).

Células das linhagens de *Trypanosoma cruzi* pROCK e pROCK\_*TcOGG1* foram tratadas com 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos e, após lavagem, foram incubadas a 28°C por 24 horas. Após este período, amostras de DNA genômico total foram extraídas destas células. Tais amostras foram utilizadas para a amplificação de fragmentos curtos de 250 pb (utilizados para normalizar os resultados, uma vez que o kDNA (DNA mitocondrial) corresponde a 25% do DNA nuclear de *T. cruzi*) e fragmentos longos, de 10 Kb (nos quais esperava-se encontrar lesões), com iniciadores nucleares e mitocondriais. A figura 14 mostra que parasitos superexpressores de *TcOGG1* apresentaram maior número de lesões no DNA nuclear do que os parasitos controle (pROCK), com *p value* menor do que 0,1. Este resultado corrobora os resultados obtidos para estas mesmas linhagens em curvas de sobrevivência e medição da quantidade de 8-oxoG após tratamento com água oxigenada, mostrados na Introdução. Em contraste, no kDNA (DNA mitocondrial) os superexpressores tiveram uma menor quantidade de lesões do que o controle (*p value* menor do que 0,01).



**Figura 14: *T. cruzi* superexpressor de *OGG1* possui maiores níveis de lesões no DNA nuclear, mas não no DNA mitocondrial.** Amostras de DNA genômico total foram extraídas de formas epimastigostas das linhagens pROCK (controle) e pROCK\_TcOGG1 (superexpressor), após tratamento com 200  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio e período de recuperação das células. Tais amostras foram utilizadas em reações de PCR longa, gerando amplicons que foram quantificados (técnica de QPCR), possibilitando a mensuração da taxa de lesões no material genético. Pode-se observar que pROCK\_TcOGG1 (barra branca) possui maior quantidade de lesões no DNA nuclear do que pROCK (barra preta), enquanto que no DNA mitocondrial (kDNA) o superexpressor possui uma taxa de lesões menor do que o controle. Os gráficos foram gerados utilizando-se a média de 2 experimentos, com as barras de erros representando o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5, com o teste t não pareado. \* = *p value* < 0,1; \*\* = *p value* < 0,01.

#### 4.1.1.3. *TcOGG1* localiza-se no núcleo e na mitocôndria de *Trypanosoma cruzi*

Após o estudo da função de *TcOGG1* em células de levedura e de *Trypanosoma cruzi*, decidiu-se localizar esta proteína no parasito, para verificar onde ocorre sua atividade.

Através da análise da sequência protéica de *TcOGG1*, observou-se que há sequências de endereçamento tanto nucleares quanto mitocondrial (Figura 15A). A fim de confirmar esta predição, seguiu-se para a localização da proteína em CL Brener. Utilizamos o vetor pTREX-GFP (DaRocha *et al.*, 2004; anexo 7.5.), que permite a inserção do gene de interesse nos sítios de restrição de *Xba*I e *Eco*RI (*Mfe*I), levando à expressão da proteína em fusão com GFP, o que gera uma fluorescência verde. Transfectamos parasitos da cepa CL Brener com pTREX-GFP e com pTREX-GFP\_*TcOGG1*, sendo os transfectantes estáveis selecionados em meio líquido acrescido de neomicina.

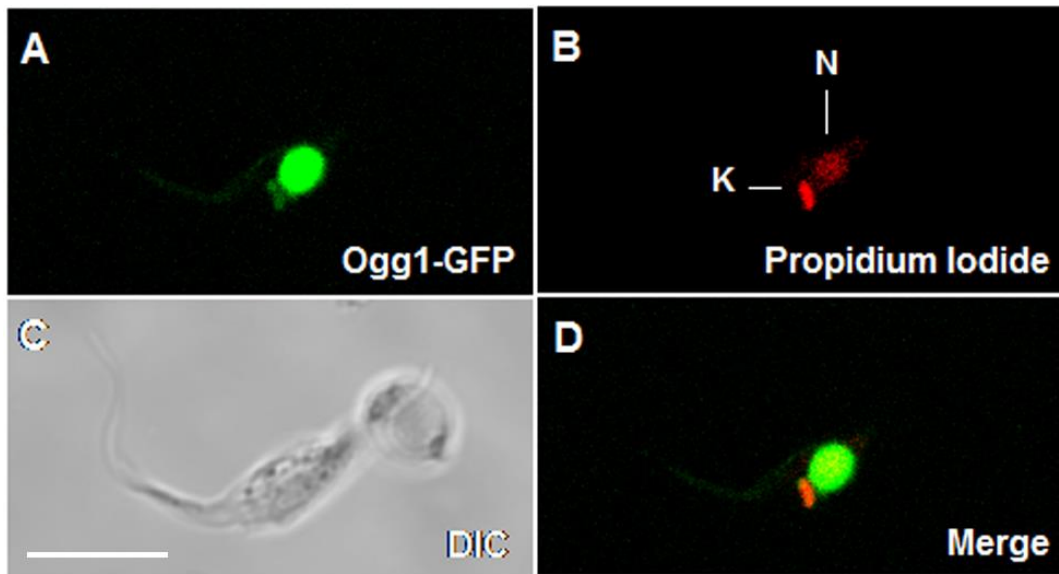
Epimastigotas com vetor vazio, ou com pTREX-GFP\_*TcOGG1*, foram fixadas com paraformaldeído, tratadas com RNase e então incubadas por 15 minutos com iodeto de propídeo, a fim de corar o DNA presente nas células. Feito isto, as células foram colocadas em lâminas e observadas em microscópio confocal, sendo as imagens analisadas através do uso do software Zeiss LSM Image Browser.

Em células transfectadas com o vetor vazio, conforme o esperado, houve geração de fluorescência verde por todo o parasito (dado não mostrado). Em células portadoras de pTREX-GFP\_*TcOGG1*, foi possível observar a geração pontual da fluorescência (Figura 15B). *TcOGG1* colocalizou com a marcação feita com iodeto de propídeo (que cora DNA), nas regiões do núcleo e da mitocôndria. *OGG1* de *T. cruzi* mostrou maior direcionamento para o núcleo (fluorescência mais intensa) do que para a mitocôndria (fluorescência menos intensa). O resultado obtido da localização de *TcOGG1* está de acordo com as predições de endereçamento subcelular (Figura 15A) e com os resultados para níveis de 8-oxoG em células superexpressoras da proteína (Figura 8) e de QPCR (Figura 14) confirmando a atuação de *TcOGG1* nos genomas mitocondrial e nuclear de *Trypanosoma cruzi*.

A)

```
MHAWYALPSAAVNLPMTLCGGQCFRWRRTPRGTWVGVVERGAYELSDAAHPPEFQAVHPRGEE
KRGMRSSLSHPSDDLSDVFWFRCLHREPKNALDLSTEACFLRHYLALDVDLQKLWRRWTRDNP
MRDHPLVRYLTSNAGKGPSVNIHRLRQNIHETLLAFLCSQNNNVQRITGLVEKLATSYGDHLCD
YNLETGDVRNVGYLNHTSTRPTKNAKRDDTGDGDWIPLHTMPSMDELARRSEDELRTLGFYRS
KYIVQCASIIQSSGATRRKKEEGVNCFCSSMQSYKWYDDLDPCLSLYDRREKLLSLPGVGRKV
ADCILLFAVGHHEIVPVDTHMAQVATEYLAGTATCGKKVLCNGMGGKRKRNSEGKSSLTAVSTD
GSCWEKVLADWYRKGKERDMKMPALLHKHHDALQLGFWHLFGDYCGWAHSILFYARMRRGQRDN
```

B)



**Figura 15: Localização de TcOGG1 em *Trypanosoma cruzi*.** **A)** Predição de localização subcelular para a sequência de TcOGG1. A sequência de endereçamento mitocondrial está em amarelo, e as sequências de endereçamento nuclear estão em vermelho. As predições foram feitas com os softwares MitoProt e NucPred. **B)** Epimastigotas de CL Brener transfectadas com pTREX-GFP\_*TcOGG1* foram fixadas com paraformaldeído, tratadas com RNase e incubadas com iodeto de propídeo, a fim de corar o DNA. Estas células foram colocadas em lâminas e observadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META). As imagens foram analisadas com o software Zeiss LSM Image Browser. Propidium iodide (iodeto de propídeo- imagem **B**): mostra as regiões que contêm DNA, sendo K correspondente à mitocôndria (cinetoplasto) e N ao núcleo. TcOGG1 (Ogg1-GFP; TcOGG1 em fusão com GFP, imagem **A**) colocalizou com a marcação feita por iodeto de propídeo (**D**), indicando que OGG1 de *T. cruzi* localiza-se tanto na mitocôndria quanto no núcleo do parasito, sendo direcionada em maior quantidade para o núcleo (fluorescência mais intensa) do que para a mitocôndria (menor intensidade). DIC: contraste de interferência diferencial; Merge: sobreposição das imagens com marcação com GFP e com iodeto de propídeo. Barra de escala: 5 µm.

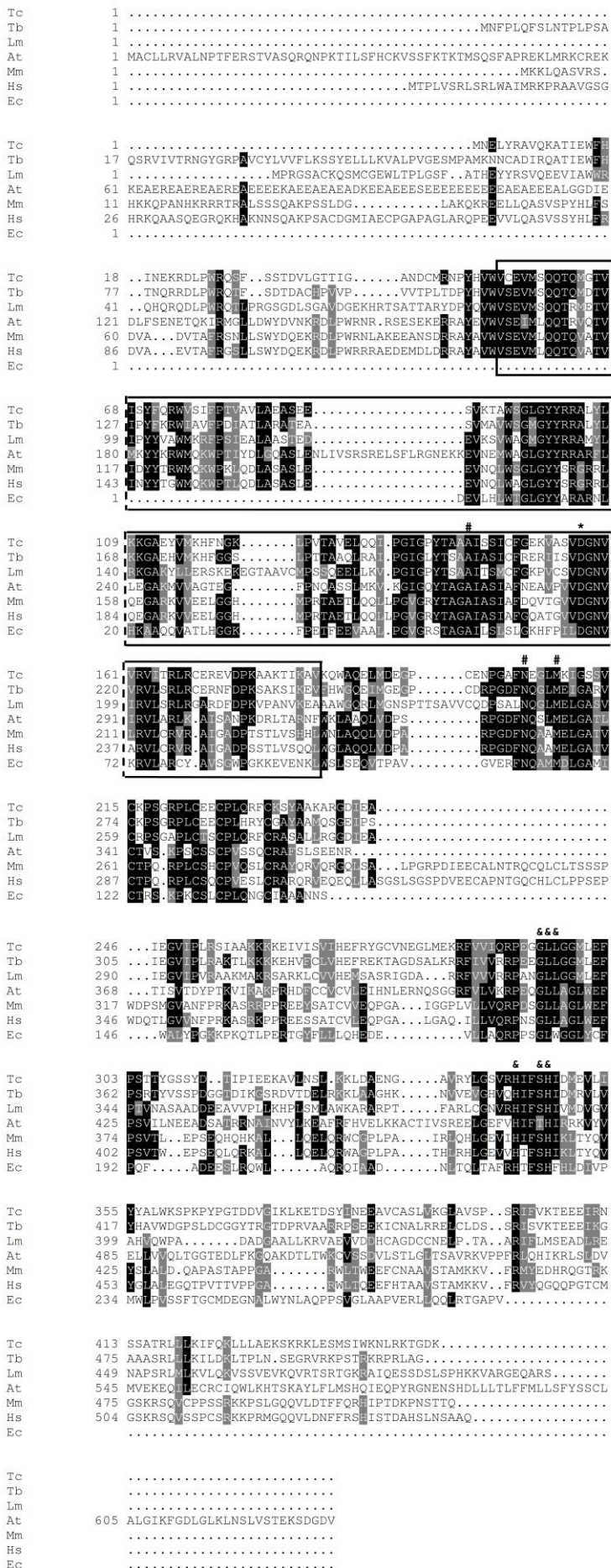
## 4.2. TcMYH

Uma vez que as enzimas MTH e OGG1 de *Trypanosoma cruzi* foram descritas por nosso grupo de pesquisa (Aguiar et al., 2013; Furtado et al., 2012), decidimos estudar a enzima MYH, a fim de caracterizarmos todo o Sistema GO em *T. cruzi*.

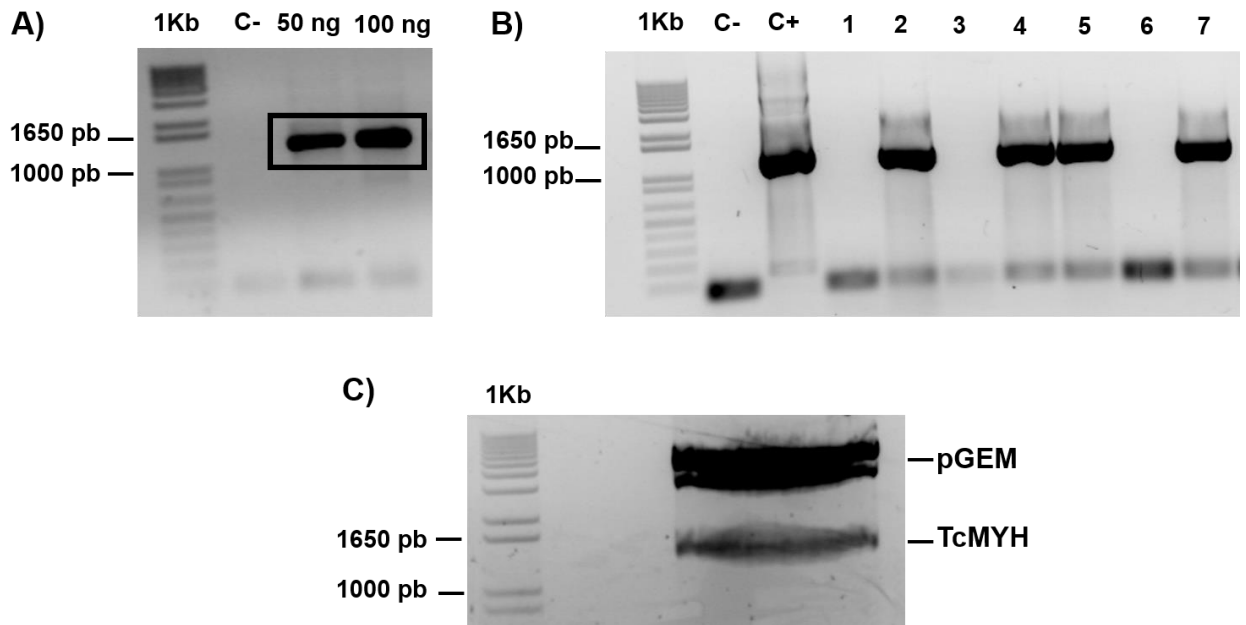
### 4.2.1. *Trypanosoma cruzi* possui um homólogo de MutY

Após a busca no banco de dados do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005; The Kinetoplastid Genome Resource: TriTrypDB - <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), foi observado que o parasito possui um homólogo de MutY. Alinhamos esta sequência com as sequências proteicas de MutY de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Escherichia coli* (Figura 16). Neste alinhamento, podemos observar que há muitos aminoácidos e motivos conservados, como o motivo  $\alpha$ -helix-hairpin- $\alpha$ -helix-Gly/Pro-Asp, característico da família HhH-GPD/K de DNA glicosilases e AP liases, na qual MutY está inserida. Também há a conservação do resíduo catalítico de aspartato (marcado com \* na figura), dos resíduos de ligação ao DNA e reconhecimento de 8-oxoguanina (marcados com &) e dos resíduos de ligação ao substrato (marcados com #) (Brinkmeyer et al., 2012; Punta et al., 2012; Marchler-Bauer et al., 2013; Markkanen et al., 2013).

A sequência Tc00.1047053511803.20 de MYH foi amplificada com os pares de primers listados na Tabela 4, gerando fragmentos de cerca de 1350 pb (Figura 17A). Os diferentes pares de primers amplificavam exatamente a mesma região, porém, possuíam caudas com sequências alvo para diferentes enzimas de restrição, possibilitando a clonagem do fragmento nos diferentes vetores utilizados. Após a amplificação do fragmento de MutY do DNA genômico de *T. cruzi* (Figura 17A), este fragmento foi clonado no vetor pGEM T Easy (Anexo 7.1). Clones positivos resultantes da transformação com o produto da clonagem foram selecionados através de PCR de colônia (Figura 17B) e utilizados para a obtenção de DNA plasmidiano. Os plasmídios obtidos foram digeridos com as endonucleases apropriadas e os insertos liberados



**Figura 16: Alinhamento das sequências protéicas de MutY de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *A. thaliana*, *M. musculus*, *H. sapiens* e *E. coli*. Os resíduos conservados estão em preto e as substituições conservativas em cinza. O motivo  $\alpha$ -helix-hairpin- $\alpha$ -helix-Gly/Pro-Asp, característico da família HhH-GPD/K, está marcado pelas caixas pretas; o resíduo catalítico de aspartato (D) está sinalizado com um asterisco (\*); os resíduos de ligação ao DNA e reconhecimento de 8-oxoguanina estão marcados com & e os resíduos de ligação ao substrato marcados com #. O alinhamento foi feito com o programa Multalin e os resíduos conservados e as substituições foram marcados com o programa BOXSHADE 3.21.**



**Figura 17: Amplificação e clonagem de *TcMYH*.** Imagens de géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo. **A)** Fragmento de *TcMYH* amplificado por PCR a partir de DNA genômico de CL Brener (demarcado pelo retângulo). 50 ng= 50 ng de DNA; 100ng= 100ng de DNA. **B)** *TcMYH* amplificado por PCR de colônia a partir de clones resultantes da transformação com pGEM\_*TcMYH*. 1-7: diferentes clones de *E. coli* transformados com pGEM\_*TcMYH*. **C)** Digestão de pGEM\_*TcMYH*, com liberação do fragmento de *TcMYH*. As fotos mostram experimentos com o par de primers *TcMutY.Xba-F* e *TcMutY.Hind-R* e com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, mas resultados similares foram obtidos com todos os pares mostrados na Tabela 4. 1 Kb: padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder); C- : controle negativo das reações de PCR, feito sem DNA molde; C+: controle positivo feito com plasmídeo contendo *TcMYH*.

foram purificados de géis de agarose (Figura 17C) e usados nas subclonagens nos vetores adequados (pMAL, pROCK e pTREX).

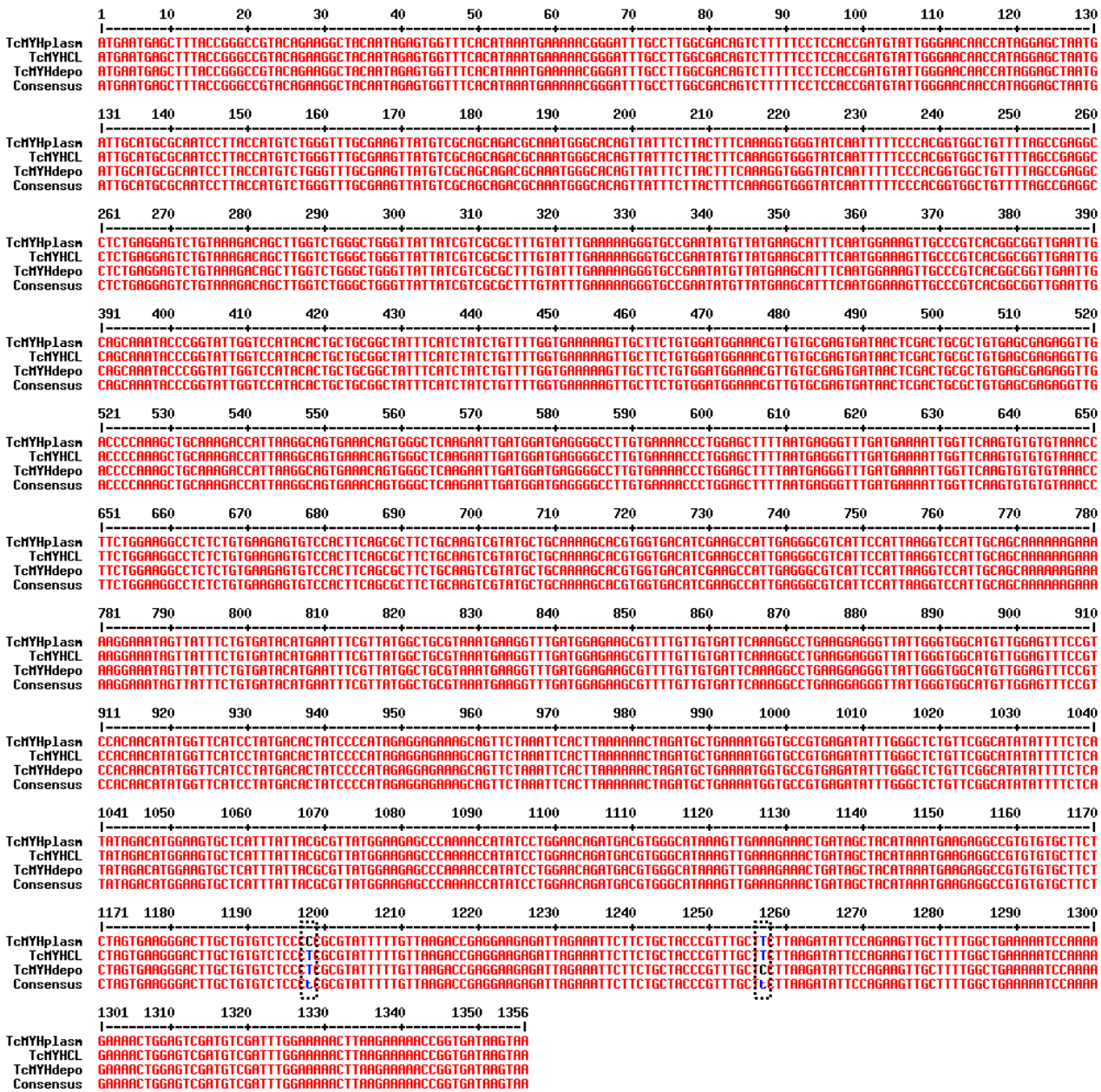
Feitas as construções dos plasmídios pMAL\_*TcMYH*, pROCK\_*TcMYH* e pTREX\_*TcMYH*, estas foram sequenciadas, utilizando-se os iniciadores listados na Tabela 6. Os sequenciamentos foram realizados com o sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems), pela empresa Myleus Biotechnology (<http://www.myleus.com>). As sequências geradas foram analisadas no *software* DNA Baser v3.

Os resultados mostraram que todas as construções possuíam duas mutações em relação à sequência de *MutY* depositada para *Trypanosoma cruzi* (Figura 18): T→C, na posição 1118, que não modifica o aminoácido codificado, e C→T, na posição 1257, que modifica o aminoácido codificado de serina para prolina. Para descobrir se essas mutações foram geradas durante a amplificação a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, ou se já existiam no DNA utilizado como molde, também foi sequenciado o gene *TcMYH* de *Trypanosoma cruzi* CL Brener. Foi observado que uma das mutações, a da posição 1257, que modifica o aminoácido codificado, se encontra no DNA de CL Brener (Figura 18). Uma vez que uma das mutações não modifica o aminoácido, e a outra estava presente no DNA da cepa utilizada em todos os experimentos, decidiu-se prosseguir com o uso dos plasmídios citados.

#### **4.2.2. *TcMYH* complementa bactérias deficientes em *MutY***

A fim de caracterizar a ação de *TcMYH* em organismos vivos, foram feitos ensaios de complementação funcional heteróloga em *Escherichia coli*. O princípio é o mesmo do experimento feito no item 4.1.1.2., porém, para *TcMYH*, foi utilizado o ensaio de mutação espontânea em rifampicina.

As linhagens bacterianas AB1157 (*mutY*<sup>+</sup>) e BH980 (*mutY*<sup>-</sup>) foram utilizadas nesse ensaio. Ambas são sensíveis ao antibiótico rifampicina. Assim, se plaqueadas em meio contendo este antibiótico, apenas clones mutantes crescem. A linhagem AB1157 (WT), possui baixas taxas de mutação espontânea, enquanto que a linhagem BH980 apresenta altas taxas de mutação. Estas células foram transformadas com pMAL contendo ou não um inserto correspondente ao gene *TcMYH*, que foi inserido



**Figura 18: Alinhamento das seqüências de *TcMYH* obtidas por sequenciamento e da seqüência de *TcMYH* depositada no banco de dados.** Em vermelho estão os nucleotídeos iguais; em preto, os nucleotídeos que diferem das demais seqüências. A seqüência obtida do sequenciamento dos plasmídios (TcMYHplasm) divergiu da seqüência depositada (TcMYHdepo) nas posições 1118 e 1257, enquanto o sequenciamento de CL Brener (TcMYHCL) divergiu de TcMYHdepo apenas na posição 1257, convergindo com TcMYHplasm. As seqüências foram alinhadas no software Multialin. As linhas tracejadas destacam as posições das mutações.

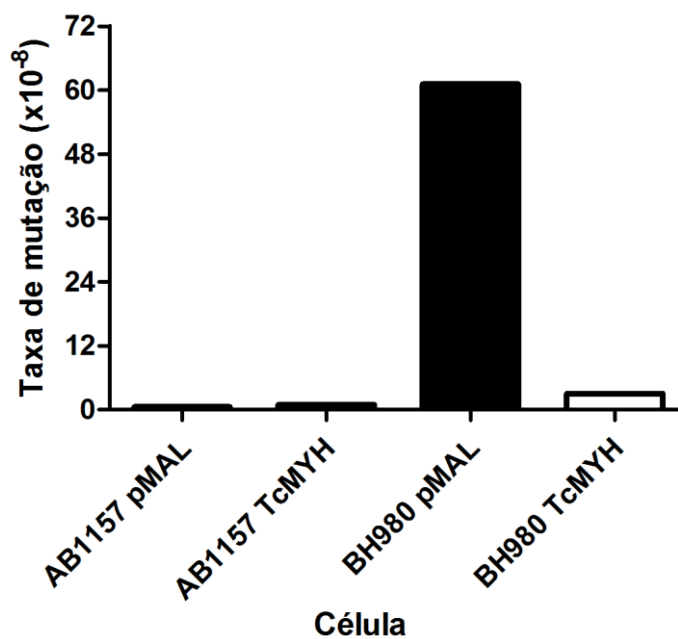
ampicilina ou apenas ampicilina. As colônias crescidas nas placas foram contadas. Posteriormente, determinou-se a relação entre o número de mutantes (colônias que cresceram em placas com rifampicina e ampicilina) e o número total de bactérias (titulado a partir das colônias crescidas apenas em ampicilina) e foi calculada a taxa de mutação para cada célula.

A Figura 19 mostra que *TcMYH* complementou BH980, uma vez que a taxa de mutação desta linhagem com pMAL vazio foi de 61 mutantes a cada  $10^8$  células, enquanto que BH980 transformada com *TcMYH* apresentou aproximadamente 3 mutantes a cada  $10^8$  células, valor próximo ao da célula selvagem (AB1157 pMAL e AB1157 *TcMYH*), de cerca de 1 mutante X  $10^8$  células. Assim, *TcMYH* possui ação similar à de *EcMutY*.

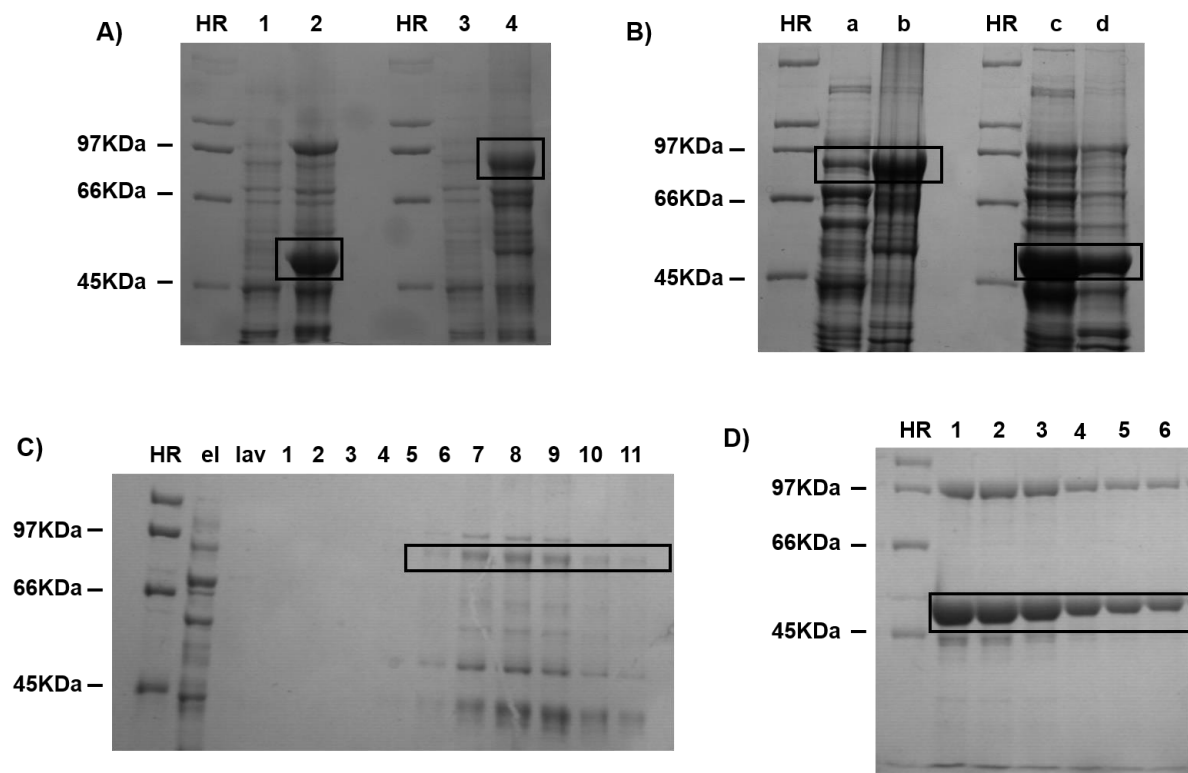
#### **4.2.3. *TcMYH* é capaz de excisar uma adenina pareada com 8-oxoguanina**

Uma vez que *TcMYH* foi capaz de complementar a função de *EcMutY in vivo*, seguiu-se adiante para verificar se aquela proteína possuiria a atividade de MutY DNA glicosilase. Para tal, foi feita, primeiramente, a clonagem, expressão e purificação de *TcMYH*. Dessa forma, foi obtida a proteína recombinante MBP-*TcMYH*, a qual foi utilizada na realização de ensaios *in vitro*.

Amostras do extrato proteico total de culturas de *E. coli* BH980, transformadas com pMALc2g ou pMAL\_*TcMYH*, antes e após adição de IPTG (que ativa o promotor do plasmídio) foram analisadas por SDS-PAGE 10%, corado com Comassie Blue (Figura 20). Após a indução com IPTG, ocorreu o aparecimento de uma forte banda na posição de aproximadamente 93 KDa (Figura 20A, canaleta 4), indicando a indução da expressão da proteína recombinante MBP-*TcMYH*. O aumento de expressão de MBP (51 KDa), para as bactérias transformadas com o plasmídio vazio, também pode ser observado (Figura 20A, canaleta 2). O extrato solúvel de culturas bacterianas após a indução com IPTG (Figura 20B, canaletas b e d) foi passado em uma coluna de resina de amilose com o objetivo de purificar a proteína recombinante. As frações



**Figura 19: *TcMYH* complementa bactérias deficientes em *MutY*.** AB1157 (*mutY*<sup>+</sup>) e BH980 (*mutY*<sup>-</sup>) transformadas com pMAL contendo ou não um inserto correspondente ao gene *TcMYH* foram plaqueadas em meio contendo ampicilina+rifampicina ou apenas ampicilina. Após incubação por 16 horas a 37°C, as colônias foram contadas e a taxa de mutação foi calculada conforme o item 3.11.1. A expressão de *TcMYH* em BH980 (barra branca) reduziu a taxa de mutação cerca de 20 vezes em relação a BH980 com pMAL vazio (barra preta).

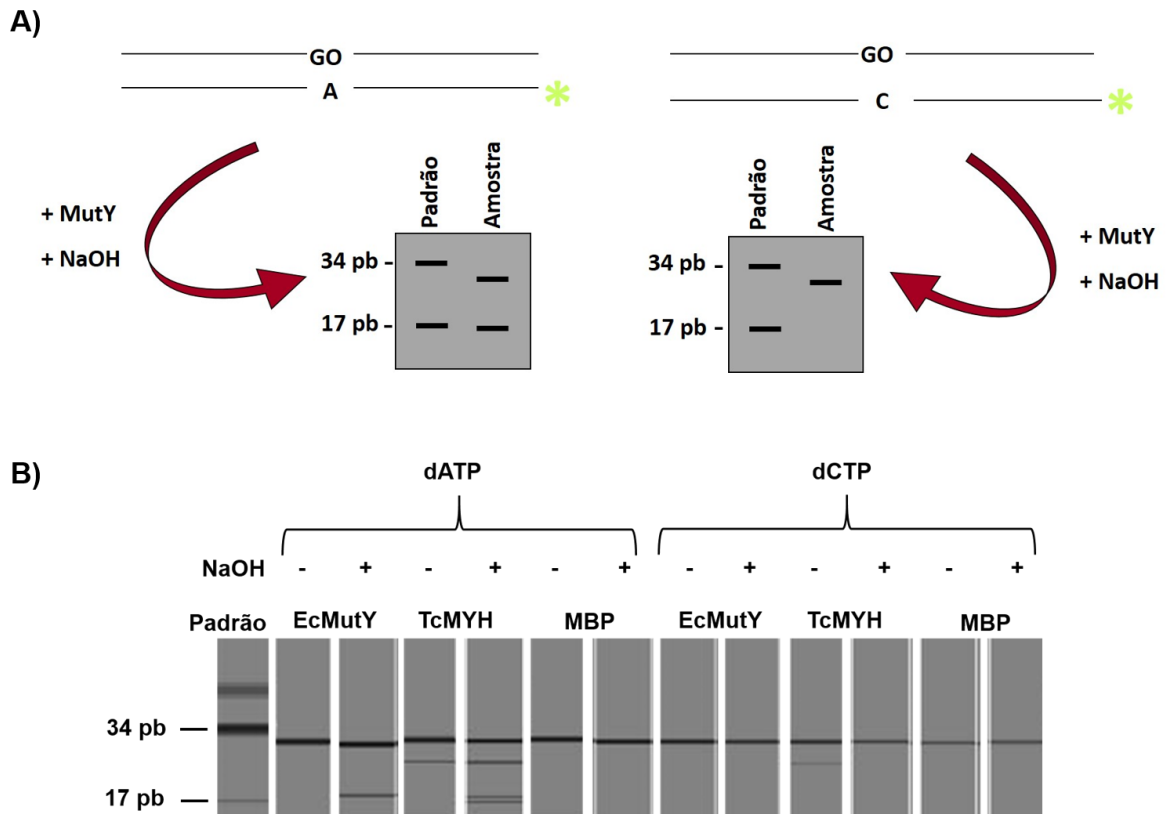


**Figura 20: Expressão e purificação de MBP-*TcMYH* e de MBP.** **A)** Após a transformação de bactérias BH980 com pMAL ou pMAL-*TcMYH*, as proteínas totais foram extraídas antes (canaletas 1 e 3) e após a adição de IPTG (canaletas 2 e 4), que ativa o promotor do plasmídio. 1 e 2: amostras MBP; canaletas 3 e 4: amostras de MBP-*TcMYH*. É observado aumento da expressão tanto de MBP (2; aproximadamente 50 KDa) quanto de MBP-*TcMYH* (4; 93 KDa). **B)** Extratos protéicos totais de amostras tratadas com IPTG foram lisados e as frações solúveis (a e c) e insolúveis (b e d) foram analisadas em gel. Canaletas a e b: MBP-*TcMYH*; canaletas c e d: MBP. **C)** Purificação de MBP-*TcMYH*. el: primeira passagem das proteínas, sem maltose. lav: após a passagem de tampão de coluna. 1 a 11: amostras obtidas após a adição de maltose, que elui as proteínas da coluna de amilose. **D)** Purificação de MBP. 1 a 6: amostras obtidas após a adição de maltose. **HR:** High Range (BioRad), padrão de peso molecular. Os retângulos destacam as bandas referentes às proteínas de interesse.

eluídas da resina foram também visualizadas por SDS-PAGE 10%, sendo possível observar a presença das proteínas purificadas MBP-*TcMYH* (Figura 20C, canaletas 6-11) e MBP (Figura 20D, canaletas 1-6).

O ensaio *in vitro* com MBP-*TcMYH* e MBP purificadas foi feito utilizando-se dúplexes de oligonucleotídeos de 30-mer, no qual uma fita continha 8-oxoguanina na posição 15, enquanto a outra fita, marcada com fluoresceína, continha uma adenina, ou uma citosina, na mesma posição. Tais dúplexes foram incubados com MBP-*TcMYH*, ou MBP, ou *EcMutY* (R&D Systems). Após 18 horas de incubação, foi adicionado NaOH às reações, a fim de finalizar a quebra da fita que sofreu excisão, uma vez que *MutY* é uma glicosilase monofuncional (Introdução). Feito isto, as reações foram incubadas a 90°C por 30 minutos e foi adicionada solução de parada e feito o aquecimento e resfriamento das amostras. As reações foram aplicadas em gel de acrilamida desnaturante no aparelho de sequenciamento automático ALF DNA (Amersham Biosciences). Foram utilizados padrões de tamanho de 34 e de 17 pb (Figura 21A).

Para o dúplex contendo citosina (dCTP), observou-se apenas uma banda, próximo ao tamanho de 34 pb, para todas as enzimas, mesmo após a adição de NaOH (Figura 21B), correspondente à fita íntegra (30 pb). Isso demonstra que nenhuma das enzimas testadas (*EcMutY*, *TcMYH* e MBP) foi capaz de retirar a citosina pareada a 8-oxoguanina. Para o dúplex com adenina (dATP), pode-se ver a presença de mais uma banda, próxima ao padrão de 17 pb, para as enzimas *EcMutY* (controle positivo) e *TcMYH*, mas não para MBP (controle negativo), após a incubação com NaOH (Figura 21B). Essa banda corresponde à fita clivada, devido à ação de *MutY* DNA glicosilase das proteínas citadas. Para *TcMYH* há a presença de bandas adicionais, provavelmente devido à existência de contaminantes do processo de purificação.



**Figura 21: Excisão de uma adenina pareada com 8-oxoguanina por TcMYH. A)** Esquema ilustrativo do ensaio *in vitro*. O oligonucleotídeo contendo 8-oxoguanina (GO) foi anelado a um oligonucleotídeo marcado com fluoresceína (asterisco), contendo adenina (A) ou citosina (C) na mesma posição que GO. Os dúplexes foram incubados com a enzima (MutY) e NaOH. Para citosina (dCTP), esperava-se ver apenas uma banda no gel, correspondente à fita íntegra. Para adenina (dATP), esperava-se ver duas bandas, uma da fita íntegra e outra da quebra da fita, devido à ação da enzima. **B)** Gel do ensaio *in vitro*. Para dCTP, para qualquer proteína, observou-se apenas a banda da fita íntegra (~30 mer). Para dATP, observou-se a presença de duas bandas para EcMutY e TcMYH, após tratamento com NaOH: uma referente à fita íntegra (~30 mer) e outra referente à fita clivada (~15 mer). MBP (controle negativo) não foi capaz de retirar a adenina, pois mesmo com NaOH apresentou somente a banda da fita íntegra. + : presença de NaOH; - : ausência de NaOH.

#### **4.2.4. *TcMYH* em *Trypanosoma cruzi***

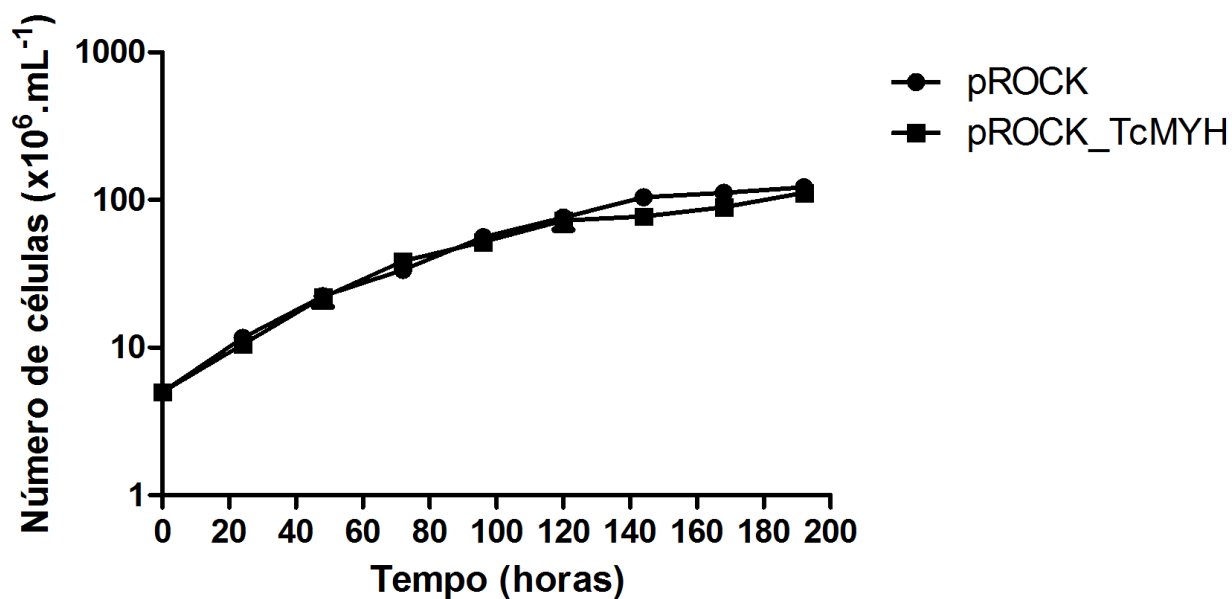
Uma vez que *TcMYH* foi capaz de complementar bactérias *mutY*- e de excisar uma adenina pareada com 8-oxoguanina, optou-se por pesquisar os efeitos da superexpressão desta proteína em *Trypanosoma cruzi*, bem como localizar onde esta proteína atua no parasito.

##### **4.2.4.1. A superexpressão de *TcMYH* aumenta a sensibilidade de *T. cruzi* a peróxido de hidrogênio**

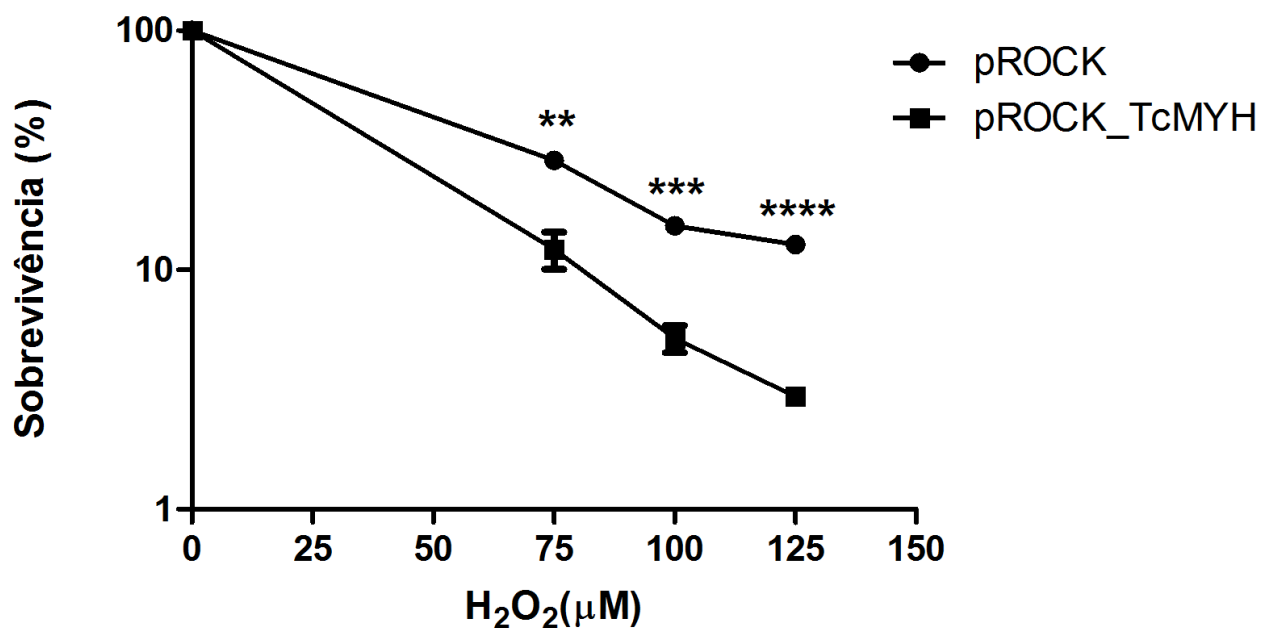
Foi realizada a transfecção do clone CL Brener com o vetor pROCK-HIGRO\_*TcMYH*, para a análise dos efeitos da superexpressão de *MYH* em *Trypanosoma cruzi*. A inserção do gene *TcMYH* no vetor pROCK (DaRocha *et al.*, 2004; anexo 7.4.), utilizando as enzimas *XbaI* e *XhoI*, removeu a sequência de GFP previamente existente. Utilizamos este vetor pois ele promove em *T. cruzi* a expressão estável de um gene, integrando-se por recombinação homóloga no *cluster* de  $\alpha/\beta$ -tubulina presente no genoma do parasito. O processamento correto do transcrito é garantido pela presença de sequências regulatórias no vetor.

Transfectantes estáveis de pROCK-HIGRO\_*TcMYH* foram selecionados em meio líquido acrescido de higromicina. Sob condições normais de cultivo (na ausência de tratamento genotóxico), as células transfectadas apresentaram crescimento semelhante ao da população controle (Figura 22) e não apresentam nenhuma alteração visível em sua morfologia (dado não mostrado).

A cultura do clone CL Brener transfectada com o vetor pROCK-HIGRO, e a cultura transfectada com pROCK-HIGRO\_*TcMYH* foram tratadas com 0, 75, 100 e 125  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após 72 horas, a densidade celular das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer. A sobrevivência em resposta ao tratamento foi estimada por comparação da densidade celular entre as culturas tratadas e não tratadas correspondentes. Como indicado pela curva de sobrevivência na figura 23, as células superexpressoras de *TcMYH* apresentam maior sensibilidade



**Figura 22: Curva de crescimento do clone CL Brener transfectado com pROCK-HIGRO\_TcMYH.** Culturas de CL Brener selvagem (círculo) ou transfectadas com pROCK-HIGRO\_TcMYH (retângulo) foram crescidas em meio líquido sem tratamento com agentes genotóxicos. Os parasitas vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina, a cada 24 horas. Não houve diferença de crescimento entre as diferentes linhagens. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão.



**Figura 23: Curva de sobrevivência do clone CL Brener transfectado com pROCK\_TcMYH em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio.** Culturas de CL Brener controle (círculo) ou transfectadas com pROCK\_TcMYH (retângulo) foram submetidas ao tratamento com 0, 75, 100 e 125 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 72h, os parasitas vivos de cada cultura foram contados em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. A célula transfectada com o gene *TcMYH* (retângulo) foi mais sensível a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a célula controle (círculo), o que pode ser visto pela menor sobrevivência daquela em relação a esta. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes; as barras representam o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5 utilizando-se teste *t* não-pareado. \*\* = *p* value < 0,01; \*\*\* = *p* value < 0,001; \*\*\*\* = *p* value < 0,0001.

ao estresse oxidativo gerado pelo tratamento com água oxigenada, quando comparadas à população controle. Esse aumento da sensibilidade foi observado para todas as concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo estatisticamente significativo.

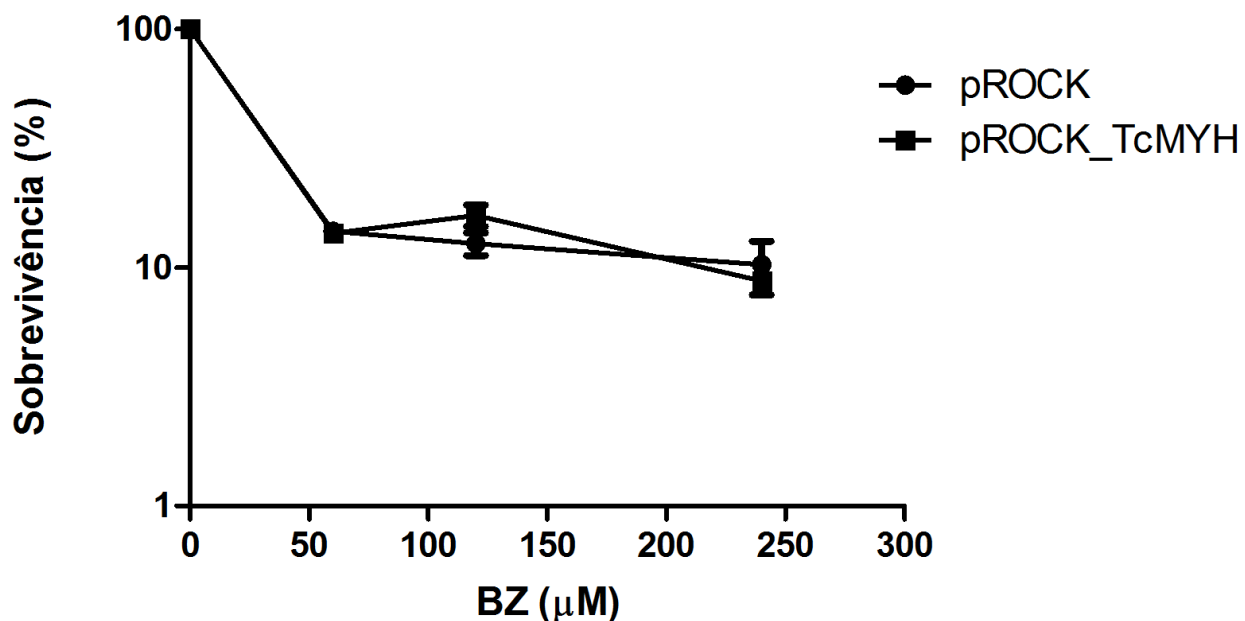
#### **4.2.4.2. A superexpressão de *TcMYH* não altera a sensibilidade de *T. cruzi* a benzonidazol**

Assim como foi feito para *TcOGG1*, formas epimastigotas de CL Brener pROCK e CL Brener pROCK\_*TcMYH* em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 0, 60, 120 e 240  $\mu\text{M}$  de benzonidazol. Foram feitas contagens 48 e 72 horas após o tratamento das células. Na Figura 24, pode-se ver que não houve diferença entre os parasitos controle e os parasitos superexpressores, em quaisquer concentrações de droga, de forma similar ao que ocorre para parasitos superexpressores de *TcOGG1*.

#### **4.2.4.3. *TcMYH* está localizada no núcleo e nos sítios antipodais de *Trypanosoma cruzi***

Primeiramente, utilizou-se análises *in silico* para predizer onde *TcMYH* estaria localizada no parasito. Obteve-se 60% de probabilidade de envio da proteína para o núcleo com o software NucPred (Brameier et al., 2007) e a mesma probabilidade de envio para a mitocôndria, através do programa Mitoprot (Claros & Vincens, 1996) (dados não mostrados).

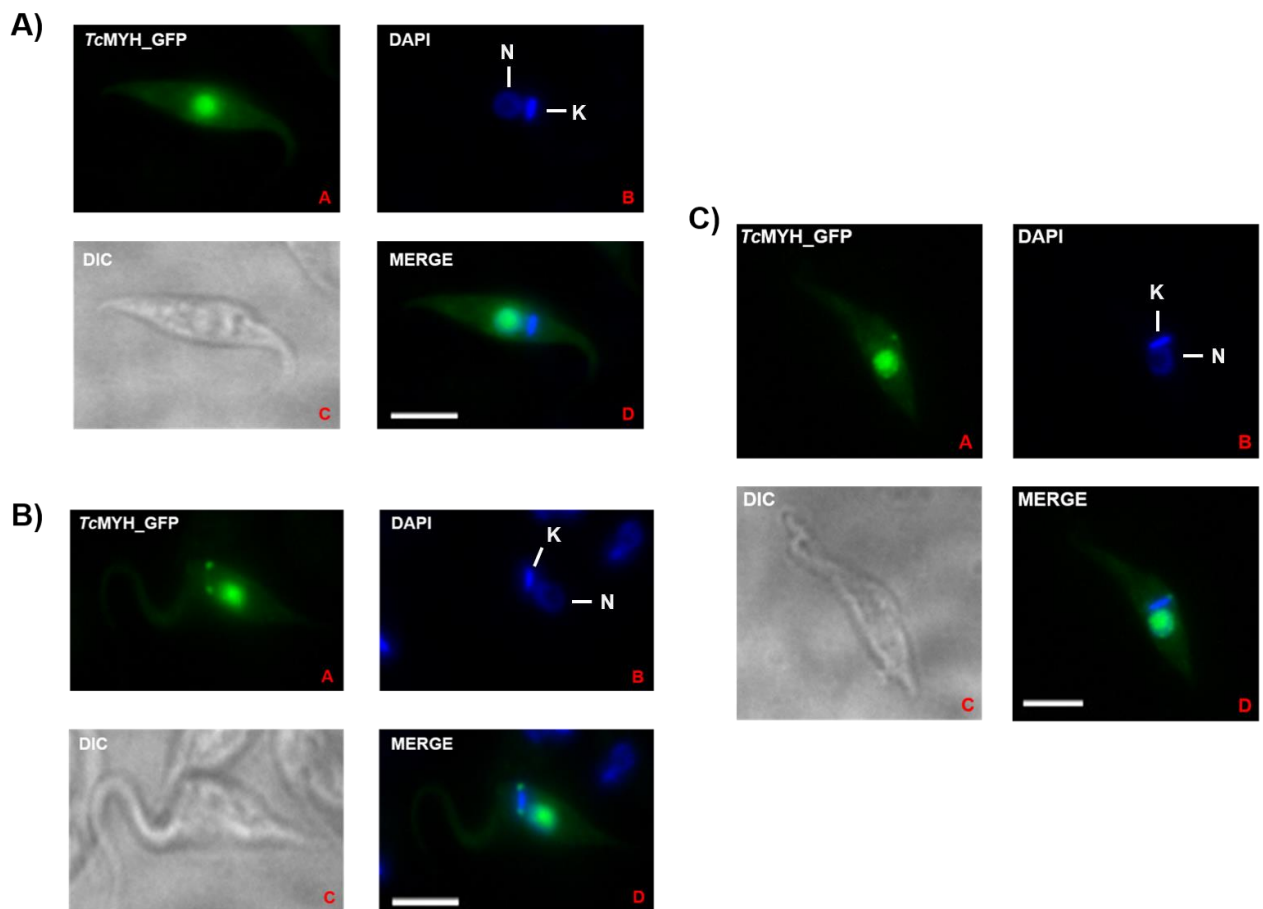
A localização de *TcMYH* em *Trypanosoma cruzi* foi feita através da expressão da proteína em fusão com GFP, com o plasmídeo pTREX (Anexo 5). Epimastigotas de CL Brener com vetor vazio, ou com pTREX-GFP\_*TcMYH*, foram fixadas com paraformaldeído e colocadas em lâminas. Feito isto, foram incubadas com DAPI, a fim de corar o DNA presente nas células. Após a adição de *anti-fading* e



**Figura 24: A superexpressão de *TcMYH* não altera a sensibilidade de *T. cruzi* ao tratamento com benzonidazol.** Epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas com vetor vazio (pROCK, círculo) ou pROCK\_*TcMYH* (retângulo) foram tratadas com 0, 60, 120 e 240 μM de benzonidazol. Foram feitas contagens 48 e 72 horas após o tratamento das células, em câmara de Neubauer com corante vital eritrosina. Os valores de y indicam a sobrevivência das culturas, em termos percentuais, em relação à cultura não tratada correspondente. Em quaisquer concentrações de droga, não houve diferença na resposta entre parasitos controle (pROCK) e superexpressores (pROCK\_*TcMYH*). Os gráficos foram gerados utilizando-se média e as barras representam o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5 utilizando-se teste *t* não-pareado.

a colocação e o selamento das lamínulas, as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti.

Observou-se que *TcMYH\_GFP* dirige-se tanto para o núcleo quanto para os sítios antipodais do parasito (Figura 25). Essa distribuição dava-se de 2 formas diferentes: apenas no núcleo (Figura 25A), ou no núcleo e nos sítios antipodais (Figura 25 B e C). Os sítios antipodais são regiões de multiplicação do material genético do cinetoplasto, que ficam localizados lateralmente à mitocôndria. Assim, pode-se considerar que *TcMYH* distribui-se no núcleo e na mitocôndria de *T. cruzi*, o que corrobora os resultados de predição.



**Figura 25: Localização subcelular de TcMYH.** Epimastigotas de CL Brener foram transfectadas com vetor vazio (dado não mostrado) ou com pTREX\_*TcMYH*. Os parasitos foram fixados com paraformaldeído e incubados com DAPI, a fim de corar o material genético dos mesmos. As lâminas montadas com estas células foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti. As imagens foram analisadas com os softwares ImageJ e NIS Elements. **A)** *TcMYH\_GFP* colocaliza com a marcação do núcleo de *T. cruzi*. **B)** *TcMYH\_GFP* presente nos sítios antipodais (pontos imediatamente externos à mitocôndria) e no núcleo de *T. cruzi*. **C)** *TcMYH\_GFP* presente em um dos dois sítios antipodais e no núcleo de *T. cruzi*. *TcMYH\_GFP* (**A**): proteína *TcMYH* em fusão com GFP; DAPI (**B**): marcação do núcleo (**N**) e da mitocôndria (cinetoplasto – **K**); DIC (**C**): contraste de interferência diferencial; Merge (**D**): sobreposição das imagens com marcação com GFP e com DAPI. Barra de escala: 5 µm.

## 5. DISCUSSÃO

---

O sistema GO é um importante mecanismo para a manutenção da integridade do material genético em diversos organismos. Isso pode ser comprovado tanto pela conservação das sequências das enzimas deste sistema em diferentes linhagens (Jansson et al., 2010), quanto pela conservação da função destas enzimas (Takao et al., 1999; Verjat et al., 2000; Chung et al., 2001; Morales-Ruiz et al., 2003; Bai et al., 2005; Ali et al., 2008).

A anotação do genoma da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, em 2005, por El-Sayed e colaboradores, mostrou que este parasito possui homólogos de FPG (OGG1) e MutY de *Escherichia coli*. Um homólogo de MutT não foi anotado, mas estudos posteriores de nosso grupo de pesquisa confirmaram a existência de MTH em *T. cruzi* (Aguiar et al., 2013). O trabalho apresentado nesta dissertação focou nos estudos da 8-oxoguanina DNA glicosilase e da MutY DNA glicosilase de *T. cruzi* (TcOGG1 e TcMYH), dada a importância destas glicosilases para a manutenção do genoma, bem como pela possibilidade de serem mecanismos geradores de variabilidade no parasito.

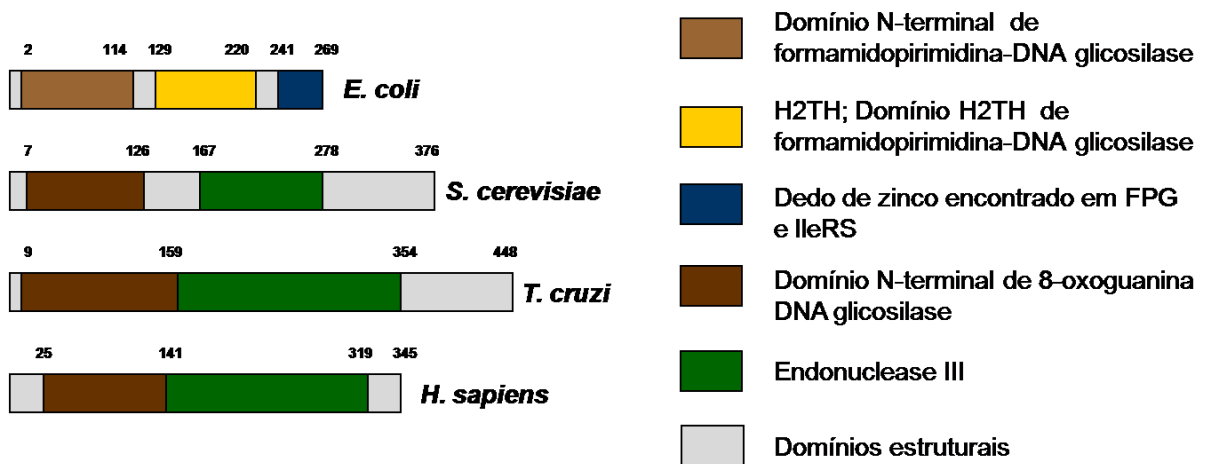
Foram feitos alinhamentos de TcOGG1 e de TcMYH com as sequências protéicas de outras espécies (Furtado et al., 2012 e Figura 16). Para ambas as enzimas, observou-se uma considerável conservação, principalmente dos resíduos de aminoácidos que fazem parte dos sítios catalíticos e de domínios funcionais, como o motivo  $\alpha$ -helix-hairpin- $\alpha$ -helix-Gly/Pro-Asp, característico da família HhH-GPD/K de DNA glicosilases e AP liases, na qual OGG1 e MutY estão inseridas (Jansson et al., 2010; Jacobs & Schär, 2012).

Uma vez que as sequências proteicas de TcOGG1 e TcMYH mostraram-se conservadas, foi testado se as proteínas codificadas pelas sequências anotadas possuiriam as funções de 8-oxoguanina DNA glicosilase e MutY DNA glicosilase, respectivamente. Para responder a essa pergunta, foram feitos estudos utilizando fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener (Figura 17, para TcMYH), com modelos celulares bacterianos, leveduriformes e tripanossomatídicos, além de estudos *in vitro*. Os estudos com TcOGG1 foram iniciados pela aluna Carolina Furtado, em sua tese de doutorado (2009), e continuados neste trabalho.

Primeiramente, foram realizados ensaios em modelos bacterianos. Para *TcOGG1*, não foi possível trabalhar com *E. coli*, uma vez que a expressão deste gene nesta espécie foi tóxica (Figura 6). Para *TcMYH*, a expressão em *E. coli* não foi tóxica, provavelmente devido ao fato de que as enzimas MutY de ambas as espécies possuem alto grau de conservação, principalmente em sítios funcionais (Figura 16). Desse modo, foram feitos ensaios de mutação com rifampicina para *TcMYH*. Este ensaio é baseado no fato de que a rifampicina liga-se à subunidade rpoB da RNA polimerase, impedindo o crescimento das bactérias. Caso estas possuam alguma mutação em *rpoB*, são capazes de crescerem em meio com rifampicina (Tajiri et al., 1995; Régis-da-silva, 2002; Pope et al., 2008). Assim, foram utilizadas bactérias deficientes em *MutY* (BH980), que possuem altas taxas de mutação, e inseriu-se *TcMYH* nestas células, a fim de observar o efeito da expressão deste gene. Foi visto que a expressão de *TcMYH* reduziu as taxas de mutação a níveis próximos aos da célula selvagem (AB1157, Figura 19), isto é, *TcMYH* complementou BH980. Este tipo de ensaio é largamente utilizado e validado (Tajiri et al., 1995; Pope et al., 2008; Schaaper & Mathews, 2013), portanto, o resultado obtido é um forte indício de que *TcMYH* possui atividade de MutY.

Com a impossibilidade da realização de ensaios de complementação funcional heteróloga em bactérias para o gene *TcOGG1*, prosseguiu-se para o modelo fúngico, mais especificamente para *Saccharomyces cerevisiae*, na qual a expressão deste gene não foi tóxica (Figura 9). Esta ausência de toxicidade possivelmente deve-se ao fato de *S. cerevisiae* ser eucariota como *T. cruzi*, possuindo mecanismos de processamento pós-traducionais mais similares aos do parasito, em comparação com a procariota *E. coli*. Esta inexistência de toxicidade também pode ser explicada pela maior semelhança entre as proteínas OGG1 de *T. cruzi* e de *S. cerevisiae*, em relação à proteína Fpg de bactéria (Figura 26), resultando em interações mais específicas entre as várias proteínas do reparo.

No ensaio de mutação de lisina, se *TcOGG1* possuísse atividade de 8-oxoguanina DNA glicosilase, esperava-se que fosse capaz de reduzir as taxas de mutantes Lis<sup>+</sup> das leveduras *ogg1*<sup>-</sup>, pois há estudos que relatam que a expressão de OGG1 de outras espécies, que já tiveram esta proteína bem caracterizada, diminuiu o nível de mutações em diferentes tipos celulares (Michaels & Miller, 1992; Laval, 1994; Thomas et al., 1997; Glassner et al., 1998; Dahle et al., 2008). *OGG1* de *T. cruzi*



**Figura 26: Comparação entre os domínios das proteínas Fpg de *E. coli* e OGG1 de *S. cerevisiae*, *T. cruzi* e *H. sapiens*.** Domínios: marrom claro – domínio N-terminal de Formamidopirimidina-DNA glicosilase; marrom escuro -- domínio N-terminal de 8-oxoguanina DNA glicosilase; verde -- Endonuclease III; amarelo -- domínio H2TH de Formamidopirimidina-DNA glicosilase; azul – dedo de zinco encontrado em FPG e IleRS. Observa-se a conservação de domínios em *S. cerevisiae*, *T. cruzi* e *H. sapiens*, mas não em *E. coli*. Números de acesso às sequências proteicas: *E. coli*: AAB18612.1; *S. cerevisiae*: AAC49312.1; *T. cruzi*: XP\_804159.1; *H. sapiens*: AAB81132.1.

levou à diminuição da frequência de mutantes em células deficientes em *OGG1* (Figuras 10 e 11), mostrando que a proteína em estudo possui atividade glicosilásica, pois os resultados estão de acordo com o esperado.

Como *TcMYH* não foi tóxica para bactérias, foi feita a expressão e a purificação desta proteína, em larga escala, em *E. coli*. A proteína purificada foi utilizada em ensaios *in vitro* utilizando oligonucleotídeos marcados com fluoresceína. Ensaios com oligonucleotídeos sintetizados são comumente utilizados para caracterizar MYH (Takao et al., 1999; Bai et al., 2005; Ali et al., 2008). Após a incubação de *TcMYH* e NaOH com os dúplexes de DNA, observou-se a presença da banda correspondente à fita quebrada apenas no dúplex GO:A (Figura 21), corroborando a função de MutY DNA glicosilase de *TcMYH*. Também é possível observar a presença de bandas de tamanhos intermediários entre a banda da fita não-clivada e a da fita clivada. Essas bandas provavelmente são resultantes da atividade de proteínas contaminantes, uma vez que a purificação de *TcMYH* não foi capaz de eliminar totalmente outras proteínas (Figura 20).

Após a análise *in silico* e a execução de experimentos em bactérias e leveduras, foram realizados ensaios com *Trypanosoma cruzi* superexpressor de *TcOGG1* e superexpressor de *TcMYH*.

A confirmação da superexpressão de *TcOGG1* em *T. cruzi* foi feita por meio de Northern Blot. Na figura 12, após a incubação com a sonda radioativa, é possível ver a banda correspondente a *TcOGG1* (aproximadamente 1,4 Kb) apenas na amostra do parasito superexpressor. Além disso, na amostra do parasito superexpressor tratado com peróxido de hidrogênio, a intensidade desta banda está aumentada. Este aumento de expressão provavelmente está relacionado ao combate dos efeitos do estresse oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além de atuar como uma enzima de reparo de DNA, OGG1 também atua como molécula sinalizadora. Em 2012, foi descrito por Boldogh e colaboradores que hOGG1 liga-se a 8-oxoG livre, em um domínio diferente do sítio ativo. O complexo hOGG1-8-oxoG atua como sinalizador, ativando pequenas GTPases, como Ras, desencadeando uma cascata de sinalização. Ademais, já foi observado que certas glicosilases, como MutY, têm sua expressão aumentada sob condições aeróbicas, em relação a condições anaeróbicas (Notley-McRobb et al., 2002). Para o superexpressor de *TcMYH*, ensaios de Real Time PCR já estão sendo preparados a fim de confirmar a superexpressão.

Com estes parasitos superexpressores foram feitas curvas de crescimento e de sobrevivência a água oxigenada e ao benzonidazol, bem como ensaios de QPCR (este último apenas para *TcOGG1*).

As curvas de crescimento (Figuras 7 e 22) mostram que não houve diferença de crescimento entre a linhagem controle e as linhagens superexpressoras (tanto de *TcOGG1* quanto de *TcMYH*).

A curva de sobrevivência de *Trypanosoma cruzi* após exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou que células superexpressoras de *TcMYH* foram mais sensíveis a este tratamento do que células selvagens (Figura 23), com um resultado similar ao obtido para *TcOGG1* (Figura 7). Não há relatos sobre efeitos citotóxicos resultantes da expressão de MutY, exceto em situações de estresse oxidativo intenso (Oka & Nakabeppu, 2011; Sheng et al., 2012).

A maior sensibilização a agentes exógenos é comum em células que superexpressam glicosilases (Kaasen et al., 1986; Coquerelle et al., 1995; Frosina, 2000; Fishel et al., 2003; Rinne et al., 2005; Ondovcik et al., 2013), sendo o resultado por nós obtido um indício de que a superexpressão de uma glicosilase que remove danos oxidativos está ocorrendo no clone de *T. cruzi* transfectado com pROCK\_*TcMYH*. Este fenótipo observado em células superexpressoras foi atribuído ao desequilíbrio na via do BER (Glassner et al., 1998b; Posnick & Samson, 1999; Oka & Nakabeppu, 2011), isto é, como apenas a glicosilase está sendo superexpressa, não sendo esta superexpressão estendida às demais proteínas que participam do reparo, lesões intermediárias do processo de reparo, como sítios AP, são produzidas e permanecem no DNA, alterando a resposta ao agente exógeno. Portanto, a morte acentuada da população transfectada com *TcMYH* quando submetida a estresse oxidativo pode ser explicada pelo processamento insuficiente do excesso de intermediários (sítios AP, quebras de fita simples (SSBs) com terminais bloqueados e quebras de fita duplas (DSBs)) gerado pelos altos níveis de *TcMYH* em uma situação onde o substrato não é limitante. Também há a questão de que MYH pode atuar como sinalizadora de morte celular (Markkanen et al., 2013). Um modelo descreve essa função, no qual o reparo por MYH gera quebras simples de fitas de DNA, o que leva à sinalização para morte celular por vias dependentes de PARP ou de calpaína, tornando essas SSBs tóxicas, principalmente em ocasiões de explosão oxidativa. Assim, esse modelo descreve porque em condições de estresse oxidativo intenso a

ausência de MYH é benéfica para a sobrevivência das células (Oka & Nakabeppu, 2011). Seguindo esta linha de raciocínio, tem sido sugerido um papel de *hMYH* na disfunção mitocondrial da doença de Parkinson (Fukae et al., 2007; Nakabeppu et al., 2007). Entretanto, ainda não foi esclarecido como MYH é capaz de iniciar a apoptose em algumas circunstâncias, enquanto que em outras protege da apoptose.

A fim de testar a hipótese de que o acúmulo de intermediários do BER leva ao fenótipo de menor resistência a peróxido de hidrogênio, foram feitos ensaios de QPCR para a linhagem superexpressora de *TcOGG1*. No ensaio de QPCR, os níveis de lesões no DNA podem ser medidos através da quantificação de amplificação de uma dada amostra. Quanto mais lesões a amostra tiver, menor será a amplificação, pois a polimerase não será capaz de sintetizar frente a essas lesões. Os resultados obtidos para o DNA nuclear de superexpressores de *TcOGG1* (Figura 14), que apresentou maiores níveis de lesão do que o controle, quando tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, corrobora a hipótese de que o acúmulo de intermediários do BER que leva à maior sensibilidade dos superexpressores. Entretanto, os níveis de lesões no DNA mitocondrial após tratamento mostraram-se reduzidos no superexpressor, em relação ao controle. Isto pode ocorrer porque a superexpressão de *TcOGG1* provavelmente não leva ao desacoplamento do BER no kDNA. Os experimentos de localização mostram uma redução da quantidade de *TcOGG1* na mitocôndria do parasito, quando comparada à quantidade presente no núcleo (Figura 15). Além disso, no cinetoplasto de *T. cruzi* há quantidades relativamente altas de DNA polimerase  $\beta$  (Lopes et al., 2008) e das ligases  $\alpha$  e  $\beta$  (Downey et al., 2005). Assim, mesmo com mais *TcOGG1* presente na mitocôndria, como há também maior quantidade das proteínas que atuam após ela no BER, não ocorre desacoplamento e grande parte das lesões consegue ser reparada. Também há a possibilidade de que outras vias de reparo estejam atuando conjuntamente com o BER na mitocôndria para o reparo de lesões oxidativas. Thomas e colaboradores (2007) sugeriram que o *Trypanosoma cruzi* apresenta altas taxas de recombinação do kDNA. Ademais, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (Rajão et al., 2009) mostraram que *T. cruzi* utiliza recombinação para reparar o DNA mitocondrial. Assim, é possível que os sítios AP e/ou as quebras de fita de DNA gerados pelo aumento da ação glicosilásica ativem o reparo por recombinação, reduzindo os níveis de lesão detectáveis pela técnica.

O benzonidazol (BZ) é um 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida), sendo uma das principais drogas usadas no tratamento da doença de Chagas. O seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas acredita-se que o BZ possa agir ligando-se a proteínas, lipídios e ao DNA (Coura & Castro, 2002; Maya et al., 2004) ou produzindo radicais livres (mas não EROs; Moreno et al., 1982; Docampo & Moreno, 1984) que levam à oxidação de componentes celulares do *T. cruzi* (Dhiman et al., 2009).

A fim de auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de BZ sobre o DNA do parasito, foram feitas curvas de sobrevivência com *T. cruzi* superexpressor de *TcOGG1* ou de *TcMYH*. Para ambas as linhagens, foi visto que o tratamento com esta droga não alterou o fenótipo do parasito, sendo similares os resultados obtidos para as linhagens superexpressoras e para a célula controle (Figuras 13 e 24). Essa similaridade de resposta provavelmente deve-se à pequena quantidade de 8-oxoguanina gerada na molécula de DNA por BZ, ou até mesmo pela atuação de outro mecanismo de reparo sobre a 8-oxoguanina gerada por BZ, como o reparo de erro de pareamento (MMR) e recombinação homóloga (HR) (Rajão et al., *in press*). Também há a possibilidade de que a oxidação do pool de nucleotídeos atue, até certo ponto, como uma barreira de proteção à oxidação do DNA, uma vez que a superexpressão de *TcMTH* (homólogo de MutT) levou ao aumento da sobrevivência de *T. cruzi* a BZ e reduziu os níveis de 8-oxoguanina no DNA do parasito tratado com esta droga, em relação ao controle (Rajão et al., *in press*). Estudos já mostraram que as quantidades relativas de 8-oxoguanina e 2-hidroxiadenina produzidas por EROs são maiores em dNTPs livres do que no DNA genômico (Mo et al., 1992; Kamiya & Kasai, 1995). Além disso, recentemente foi demonstrado que quantidades elevadas de EROs em bactérias levam à morte celular predominantemente pela oxidação de guanina do pool nucleotídico (Foti et al., 2012). Assim, os resultados obtidos sugerem que o benzonidazol oxida preferencialmente o pool nucleotídico de *Trypanosoma cruzi*.

As localizações de *TcOGG1* e de *TcMYH*, feitas a partir da expressão destas proteínas em fusão com GFP, mostrou que ambas as proteínas de *T. cruzi* estão presentes no núcleo e na mitocôndria do parasito (Figuras 15 e 25). Em relação a *TcOGG1*, isto condiz com os dados obtidos no experimento de medição dos níveis de 8-oxoG (Figura 8), bem como com o que já foi descrito na literatura para a localização intracelular de OGG1 de outros organismos (Takao et al., 1998; Bohr et al., 1998;

Nishioka et al., 1999; Bohr, 2002; Conlon et al., 2003) e com a predição de localização subcelular (Figura 15). Quanto a *TcMYH*, a localização condiz com a predição de exportação, de aproximadamente 60% para ambos os compartimentos celulares, bem como com a localização em outras espécies (Takao et al., 1999; Ichinoe et al., 2004; Markkanen et al., 2013).

A distribuição intracelular simultânea para o núcleo e para a mitocôndria de glicosilases deve-se à existência de uma única proteína que pode ser transportada para ambos os compartimentos celulares, ou pela presença de diferentes isoformas da proteína. Estas variantes podem ser geradas por *splicing* alternativo ou por sítios de iniciação de transcrição divergentes, sendo que estas isoformas possuem diferentes sinais de endereçamento (nuclear ou mitocondrial) (Takao et al., 1999; Dianov et al., 2001; Nakabeppu, 2001; Maynard et al., 2009). Para OGG1 e MYH, sabe-se que as proteínas humanas encaixam-se no último caso, tendo sido descritas duas isoformas de cada:  $\alpha$ -hOGG1 e hMYH tipo 2, que são nucleares, e  $\beta$ -hOGG1 e hMYH tipo 1, que são mitocondriais (Nishioka et al., 1999; Takao et al., 1999). As sequências de *TcOGG1* e *TcMYH* utilizadas em nossos experimentos possuem sequências de endereçamento nuclear e mitocondrial (Figura 15 e dado não mostrado), o que indica que possivelmente seja apenas uma única forma das proteínas que tenha ação nos dois compartimentos celulares. Além disso, para *TcOGG1*, a geração de fluorescência mais intensa no núcleo possivelmente deve-se ao maior direcionamento da proteína para este compartimento celular (probabilidade de exportação nuclear de 61% com o programa NucPred, Brameier *et al.*, 2007) do que para a mitocôndria (probabilidade de 34%, predita pelo software MitoProt, Claros & Vincens, 1996). A localização de *TcMYH* nos sítios antipodais de *Trypanosoma cruzi* está relacionada à fase do ciclo celular na qual MutY (ou seus homólogos) atua. Como a formação do par de bases GO.A só é possível com a replicação do DNA, MutY age apenas depois desta replicação (Hayashi et al., 2002; Oka & Nakabeppu, 2011). Boldogh e colaboradores (2001) reportaram que a isoforma nuclear de hMYH colocalizou com BrdU (análogo de timidina utilizado para a detecção de células proliferativas) e com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e, assim como PCNA, seus níveis aumentaram entre 3 e 4 vezes durante a fase S, em relação à fase G1, enquanto que os níveis de hOGG1 e da isoforma mitocondrial de hMYH não mudaram durante o ciclo celular. Estes estudos sugerem que MYH é direcionada para

a forquilha de replicação para assegurar que sua atividade ocorra na fita de DNA recém-sintetizada. Também foi descrito que a interação de *hMYH* com PCNA é crítica para a atividade da glicosilase (Hayashi et al., 2002). Estes dados corroboram a associação da função de MYH com a replicação celular. Os sítios antipodais são pontos adjacentes ao kDNA de *T. cruzi*, onde ocorre a duplicação dos minicírculos (Schamber-Reis et al., 2012). Assim, a localização de *TcMYH* nestes locais ocorre durante, ou após, a fase S. Como os parasitos utilizados no experimento de localização não estavam sincronizados no ciclo celular, alguns apresentavam marcação nos sítios antipodais, enquanto outros não (Figura 25).

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que o *Trypanosoma cruzi* possui ortólogos de OGG1 DNA glicosilase e de MutY DNA glicosilase. Essas enzimas atuam no reparo por excisão de bases (BER) do parasito, tanto no DNA nuclear, quanto no DNA mitocondrial. Mais estudos serão necessários para a conclusão da caracterização destas proteínas, como a medição dos níveis de sítios AP na linhagem superexpressora de *TcMYH* e ensaios de infectividade em macrófagos utilizando as linhagens de *T. cruzi* superexpressoras de *TcOGG1* e de *TcMYH*.

## 6. REFERÊNCIAS

---

Aboussekhra, A., R. Chanet, A. Adjiri and F. Fabre (1992). "Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins." Mol Cell Biol **12**(7): 3224-3234.

Aguiar, P. H., C. Furtado, B. M. Repoles, G. A. Ribeiro, I. C. Mendes, E. F. Peloso, F. R. Gadelha, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. D. Pena, S. M. Teixeira, L. Q. Vieira, A. A. Guarneri, L. O. Andrade and C. R. Machado (2013). "Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability." PLoS Negl Trop Dis **7**(6): e2279.

Akiyama, M., T. Horiuchi and M. Sekiguchi (1987). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the mutT mutator of *Escherichia coli* that causes A:T to C:G transversion." Mol Gen Genet **206**(1): 9-16.

Ali, M., H. Kim, S. Cleary, C. Cupples, S. Gallinger and R. Bristow (2008). "Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer." Gastroenterology **135**(2): 499-507.

Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (1999). "Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice." Mol Biochem Parasitol **100**(2): 163-172.

Apt, W. (2010). "Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease." Drug Des Devel Ther **4**: 243-253.

Ausubel, F. M. Current protocols in molecular biology. Brooklyn, N. Y., Greene Publishing Associates ; Media.

Bachmann, B. J. (1972). "Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12." Bacteriol Rev **36**(4): 525-557.

Bai, H., S. Jones, X. Guan, T. M. Wilson, J. R. Sampson, J. P. Cheadle and A. L. Lu (2005). "Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis." Nucleic Acids Res **33**(2): 597-604.

Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?" Parasitol Today **15**(1): 22-28.

Bohr, V., R. M. Anson, S. Mazur and G. Dianov (1998). "Oxidative DNA damage processing and changes with aging." Toxicol Lett **102-103**: 47-52.

Bohr, V. A., T. Stevnsner and N. C. de Souza-Pinto (2002). "Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells." Gene **286**(1): 127-134.

Boiteux, S., T. R. O'Connor and J. Laval (1987). "Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein." EMBO J **6**(10): 3177-3183.

Boldogh, I., G. Hajas, L. Aguilera-Aguirre, M. L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsi, S. Sur, T. K. Hazra and S. Mitra (2012). "Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine." J Biol Chem **287**(25): 20769-20773.

Boldogh, I., D. Milligan, M. S. Lee, H. Bassett, R. S. Lloyd and A. K. McCullough (2001). "hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs." Nucleic Acids Res **29**(13): 2802-2809.

Boveris, A., L. B. Valdez, T. Zaobornyj and J. Bustamante (2006). "Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 535-542.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brameier, M., A. Krings and R. M. MacCallum (2007). "NucPred--predicting nuclear localization of proteins." Bioinformatics **23**(9): 1159-1160.

Brinkmeyer, M. K., M. A. Pope and S. S. David (2012). "Catalytic contributions of key residues in the adenine glycosylase MutY revealed by pH-dependent kinetics and cellular repair assays." Chem Biol **19**(2): 276-286.

Camargo, E. P. (1964). "Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **6**: 93-100.

Campos, P. C., V. G. Silva, C. Furtado, A. Machado-Silva, W. D. Darocha, E. F. Peloso, F. R. Gadelha, M. H. Medeiros, C. Lana Gde, Y. Chen, R. L. Barnes, D. G. Passos-Silva, R. McCulloch, C. R. Machado and S. M. Teixeira (2011). "*Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response." Mol Biochem Parasitol **176**(1): 8-16.

Chung, J. H., M. J. Suh, Y. I. Park, J. A. Tainer and Y. S. Han (2001). "Repair activities of 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Archaeoglobus fulgidus*, a hyperthermophilic archaeon." Mutat Res **486**(2): 99-111.

Claros, M. G. and P. Vincens (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." Eur J Biochem **241**(3): 779-786.

Conlon, K. A., D. O. Zharkov and M. Berrios (2003). "Immunofluorescent localization of the murine 8-oxoguanine DNA glycosylase (mOGG1) in cells growing under normal and nutrient deprivation conditions." DNA Repair (Amst) **2**(12): 1337-1352.

Coquerelle, T., J. Dosch and B. Kaina (1995). "Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the

production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair." Mutat Res **336**(1): 9-17.

Corpet, F. (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." Nucleic Acids Res **16**(22): 10881-10890.

Coura, J. R., A. C. Junqueira, O. Fernandes, S. A. Valente and M. A. Miles (2002). "Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil." Trends Parasitol **18**(4): 171-176.

Cupples, C. G. and J. H. Miller (1989). "A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5345-5349.

Dahle, J., G. Brunborg, D. H. Svendsrud, T. Stokke and E. Kvam (2008). "Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis." Cancer Lett **267**(1): 18-25.

DaRocha, W. D., R. A. Silva, D. C. Bartholomeu, S. F. Pires, J. M. Freitas, A. M. Macedo, M. P. Vazquez, M. J. Levin and S. M. Teixeira (2004). "Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols." Parasitol Res **92**(2): 113-120.

David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." Nature **447**(7147): 941-950.

de Moura, M. B., B. L. Schamber-Reis, D. G. Passos Silva, M. A. Rajao, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2009). "Cloning and characterization of DNA polymerase eta from Trypanosoma cruzi: roles for translesion bypass of oxidative damage." Environ Mol Mutagen **50**(5): 375-386.

Dhiman, M., J. G. Estrada-Franco, J. M. Pando, F. J. Ramirez-Aguilar, H. Spratt, S. Vazquez-Corzo, G. Perez-Molina, R. Gallegos-Sandoval, R. Moreno and N. J. Garg (2009). "Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease." Clin Vaccine Immunol **16**(5): 660-666.

Dianov, G. L., N. Souza-Pinto, S. G. Nyaga, T. Thybo, T. Stevnsner and V. A. Bohr (2001). "Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **68**: 285-297.

Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu and H. Rodriguez (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." Free Radic Biol Med **32**(11): 1102-1115.

Docampo, R. and S. N. Moreno (1984). "Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi." Rev Infect Dis **6**(2): 223-238.

Downey, N., J. C. Hines, K. M. Sinha and D. S. Ray (2005). "Mitochondrial DNA ligases of Trypanosoma brucei." Eukaryot Cell **4**(4): 765-774.

El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart and B. Andersson (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.

Ercal, N., H. Gurer-Orhan and N. Aykin-Burns (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." Curr Top Med Chem **1**(6): 529-539.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.

Fishel, M. L., Y. R. Seo, M. L. Smith and M. R. Kelley (2003). "Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing." Cancer Res **63**(3): 608-615.

Flohe, L. (2012). "The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases." Biotechnol Adv **30**(1): 294-301.

Foti, J. J., B. Devadoss, J. A. Winkler, J. J. Collins and G. C. Walker (2012). "Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics." Science **336**(6079): 315-319.

Friedberg, E. C. (2003). "DNA damage and repair." Nature **421**(6921): 436-440.

Fromme, J. C. and G. L. Verdine (2004). "Base excision repair." Adv Protein Chem **69**: 1-41.

Frosina, G. (2000). "Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA." Eur J Biochem **267**(8): 2135-2149.

Fry, R. C., T. J. Begley and L. D. Samson (2005). "Genome-wide responses to DNA-damaging agents." Annu Rev Microbiol **59**: 357-377.

Fukae, J., Y. Mizuno and N. Hattori (2007). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." Mitochondrion **7**(1-2): 58-62.

Furtado, C. (2009). Reparo de DNA em dois patógenos humanos: Caracterização do gene IMP4 de *Schistosoma mansoni* e Estudos acerca do MMR, Sistema GO e Taxa

de Mutação em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Furtado, C., M. Kunrath-Lima, M. A. Rajao, I. C. Mendes, M. B. de Moura, P. C. Campos, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. D. Pena, S. M. Teixeira, B. Van Houten and C. R. Machado (2012). "Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*." PLoS One **7**(8): e42484.

Garcia, E. S., F. A. Genta, P. de Azambuja and G. A. Schaub (2010). "Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*." Trends Parasitol **26**(10): 499-505.

Gasche, C., C. L. Chang, J. Rhee, A. Goel and C. R. Boland (2001). "Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells." Cancer Res **61**(20): 7444-7448.

Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.

Glassner, B. J., L. M. Posnick and L. D. Samson (1998). "The influence of DNA glycosylases on spontaneous mutation." Mutat Res **400**(1-2): 33-44.

Glassner, B. J., L. J. Rasmussen, M. T. Najarian, L. M. Posnick and L. D. Samson (1998). "Generation of a strong mutator phenotype in yeast by imbalanced base excision repair." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 9997-10002.

Gupta, S., J. J. Wen and N. J. Garg (2009). "Oxidative Stress in Chagas Disease." Interdiscip Perspect Infect Dis **2009**: 190354.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Hayashi, H., Y. Tominaga, S. Hirano, A. E. McKenna, Y. Nakabeppu and Y. Matsumoto (2002). "Replication-associated repair of adenine:8-oxoguanine mispairs by MYH." Curr Biol **12**(4): 335-339.

Hill, J. W., T. K. Hazra, T. Izumi and S. Mitra (2001). "Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair." Nucleic Acids Res **29**(2): 430-438.

Hitomi, K., S. Iwai and J. A. Tainer (2007). "The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair." DNA Repair (Amst) **6**(4): 410-428.

Hoeijmakers, J. H. (2009). "DNA damage, aging, and cancer." N Engl J Med **361**(15): 1475-1485.

Hofmann, K. and Baron, M. (1992). "BOXSHADE Interface." Disponível em: <[http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)>.

Hotez, P. J., E. Dumonteil, L. Woc-Colburn, J. A. Serpa, S. Bezek, M. S. Edwards, C. J. Hallmark, L. W. Musselwhite, B. J. Flink and M. E. Bottazzi (2012). "Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". " PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1498.

Ichinoe, A., M. Behmanesh, Y. Tominaga, Y. Ushijima, S. Hirano, Y. Sakai, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, N. Wake and Y. Nakabeppu (2004). "Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts." Nucleic Acids Res **32**(2): 477-487.

Irigoin, F., L. Cibils, M. A. Comini, S. R. Wilkinson, L. Flohe and R. Radi (2008). "Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification." Free Radic Biol Med **45**(6): 733-742.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.

Jacobs, A. L. and P. Schar (2012). "DNA glycosylases: in DNA repair and beyond." Chromosoma **121**(1): 1-20.

Jansson, K., A. Blomberg, P. Sunnerhagen and M. Alm Rosenblad (2010). "Evolutionary loss of 8-oxo-G repair components among eukaryotes." Genome Integr **1**(1): 12.

Kaasen, I., G. Evensen and E. Seeberg (1986). "Amplified expression of the tag+ and alkA+ genes in *Escherichia coli*: identification of gene products and effects on alkylation resistance." J Bacteriol **168**(2): 642-647.

Kamiya, H. and H. Kasai (1995). "Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation." J Biol Chem **270**(33): 19446-19450.

Kawanishi, S., Y. Hiraku, S. Pinlaor and N. Ma (2006). "Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis." Biol Chem **387**(4): 365-372.

Kim, Y. J. and D. M. Wilson, 3rd (2012). "Overview of base excision repair biochemistry." Curr Mol Pharmacol **5**(1): 3-13.

Klaunig, J. E. and L. M. Kamendulis (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 239-267.

Klungland, A., I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl and D. E. Barnes (1999). "Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13300-13305.

Laval, F. (1994). "Expression of the *E. coli* fpg gene in mammalian cells reduces the mutagenicity of gamma-rays." Nucleic Acids Res **22**(23): 4943-4946.

Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.

Lindahl, T. and D. E. Barnes (2000). "Repair of endogenous DNA damage." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **65**: 127-133.

Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." Science **286**(5446): 1897-1905.

Lopes Dde, O., B. L. Chamber-Reis, C. G. Regis-da-Silva, M. A. Rajao, W. D. Darocha, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. C. Nardelli, S. Schenkman, J. S. Hoffmann, C. Cazaux, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2008). "Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance." DNA Repair (Amst) **7**(11): 1882-1892.

Lu, A. L., H. Bai, G. Shi and D. Y. Chang (2006). "MutY and MutY homologs (MYH) in genome maintenance." Front Biosci **11**: 3062-3080.

Macedo, A. M., C. R. Machado, R. P. Oliveira and S. D. Pena (2004). "*Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(1): 1-12.

Machado-Silva, A., S. M. Teixeira, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, R. McCulloch and C. R. Machado (2008). "Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage." Gene **411**(1-2): 19-26.

Maki, H. and M. Sekiguchi (1992). "MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis." Nature **355**(6357): 273-275.

Marchler-Bauer, A., C. Zheng, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang and S. H. Bryant (2013). "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D348-352.

Markkanen, E., J. Dorn and U. Hubscher (2013). "MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA." Front Genet **4**: 18.

Maya, J. D., M. Orellana, J. Ferreira, U. Kemmerling, R. Lopez-Munoz and A. Morello (2010). "Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy." Biol Res **43**(3): 323-331.

Maya, J. D., A. Rodriguez, L. Pino, A. Pabon, J. Ferreira, M. Pavani, Y. Repetto and A. Morello (2004). "Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*." Biol Res **37**(1): 61-69.

Maynard, S., S. H. Schurman, C. Harboe, N. C. de Souza-Pinto and V. A. Bohr (2009). "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging." Carcinogenesis **30**(1): 2-10.

Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman and J. H. Miller (1992). "Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7022-7025.

Michaels, M. L. and J. H. Miller (1992). "The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)." J Bacteriol **174**(20): 6321-6325.

Michaels, M. L., L. Pham, Y. Nghiem, C. Cruz and J. H. Miller (1990). "MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III." Nucleic Acids Res **18**(13): 3841-3845.

Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint and J. Remacle (1994). "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress." Free Radic Biol Med **17**(3): 235-248.

Mo, J. Y., H. Maki and M. Sekiguchi (1992). "Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 11021-11025.

Morales-Ruiz, T., M. Birincioglu, P. Jaruga, H. Rodriguez, T. Roldan-Arjona and M. Dizdaroglu (2003). "Arabidopsis thaliana Ogg1 protein excises 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA containing multiple lesions." Biochemistry **42**(10): 3089-3095.

Moreno, S. N., R. Docampo, R. P. Mason, W. Leon and A. O. Stoppani (1982). "Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and Trypanosoma cruzi microsomal preparations." Arch Biochem Biophys **218**(2): 585-591.

Nakabeppu, Y. (2001). "Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **68**: 75-94.

Nakabeppu, Y., D. Tsuchimoto, H. Yamaguchi and K. Sakumi (2007). "Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease." J Neurosci Res **85**(5): 919-934.

Nghiem, Y., M. Cabrera, C. G. Cupples and J. H. Miller (1988). "The mutY gene: a mutator locus in Escherichia coli that generates G.C----T.A transversions." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(8): 2709-2713.

Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi and Y. Nakabeppu (1999). "Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs." Mol Biol Cell **10**(5): 1637-1652.

Notley-McRobb, L., R. Pinto, S. Seeto and T. Ferenci (2002). "Regulation of mutY and nature of mutator mutations in Escherichia coli populations under nutrient limitation." J Bacteriol **184**(3): 739-745.

Oka, S. and Y. Nakabeppu (2011). "DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis." Cancer Sci **102**(4): 677-682.

Ondovcik, S. L., T. J. Preston, G. P. McCallum and P. G. Wells (2013). "Expression of human oxoguanine glycosylase 1 or formamidopyrimidine glycosylase in human embryonic kidney 293 cells exacerbates methylmercury toxicity in vitro." Toxicol Appl Pharmacol **271**(1): 41-48.

Passos-Silva, D. G., M. A. Rajao, P. H. Nascimento de Aguiar, J. P. Vieira-da-Rocha, C. R. Machado and C. Furtado (2010). "Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major." J Nucleic Acids **2010**: 840768.

Piacenza, L., M. N. Alvarez, G. Peluffo and R. Radi (2009). "Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection." Curr Opin Microbiol **12**(4): 415-421.

Pope, C. F., D. M. O'Sullivan, T. D. McHugh and S. H. Gillespie (2008). "A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance." Antimicrob Agents Chemother **52**(4): 1209-1214.

Posnick, L. M. and L. D. Samson (1999). "Imbalanced base excision repair increases spontaneous mutation and alkylation sensitivity in Escherichia coli." J Bacteriol **181**(21): 6763-6771.

Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." Lancet Infect Dis **1**(2): 92-100.

Punta, M., P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman and R. D. Finn (2012). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D290-301.

Rajao, M. A., D. G. Passos-Silva, W. D. DaRocha, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2009). "DNA polymerase kappa from Trypanosoma cruzi localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate." Mol Microbiol **71**(1): 185-197.

Rajao, M. A. (2011). "Síntese Translesão e Reparo de DNA em Trypanosoma cruzi: caracterização funcional da DNA Polimerase Kappa e análise da remoção de lesões no DNA nuclear e mitocondrial". Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Rajao et al. (in press). "Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi". Environmental and Molecular Mutagenesis.

Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.

Ratcliffe, N. A., Y. Nigam, C. B. Mello, E. S. Garcia and P. Azambuja (1996). "Trypanosoma cruzi and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of Rhodnius prolixus." Exp Parasitol **83**(1): 83-93.

Regis-da-Silva, C. G., J. M. Freitas, D. G. Passos-Silva, C. Furtado, L. Augusto-Pinto, M. T. Pereira, W. D. DaRocha, G. R. Franco, A. M. Macedo, J. S. Hoffmann, C. Cazaux, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2006). "Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation." Mol Biochem Parasitol **149**(2): 191-200.

Regis-da-Silva, C. G. (2002). Clonagem e Caracterização Funcional do gene Rad51 em Trypanosoma cruzi. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Rinne, M. L., Y. He, B. F. Pachkowski, J. Nakamura and M. R. Kelley (2005). "N-methylpurine DNA glycosylase overexpression increases alkylation sensitivity by rapidly removing non-toxic 7-methylguanine adducts." Nucleic Acids Res **33**(9): 2859-2867.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

Santos, J. H., J. N. Meyer, B. S. Mandavilli and B. Van Houten (2006). "Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells." Methods Mol Biol **314**: 183-199.

Schaaper, R. M. and C. K. Mathews (2013). "Mutational consequences of dNTP pool imbalances in E. coli." DNA Repair (Amst) **12**(1): 73-79.

Schamber-Reis, B. L., S. Nardelli, C. G. Regis-Silva, P. C. Campos, P. G. Cerqueira, S. A. Lima, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, C. Cazaux, J. S. Hoffmann, M. C. Motta, S. Schenkman, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2012). "DNA polymerase beta from Trypanosoma cruzi is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions." Mol Biochem Parasitol **183**(2): 122-131.

Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.

Schofield, M. J. and P. Hsieh (2003). "DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function." Annu Rev Microbiol **57**: 579-608.

Sepulveda, S., L. Valenzuela, I. Ponce, S. Sierra, P. Bahamondes, S. Ramirez, V. Rojas, U. Kemmerling, N. Galanti and G. Cabrera (2013). "Expression, functionality and localization of apurinic/aprimidinic endonucleases in replicative and non-replicative forms of *Trypanosoma cruzi*." J Cell Biochem.

Sheng, Z., S. Oka, D. Tsuchimoto, N. Abolhassani, H. Nomaru, K. Sakumi, H. Yamada and Y. Nakabeppu (2012). "8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair." J Clin Invest **122**(12): 4344-4361.

Storr, S. J., C. M. Woolston, Y. Zhang and S. G. Martin (2013). "Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage." Antioxid Redox Signal **18**(18): 2399-2408.  
Svilar, D., E. M. Goellner, K. H. Almeida and R. W. Sobol (2011). "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage." Antioxid Redox Signal **14**(12): 2491-2507.

Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1995). "Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*." Mutat Res **336**(3): 257-267.

Takao, M., H. Aburatani, K. Kobayashi and A. Yasui (1998). "Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage." Nucleic Acids Res **26**(12): 2917-2922.

Takao, M., Q. M. Zhang, S. Yonei and A. Yasui (1999). "Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase." Nucleic Acids Res **27**(18): 3638-3644.

Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura (1991). "8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4690-4694.

Thomas, D., A. D. Scot, R. Barbey, M. Padula and S. Boiteux (1997). "Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells." Mol Gen Genet **254**(2): 171-178.

Thomas, S., L. L. Martinez, S. J. Westenberger and N. R. Sturm (2007). "A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing." BMC Genomics **8**: 133.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.

van Loon, B., E. Markkanen and U. Hubscher (2010). "Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine." DNA Repair (Amst) **9**(6): 604-616.

Verjat, T., A. Dhenaut, J. P. Radicella and S. Araneda (2000). "Detection of 8-oxoG DNA glycosylase activity and OGG1 transcripts in the rat CNS." Mutat Res **460**(2): 127-138.

Wilson, S. H. and T. A. Kunkel (2000). "Passing the baton in base excision repair." Nat Struct Biol **7**(3): 176-178.

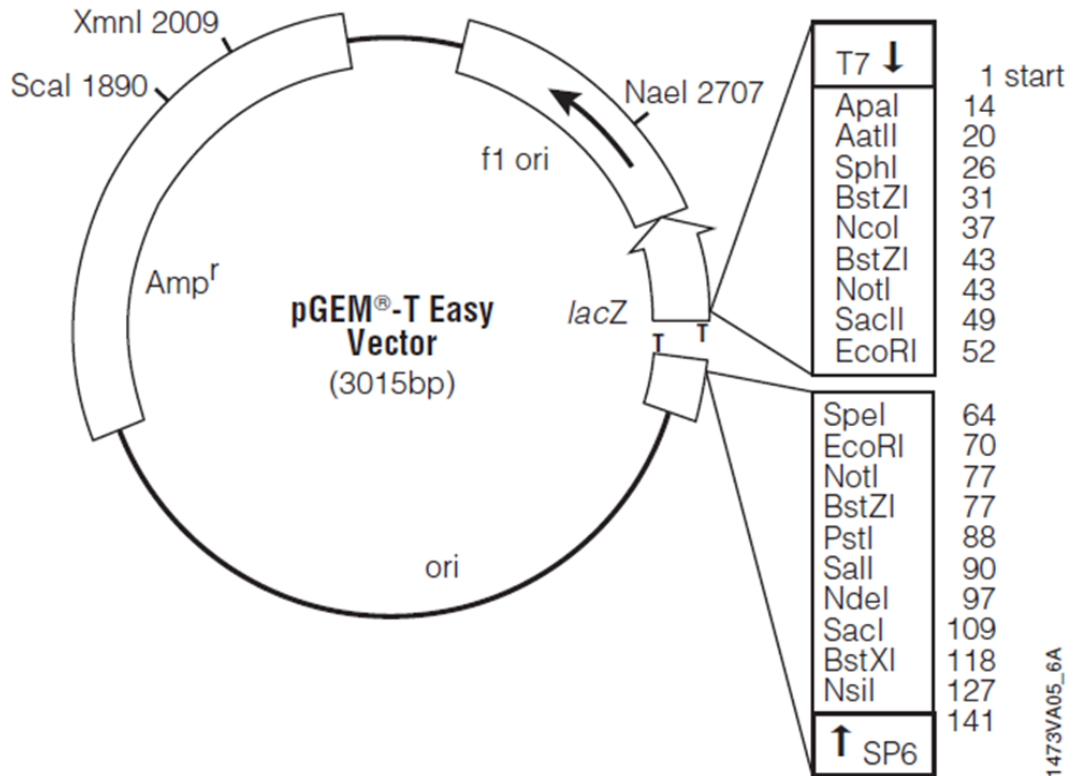
Wood, R. D., M. Mitchell and T. Lindahl (2005). "Human DNA repair genes, 2005." Mutat Res **577**(1-2): 275-283.

Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc and A. G. Schijman (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(7): 1051-1054.

## 7. ANEXOS

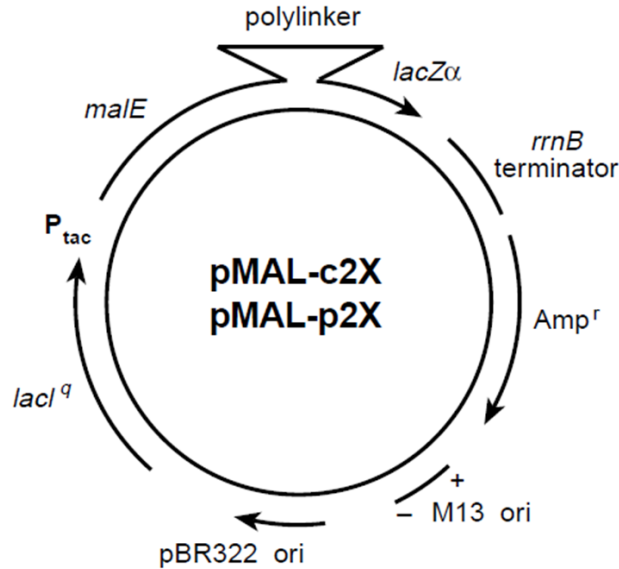
---

## 7.1. Anexo 1- pGEM<sup>®</sup>- T Easy Vector

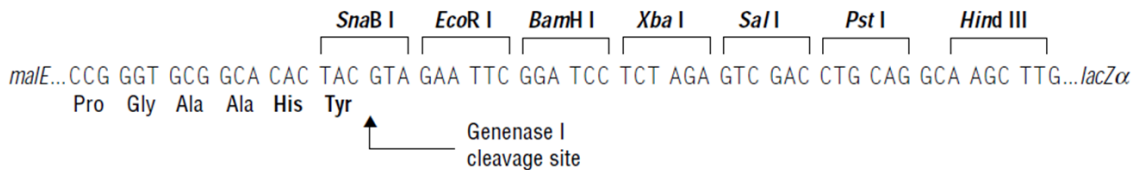


**Mapa circular do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).** Desenho esquemático do vetor pGEM-T<sup>®</sup> Easy mostrando a origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência a ampicilina (Amp<sup>R</sup>), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem,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

## 7.2. Anexo 2- pMAL-c2g

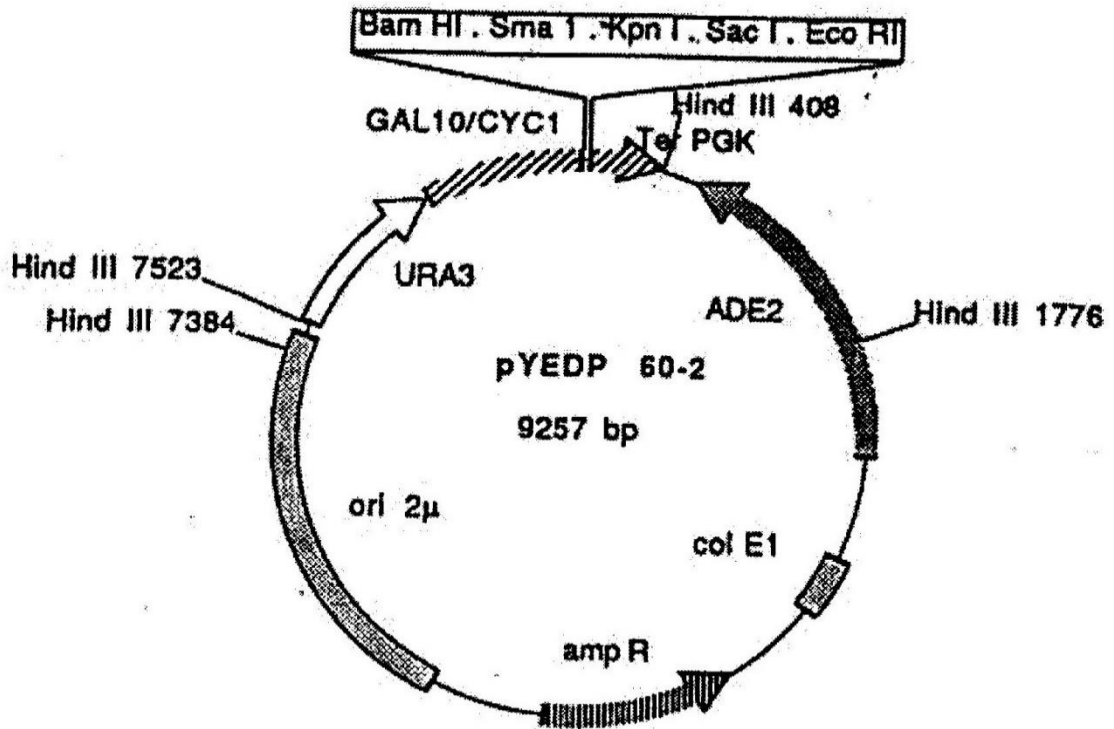


### pMAL-c2G, pMAL-p2G Polylinker



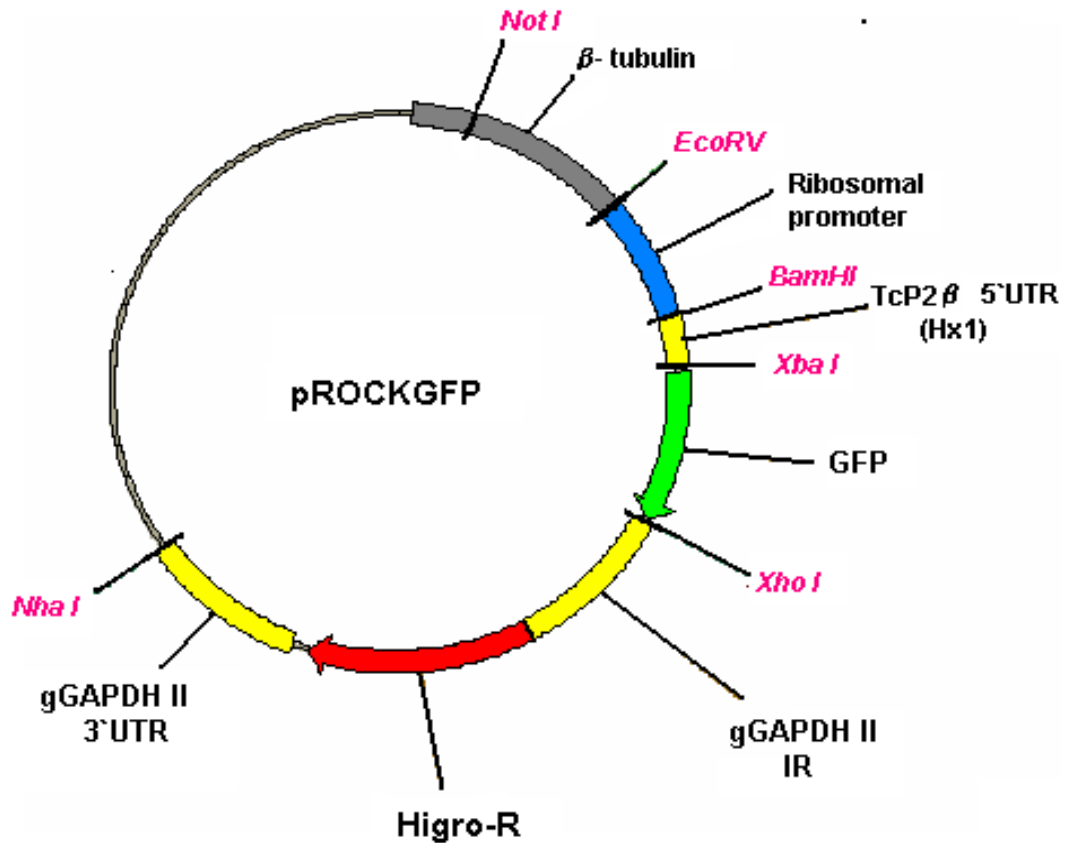
**Mapa circular genérico dos vetores pMAL-c2 e sítio múltiplo de clonagem específico do vetor pMAL-c2G.** O sítio múltiplo de clonagem está localizado entre a seqüência de *malE* (que codifica MPB) e *LacZα*, codificador da β-galactosidase. A expressão do gene de interesse em fusão com MBP é promovida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

### 7.3. Anexo 3- pYEDP



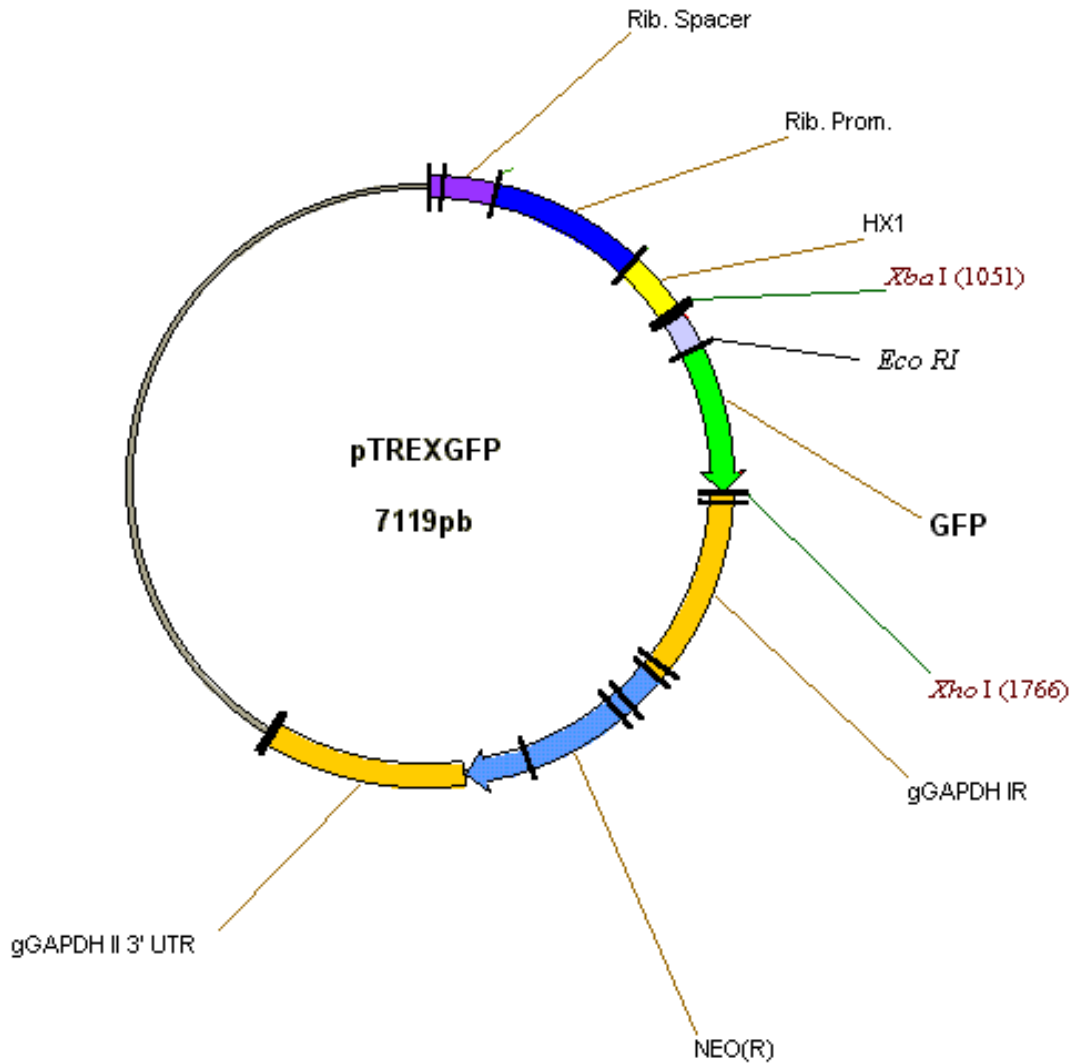
**Mapa esquemático do vetor pYEDP.** O vetor pYEDP possui um sítio múltiplo de clonagem na região 3' do promotor GAL10/CYC1, que é ativado pela presença de galactose. O plasmídeo é capaz de replicar-se em *E. coli* e em *S. cerevisiae*. Possui o gene que confere resistência a ampicilina ( $amp^R$ ) e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

## 7.4. Anexo 4- pROCKGFP



**Mapa circular do vetor pROCK-HIGRO.** Desenho esquemático do vetor pROCK-HIGRO, utilizado para expressão permanente em *T. cruzi* de um gene de interesse. O vetor possui o promotor de rRNA, que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de Hx1 (derivada da região 5'UTR de TcP2 $\beta$ ), um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*. Além disso, possui as regiões intergênicas e 3'UTR do gene GAPDH, sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do transcrito de Higo-R, que confere resistência a higromicina. A linearização do vetor com *NotI* permite a integração do vetor, através de recombinação homóloga, no *locus* de  $\beta$ -tubulina do DNA genômico do parasito. (Adaptado de DaRocha *et al.*, 2004).

## 7.5. Anexo 5- pTREXGFP



**Mapa circular do vetor pTREX-GFP.** O vetor possui o promotor de rRNA, que assegura um alto nível de transcrição e a seqüência de Hx1 (derivada da região 5' UTR de TcP2 $\beta$ ), um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*. Também possui as regiões intergênicas e 3' UTR do gene GAPDH e sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do transcrito de NEO-R, que confere resistência a neomicina. O gene de interesse é inserido nos sítios de restrição de *XbaI* e *EcoRI*, o que permite a expressão da proteína em fusão com GFP.

## **7.6. Anexo 6- Artigo publicado na revista PLoS ONE**