

Matheus Andrade Rajão

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

Orientador: Carlos Renato Machado

Co-orientadora: Santuza M. R. Teixeira

Belo Horizonte
Abril 2011

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

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

Matheus Andrade Rajão

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

Orientador: Carlos Renato Machado
Co-orientadora: Santuza M. R. Teixeira

Belo Horizonte
Abril 2011

*“A finalidade da educação é substituir a
mente vazia pela mente aberta”*

Agradecimentos

Esta tese de doutorado é a consequência da dedicação de colaboradores, colegas, amigos e familiares que contribuíram – direta ou indiretamente – para a realização deste trabalho. A seguir, tentarei enumerar todos que me auxiliaram nesta etapa do meu amadurecimento acadêmico.

Agradeço inicialmente ao meu orientador Carlos Renato (Nem) pela orientação durante todos estes anos. Suas sugestões e idéias foram cruciais para o sucesso desta tese. Agradeço pela forma respeitosa, atenciosa e paciente com a qual sempre me tratou, sempre levando em consideração o meu ponto de vista acerca de nossos resultados. Essas discussões certamente me fizeram criar a capacidade de pensar por conta própria.

À minha co-orientadora, Santuza Teixeira, pela disponibilidade e pelo auxílio nos momentos decisivos deste projeto.

Ao meu orientador durante o doutorado sanduíche, Bennett Van Houten, pelo exemplo de completa dedicação à ciência. Por me mostrar que para se chegar ao topo é preciso muito trabalho, abdicção e paixão por aquilo com o que se trabalha. E principalmente, pelas rodadas de cerveja grátis para comemorar quando saía algum resultado interessante.

Aos Professores Andrea Macedo, Glória Franco e Sérgio Pena, pelas sugestões e críticas concedidas em nossas reuniões semanais.

Ao professor Sérgio Schenkman, por permitir a realização dos experimentos de localização celular em seu microscópio óptico.

Às técnicas Neuza e Kátia, que zelam pela ordem e pela manutenção de nosso laboratório. Agradeço em especial à Katita, pelo auxílio nos experimentos realizados no ALF. Agradeço ainda as ex-técnicas Míriam, Rúbia, Camila, Carol Reis e Sabrina, por manter a estrutura necessária para a realização de nossos experimentos.

À Danielle Passos-Silva, que além de ter sido uma grande amiga, me ensinou as técnicas de extração de RNA, *Southern Blot*, *Northern Blot*, PFGE e a fazer curva de crescimento após radiação gama. Sua forma empreendedora de enxergar a pesquisa científica me acrescentou muito durante esses anos.

À Michelle Barbi, pelo apoio durante o doutorado sanduíche. Por me ajudar na adaptação ao novo laboratório e por me ensinar as técnicas de qPCR e de análise de consumo de oxigênio.

À Sheila Nardelli, pela ajuda nos experimentos de localização de proteínas do NER e do reparo de ICLs.

Aos colegas e ex-colegas do nosso “grupo de reparo de DNA”, Alice, Carlos Gustavo, Carolina Furtado, Danielle, Débora Aline, Bruno Chamber, João Pedro, Marianna Kunrath, Michelle Barbi, Pedro, Joana, Selma, Sabrina, Paula, Davi e Bruno Repolês. Agradeço pela amizade e coleguismo.

Aos demais colegas e ex-colegas do Laboratório de Genética Bioquímica, pela convivência amistosa e pelos momentos de apoio profissional. Chico Lobo, Elisângela, Grazi, Hélder, Herón, Ítalo, Leonardo Carnevalli, Lucas Secchim (#LucasFeelings), Marcela Drummond, Marcela Segatto, Mariana Costa, Michele Araújo (Mika), Pacú, Pricila Cunha, Priscila Grynberg, Thiago Mafra, Thomaz e Viviane.

Agradeço em especial à doutora Carol Furtado, meu “braço direito e esquerdo” no laboratório, pela amizade sincera, pela lealdade, pela atenção, pela discussão de resultados e por me ajudar sempre nos momentos em que mais precisei. Obrigado também por participar dos nossos happy hours e corridas de rua (#LGB_Runners). Espero que nossa amizade e colaboração científica continuem no INCA.

Ao João Pedro (Johnny), por me acompanhar durante toda esta trajetória, desde o primeiro dia de aula, passando pelo dia em que entramos juntos no laboratório, pelas horas-extras na época de iniciação científica, mestrado, doutorado, até o dia de hoje. Obrigado pela amizade, pelos happy hours, por quebrar o galho quando necessário e por tornar nosso trabalho mais divertido.

Ao Pedrão, pai de família, pela amizade, pela sensatez e maturidade dos seus conselhos. Obrigado pelo companheirismo desde os tempos de graduação. Além de ser a revelação queniana do #LGB_Runners, é um amigo que espero manter por muitos anos.

À Fernanda Kehdy (Ferdí), por ser uma amiga tão leal e por ajudar tanto nas horas em que o desespero batia. Pelas longas conversas, happy hours, almoços, e corridas na lagoa (#LGB_Runners). E pelas gargalhadas escandalosas que tornaram o LGB um laboratório muito mais divertido de se trabalhar.

À Marianna Kunrath (Mary Babys), a única aluna de iniciação que eu tive, mesmo tendo sido minha aluna apenas por um curto tempo. Ensinar a você me fez aprender mais. Obrigado pela atenção e carinho com os quais você sempre me tratou.

À Mariana Boroni (Mary Bobs), que mesmo tendo tão pouco tempo de LGB, já se tornou uma pessoa tão especial para a gente. Obrigado por ser tão amiga e companheira, e por deixar nosso dia ainda mais alegre.

À moçada do #LGB_Kart_Team, Pedrão, Leo Carnevalli, Lucas Secchim, Rodrigo Baptista, Carlos Santos, Johnny e Mika, pelos momentos de adrenalina, velocidade e competição que ajudavam a diminuir o estresse do laboratório. Obrigado por nunca me deixarem perder pra vocês.

Aos meus pais, pelo exemplo de honestidade, caráter e trabalho, e por me proporcionarem o suporte familiar e financeiro que me possibilitaram defender o doutorado. Uma vez que o retorno financeiro na carreira científica é pequeno e quando este chega, vem tarde, sem esse suporte eu não teria completado esta etapa.

Agradeço à minha família, irmãos e amigos, por serem a base sólida que me permite alcançar todas as minhas metas e objetivos.

Agradeço em especial à Isabela, por todos estes anos ao meu lado. Por ter acompanhado cada etapa do meu crescimento profissional, desde o vestibular até hoje. Por ter feito parte de tudo isso, me escutando, me incentivando, compartilhando das minhas derrotas e vitórias como se fossem suas. Obrigado pelo apoio, paciência, cumplicidade e amor.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Quadros	iii
Resumo	vi
Abstract.....	v
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.1. Replicação do genoma do <i>T. cruzi</i>	3
1.1.2. Resposta genotóxica ao parasito.....	8
1.2. Reparo de DNA	9
1.2.1. Reparo por excisão de nucleotídeos.....	11
1.2.2. Reparo por excisão de bases	13
1.2.3. Recombinação homóloga	16
1.2.4. Reparo de <i>crosslinks</i> inter-fita.....	19
1.3. Síntese translesão.....	21
1.3.1. DNA polimerases da síntese translesão.....	24
1.3.2. DNA polimerase kappa	29
2. Objetivos.....	33
3. Material e métodos.....	35
3.1. Soluções e meios utilizados	36
3.2. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.3. Extração de DNA total de <i>T. cruzi</i>	39
3.4. Amplificação por PCR para clonagem	39
3.5. Clonagens.....	41
3.6. Transformação de bactérias	42
3.7. Seleção de clones contendo o inserto e purificação de plasmídeo	43
3.8. Sequenciamento de DNA	43
3.9. Análise de seqüência e motivos protéicos	44
3.10. Expressão e purificação de MBP-TcPolk-2.....	44

3.11. Substratos para o ensaio de polimerização	45
3.12. Ensaio de polimerização	47
3.13. Transfecção de epimastigotas	47
3.14. Microscopia confocal	48
3.15. PFGE e <i>Southern blot</i>	48
3.16. Extração de RNA total e <i>Northern blot</i>	49
3.17. Hibridização e blotting	50
3.18. Tratamento com agentes genotóxicos para curvas de sobrevivência e crescimento.....	50
3.18.1. Tratamento com H ₂ O ₂	50
3.18.2. Exposição à radiação gama (g)	50
3.18.3. Tratamento com zeocina.....	51
3.18.4. Tratamento com metil metanosulfonato (MMS).....	51
3.18.5. Tratamento com benzonidazol (BZ).....	51
3.19. Análise do número de lesões por qPCR	51
3.19.1. Tratamentos genotóxicos para análise de número de lesões	51
3.19.1.1. Tratamento com MMS.....	51
3.19.1.2. Tratamento com H ₂ O ₂	52
3.19.1.3. Tratamento com cisplatina	52
3.19.2. Extração de DNA de alto peso molecular	52
3.19.3. Dosagem das amostras de DNA.....	53
3.19.4. Amplificação por qPCR	53
3.19.5. Análise dos resultados.	56
3.20. Análise do consumo de oxigênio	56
3.21. Microscopia óptica	56
4. Resultados.....	58
4.1. Análise <i>in silico</i> do gene <i>TcPOLK</i>	59
4.2. Comparação entre as duas cópias de <i>TcPOLK</i>	63
4.3. Localização celular de TcPolk-2.....	66
4.4. TcPolk-2 possui atividade de DNA polimerase	69
4.5. Obtenção de parasitos superexpressando <i>TcPOLK-2</i>	73

4.6. TcPolk-2 altera a resposta a estresse oxidativo e realiza síntese translesão	77
4.7. Investigação de um papel de TcPolk-2 na recombinação do DNA.....	80
4.8. TcPolk-2 não altera a sobrevivência do <i>T. cruzi</i> a MMS.....	85
4.9. TcPolk-2 aumenta a sobrevivência do <i>T. cruzi</i> ao BZ.....	85
4.10. Localização subcelular da outra cópia de TcPolk-2 (TcPolk-1)	88
4.11. Análise do reparo de lesões no DNA do <i>T. cruzi</i>	90
4.12. Cinética do reparo de lesões causadas por MMS.....	93
4.13. Cinética do reparo de lesões causadas por H ₂ O ₂	95
4.14. Cinética do reparo de lesões causadas por cisplatina	95
4.15. Cinética do reparo de lesões causadas por UV	95
4.16. Localização de proteínas do <i>T. cruzi</i> pertencentes ao NER e ao reparo de ICLs	100
5. Discussão	104
6. Referências Bibliográficas	120

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2 – Morfologia do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3 – Modelo de replicação do kDNA.....	7
Figura 4 – Mecanismo do NER	12
Figura 5 – Mecanismo do BER	14
Figura 6 – Mecanismo da recombinação homóloga para o reparo de DSBs	17
Figura 7 – Reparo de ICLs associado à replicação	20
Figura 8 – PCNA na síntese translesão	23
Figura 9 – DNA polimerases em eucariotos.....	27
Figura 10 – DNA polimerases da família Y	28
Figura 11 – DNA polimerases da família DinB	30
Figura 12 – Alinhamento das duas cópias de TcPolk com vários ortólogos em outros organismos	60
Figura 13 – Alinhamento esquemático das duas cópias de TcPolk com vários ortólogos ..	62
Figura 14 – Comparação entre as cópias de <i>TcPOLK</i>	64
Figura 15 – Árvore filogenética construída com as seqüências de vários ortólogos de Polk.	65
Figura 16 – Clonagem no vetor pTREX-GFP	67
Figura 17 – Localização subcelular de TcPolk-2.....	68
Figura 18 – Clonagem no vetor pMALc2g.....	70
Figura 19 – Obtenção da proteína recombinante	71
Figura 20 – Atividade de DNA polimerase de MBP- TcPolk-2.....	72
Figura 21 – Clonagem no vetor pROCK-NEO.....	74
Figura 22 – Confirmação da superexpressão de <i>TcPOLK-2</i>	75
Figura 23 – Curva de crescimento de parasitos superexpressores	76
Figura 24 – Sobrevivência de superexpressores de <i>TcPOLK-2</i> à H ₂ O ₂	78

Figura 25 – MBP-TcPolκ-2 é capaz de replicar através de 8-oxoG	79
Figura 26 – Resposta de superexpressores de <i>TcPOLK-2</i> à irradiação gama	81
Figura 27 – Sobrevivência de superexpressores de <i>TcPOLK-2</i> após tratamento com zeocina	82
Figura 28 – Obtenção do intermediário de recombinação <i>D-loop</i>	83
Figura 29 – MBP-TcPolκ-2 é capaz de replicar em intermediários de recombinação.....	84
Figura 30 – Sobrevivência de superexpressores de <i>TcPOLK-2</i> à MMS	86
Figura 31 – Sobrevivência de superexpressores de <i>TcPOLK-2</i> ao benzonidazol (BZ).....	87
Figura 32 – Localização da outra cópia do gene TcPolκ (TcPolκ-1).....	89
Figura 33 – Regiões amplificadas nos ensaios de qPCR.	91
Figura 34 – Amplificação dos fragmentos de 10 kb nuclear e mitocondrial	92
Figura 35 – Surgimento e reparo de lesões causadas por MMS	94
Figura 36 – Surgimento e reparo de lesões causadas por H ₂ O ₂	97
Figura 37 – H ₂ O ₂ prejudica a atividade mitocondrial	98
Figura 38 – Surgimento e reparo de lesões causadas por cisplatina	99
Figura 39 – Reparo de lesões causadas por UV	102
Figura 40 – Localização celular de proteínas do NER e do reparo de ICLs	103

Lista de Quadros

Quadro 1 – Iniciadores usados para clonagem	39
Quadro 2 – Combinação de iniciadores para amplificação dos fragmentos de interesse	41
Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados para gerar os iniciadores-moldes usados nos ensaios de polimerização	45
Quadro 4 – Nome, estrutura e composição dos iniciadores-moldes utilizados nos ensaios de polimerização	46
Quadro 5 – Iniciadores usados no ensaio de qPCR	53

Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, e durante seu ciclo de vida está exposto a diversos agentes genotóxicos, os quais podem gerar mutações, a parada do ciclo celular e até mesmo a morte. Os principais mecanismos de tolerância a lesões no DNA são o reparo de DNA – onde a lesão é removida – e a síntese translesão – onde uma DNA polimerase especializada replica através do dano. Nesta tese, fizemos a caracterização de uma das cópias da DNA polimerase kappa do *T. cruzi* (TcPolκ-2) – pertencente à síntese translesão – e investigamos o reparo de lesões no DNA do parasito após tratamentos genotóxicos. Nossos resultados mostraram que a TcPolκ-2 é uma DNA polimerase de localização mitocondrial, a qual é capaz de replicar DNA através de lesões de 8-oxoguanina e de sintetizar DNA em uma estrutura intermediária da recombinação. Essas especializações de TcPolκ-2 – verificadas *in vitro* – refletiram em fenótipos *in vivo*, onde a superexpressão de TcPolκ-2 aumentou a resistência do *T. cruzi* a agentes que levam à oxidação e a quebras duplas no DNA. Esses resultados sugerem um papel de TcPolκ-2 na síntese translesão de lesões oxidativas e na recombinação homóloga do kDNA. Paralelamente, verificamos que a outra cópia de TcPolκ (TcPolκ-1) localiza-se no núcleo. Ao investigarmos o reparo de DNA do *T. cruzi* após diferentes tratamentos genotóxicos, verificamos que o *T. cruzi* possui mecanismos de reparo nuclear e mitocondrial. Nossos resultados mostram que o *T. cruzi* é capaz de reparar eficientemente lesões causadas por MMS e cisplatina, removendo os danos nos genomas nuclear e mitocondrial. Verificamos que após o tratamento com H₂O₂, ocorre um eficiente reparo das lesões no DNA nuclear, embora ocorra uma persistência das lesões mitocondriais. Essa persistência de lesões mitocondriais é consequência da diminuição da atividade mitocondrial, a qual leva a um segundo aparecimento de espécies oxidativas. Verificamos também que o *T. cruzi* é capaz de reparar lesões causadas por UV no DNA mitocondrial, embora não repare as lesões no DNA nuclear. Este surpreendente reparo mitocondrial de lesões causadas por UV e cisplatina aparenta ser efetuado por um mecanismo similar ao reparo de crosslinks interfita, uma vez que constatamos que proteínas pertencentes a esta via são endereçadas à zona cinetoflagelar, adjacente ao DNA mitocondrial. Juntos, os resultados obtidos durante esta tese de doutorado mostram que a manutenção do DNA mitocondrial é crucial para a sobrevivência do *T. cruzi*, podendo ser feita tanto por mecanismos de síntese translesão como por diferentes vias de reparo mitocondrial.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, and during its life cycle it is subjective to several genotoxic agents, which can lead to mutations, cell division blockage or even cell death. The major mechanisms of DNA damage tolerance are the DNA repair (which removes the lesion) and the translesion synthesis (TLS, carried out by specialized DNA polymerases that are able to replicate across DNA damage). Within this thesis, we characterized one copy of the *T. cruzi* DNA polymerase kappa gene (*TcPOLK-2*), as well as we assessed the *T. cruzi* DNA repair after treatment with different genotoxic agents. Our results showed that TcPolκ-2 is a mitochondrial DNA polymerase which can replicate across 8-oxoguanine lesions and also can synthesize DNA in a recombination intermediate structure. These TcPolκ-2 specializations that were verified *in vitro* reflected on *in vivo* phenotypes, since the overexpression of TcPolκ-2 increased the *T. cruzi* resistance against agents that cause oxidative damage and double-strand breaks. These results suggest a TcPolκ-2 role in the translesion synthesis across oxidative damage and in the mitochondrial DNA recombination. Additionally, we demonstrated that the other TcPolκ copy (TcPolκ-1) is localized to the nucleus. When we assessed the DNA repair of *T. cruzi* after different genotoxic treatments, we verified that *T. cruzi* has nuclear and mitochondrial mechanisms of DNA repair. Our results showed that *T. cruzi* efficiently repairs DNA lesions caused by MMS and cisplatin, removing both nuclear and mitochondrial lesions. We also verified that H₂O₂-induced lesions are efficiently removed from nuclear DNA, whereas the mitochondrial lesions persist. The persistence of mitochondrial lesions showed to be a consequence of a defect in the mitochondria activity, which leads to a second burst of oxidative species. We also verified that *T. cruzi* is capable of repairing UV-induced lesions in the mitochondrial DNA, while nuclear lesions remained unrepaired. This surprising mitochondrial repair of UV and cisplatin-induced lesions seems to be carried out by a mechanism similar to the interstrand crosslink repair, since proteins belonging to this pathway are localized to the kinetoflagellar zone adjacent to the mitochondrial DNA. Taken together, the results obtained herein show that the maintenance of mitochondrial DNA is critical for *T. cruzi* survival, and this can be achieved even by translesion synthesis mechanisms as by different mitochondrial DNA repair pathways.

1. Introdução

1.1 - Trypanosoma cruzi

O parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, enfermidade que acomete cerca de 10 milhões de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento que se encontram nas regiões tropicais e subtropicais. Apesar de aproximadamente 80 milhões de pessoas viverem em condições de alto risco de infecção, ainda não existe nenhuma vacina para esta doença, apenas algumas poucas drogas que não apresentam alta eficiência devido à sua toxicidade e à resistência do parasito (<http://www.who.org/>).

A história natural da doença de Chagas se iniciou há milhões de anos (revisado em Coura, 2007; Coura & Borges-Pereira, 2010). Inicialmente, os tripanosomas primitivos eram organismos monogenéticos que parasitavam apenas insetos triatomíneos, os quais neste momento de sua história evolutiva ainda não se alimentavam de sangue. Quando esses insetos passaram a possuir o hábito de sugar sangue, os tripanosomas sofreram adaptações morfológicas e funcionais, desenvolvendo um flagelo e uma membrana ondulante para a locomoção na corrente sanguínea de vertebrados (Hoare, 1972).

Durante séculos esta patologia foi uma doença enzoótica presente apenas em animais silvestres – fato que ainda persiste em áreas como a Amazônia. Embora existam evidências de infecção por *T. cruzi* em múmias que possuem entre 4000 anos (Guhl et al., 1999) e 9000 anos (Aufderheide et al., 2004), a adaptação de insetos triatomíneos à civilização humana é mais recente.

Como conseqüência do extenso desflorestamento para a agricultura e agropecuária que ocorreu durante os últimos 300 anos na América Latina, houve uma drástica redução na população de animais silvestres que serviam de fonte de alimento para os triatomíneos. Desta forma, estes insetos passaram a colonizar áreas e assentamentos habitados pelo homem, se adaptando a este novo nicho e passando a se alimentar de sangue de humanos e de animais domésticos. Como conseqüência, a doença de Chagas passou a ser transmitida acidentalmente aos humanos como uma antropozoonose (Coura, 2007).

Os tripanossomos parasitas de animais eram conhecidos desde 1841, através do trabalho de Gustav Valentin, professor da Universidade de Berna, que havia

verificado a presença de parasitos deste gênero em trutas. Anos mais tarde foram descobertos os protozoários *Trypanosoma sanguinis*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma gambiense* e *Trypanosoma equinum* (revisado em Sá, 2005). A descoberta do *Trypanosoma cruzi* ocorreu em 1908, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, ao observar a presença deste protozoário dentro dos triatomíneos que se escondiam nas paredes das habitações de Lassance, interior de Minas Gerais. Posteriormente, Chagas verificou que este parasito era capaz de infectar macacos e gatos, o que o levou a fazer exames sistemáticos no sangue dos moradores de Lassance, à procura do *T. cruzi* em humanos (revisado em Kropf & Sá, 2009). Em 14 de Abril de 1909, Chagas finalmente encontrava o parasito no sangue de uma criança febril – Berenice, na época com 2 anos de idade – fazendo assim a descoberta da enfermidade que levaria o seu nome (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* pertence à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastidae, nas quais estão incluídos os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Seu ciclo de vida alterna entre os hospedeiros vertebrados (principalmente mamíferos) e os insetos da família Triatominae, com diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros (Figura 1). Formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicos infectivos são encontradas nos vetores hematófagos, ao passo que formas amastigotas replicativas e tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros mamíferos (Wanderley de Souza, 2002). Este parasito apresenta uma alta diversidade genética intraespecífica, a qual permite que sua espécie seja dividida em 6 sub-grupos – TcI a TcVI (Zingales et al., 2009).

Apesar de ser um eucarioto, este parasito possui uma série de mecanismos de regulação da expressão gênica que não são usuais para este grupo evolutivo – transcrição policistrônica, processamento *trans-splicing* do mRNA e edição do RNA mitocondrial (C. E. Clayton, 2002).

1.1.1 – Replicação do genoma do *T. cruzi*

A replicação do DNA nuclear de tripanosomatídeos aparenta ser similar à encontrada em eucariotos superiores. Todas as proteínas que compõem a forquilha de replicação estão conservadas nestes organismos. Entre estas, as três DNA polimerases replicativas (DNA polimerases alfa, delta e épsilon), a proteína de

Doença de Chagas: Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

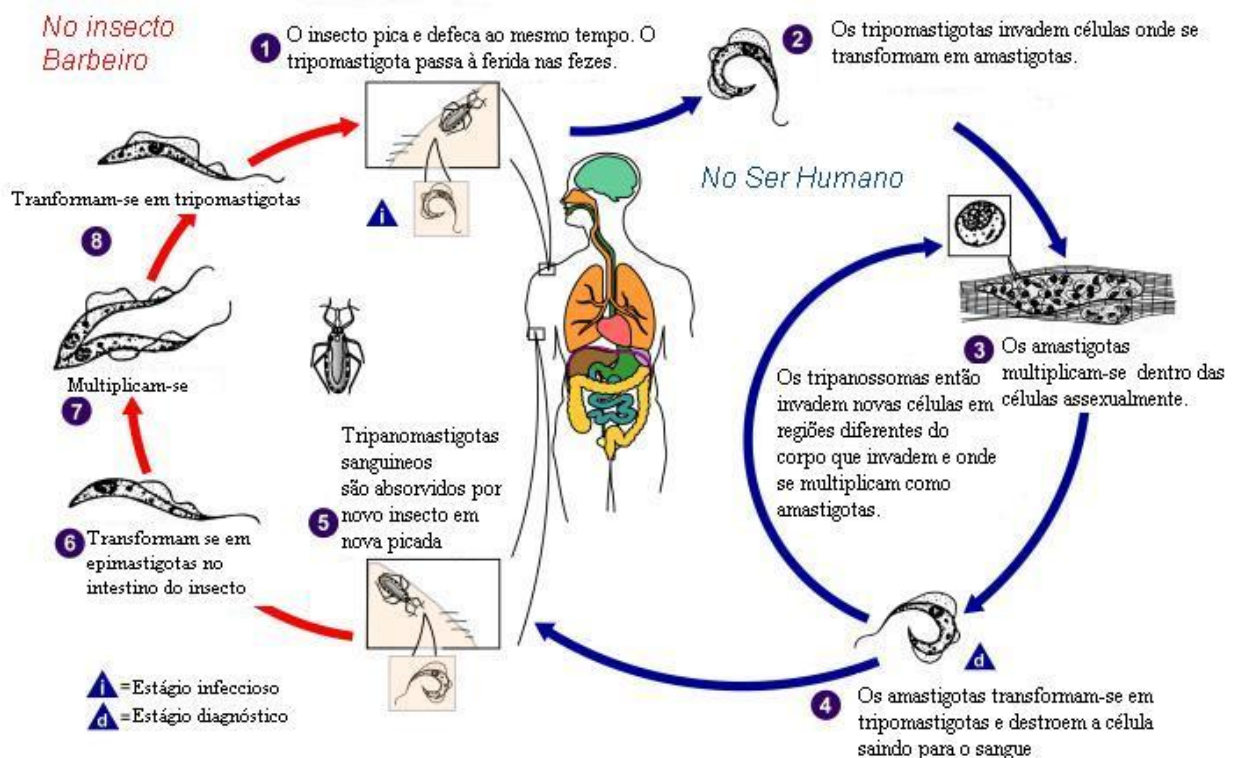


Figura 1 – Ciclo de vida do *T. cruzi*. O ciclo mostra as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. O barbeiro pica e deposita as fezes na pele do homem, que se infecta com formas tripomastigotas do *T. cruzi* através da ferida. Ao invadir células, se transformam em amastigotas e se multiplicam. Em seguida, se transformam em tripomastigotas, caindo na corrente sanguínea. Onde podem ser passados novamente para o barbeiro através de uma nova picada. Dentro barbeiro, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigota. Figura adaptada do website do *Center of Control Diseases*.

replicação A (RPA), o fator de replicação C (RFC), o PCNA entre outros componentes (El-Sayed et al., 2005).

Apesar de possuir uma maquinaria de replicação nuclear similar a de outros eucariotos, o DNA mitocondrial de tripanosomatídeos tem características únicas, não encontradas em outros organismos. O *T. cruzi* possui uma única mitocôndria, a qual se estende por todo o corpo celular (Figura 2). Dentro desta organela, o DNA mitocondrial está concentrado em uma única região, formando uma densa rede de anéis concatenados de DNA denominada cinetoplasto (Figura 2 e 3). O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês *kinetoplast DNA*) representa cerca de 25% do DNA total de formas epimastigotas do parasito e é composto por cerca de 20.000 a 30.000 minicírculos e aproximadamente 50 maxicírculos de DNA (Wanderley de Souza, 2002). Os genes presentes nos maxicírculos – assim como os genes do DNA mitocondrial de outros eucariotos – codificam rRNAs e proteínas da cadeia respiratória (Shapiro, 1993). Já os minicírculos codificam RNAs guias (*guide RNAs*), os quais atuam na edição dos transcritos dos maxicírculos (Simpson et al., 2004).

A divisão do cinetoplasto ocorre após a divisão do corpo basal e do flagelo, imediatamente antes da fase S nuclear. Liu e colaboradores (2005) propuseram um modelo para explicar a replicação dos minicírculos do kDNA. A replicação do kDNA se iniciaria com os minicírculos se desligando da rede de kDNA e migrando para a zona cinetoflagelar (KFZ, do inglês *KinetoFlagellar Zone*), onde eles se duplicam (Figura 3). Os minicírculos “filhos” então migram para os sítios antipodais, onde ocorreriam os próximos passos da replicação (remoção de iniciadores pela SSE1, preenchimento de lacunas pela Pol β e fechamento dos *nicks* pela Ligase k β). Os minicírculos – ainda contendo ao menos uma lacuna ou um *nick* – seriam então religados à periferia da rede pela topoisomerase II. Acredita-se que a DNA Polimerase β -PAK e a DNA Ligase k α estão envolvidas no reparo final de pequenas lesões, após o término da replicação do kDNA. Uma vez que cada minicírculo codifica um repertório diferente de RNAs guias, a perda de uma classe de minicírculos durante a replicação seria letal para o parasito (Liu et al., 2005). Interessantemente, a DNA Polimerase Gama (Pol γ), conhecida por atuar na replicação do DNA mitocondrial de outros eucariotos, não está presente no *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005).

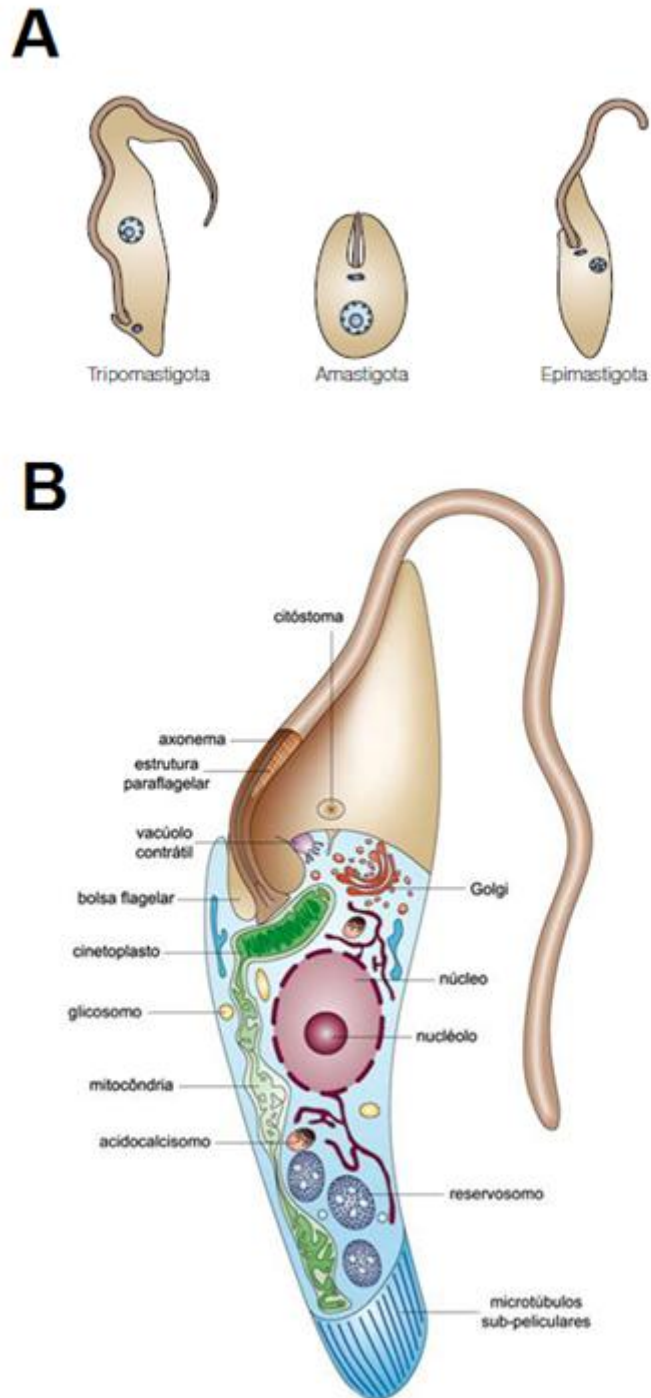


Figura 2 - Morfologia do *T. cruzi* (A) Diferentes formas do ciclo do *T. cruzi*. Da esquerda para a direita: tripomastigota, amastigota, e epimastigota. (B) Esquema geral da forma epimastigota mostrando as principais estruturas celulares, como o núcleo, a bolsa flagelar e a mitocôndria única contendo o DNA mitocondrial armazenado no cinetoplasto (adaptado de Docampo, et al., 2005)

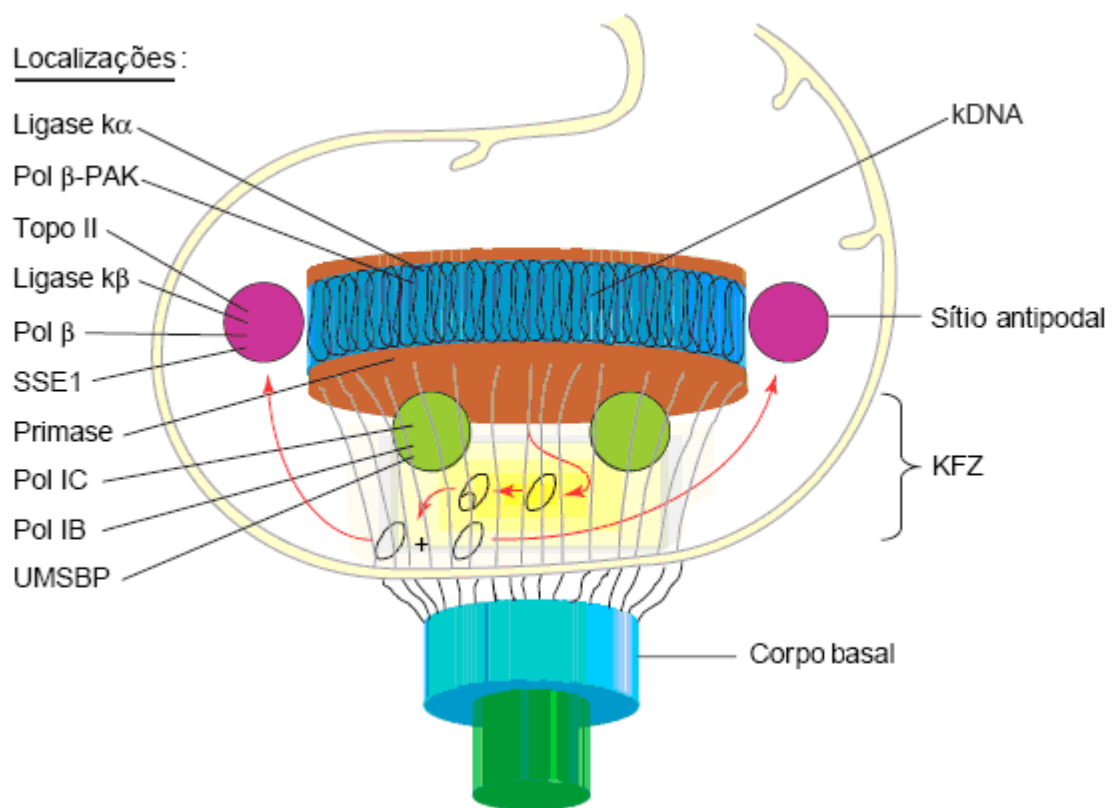


Figura 3 – Modelo de replicação do kDNA. Minicírculos são liberados da rede de kDNA para a zona cinetoflagelar (KFZ) e iniciam a replicação. Os minicírculos filhos migram para os sítios antipodais onde ocorrem a remoção dos iniciadores, preenchimento de lacunas e selamento das incisões. Os minicírculos são ligados à periferia da rede de kDNA e ocorre o reparo final de lacunas e pequenas quebras na molécula (adaptado de Liu et al., 2005).

1.1.2 – Resposta genotóxica ao parasito

A doença de Chagas é uma enfermidade que apresenta uma variação sintomática e patológica entre os infectados, a qual se acredita ser consequência da alta variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* (Zingales et al., 2009). De forma geral, a doença de Chagas é caracterizada pela presença de uma fase aguda – de curta duração – que em alguns infectados progride para uma fase crônica. Enquanto a fase aguda possui sintomas como sinais de Romaña, febre e lesões no local da picada – conhecidos como chagomas – a fase crônica pode levar a danos nos sistemas nervoso, cardíaco ou digestivo, após um longo período onde os sintomas não são percebidos (Rassi et al., 2010).

Algumas das principais respostas apresentadas pelo sistema imune do hospedeiro mamífero durante a fase aguda da infecção do *T. cruzi* envolve a produção de substâncias genotóxicas. A produção de óxido nítrico (NO) pela isoforma induzida por citocina da NO sintase (iNOS; NOS2) é um mecanismo chave utilizado por macrófagos no combate a este parasito. Ao mesmo tempo, grandes quantidades de intermediários reativos de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) são geradas pelo sistema da NADPH oxidase. Todos estes radicais são capazes de produzir intensos danos nos componentes celulares do parasito, como oxidação de proteínas, lipídios de membrana e lesões no DNA (Bogdan & Röllinghoff, 1999).

Para conseguir sobreviver dentro das células do hospedeiro, o *T. cruzi* necessita apresentar uma série de defesas bioquímicas contra esse intenso estresse oxidativo. Por um lado, enzimas do sistema redox – presentes em praticamente todas suas organelas celulares – são responsáveis por converter estas espécies reativas em moléculas mais estáveis e menos danosas. Por outro lado, é necessário que o *T. cruzi* possua um sistema eficiente de reparo de DNA para conter os danos provocados pelas espécies reativas que não foram neutralizadas pelo seu sistema redox. Dessa forma, o profundo entendimento sobre o metabolismo de DNA do *T. cruzi* pode aumentar os conhecimentos acerca dos mecanismos bioquímicos envolvidos na infectividade deste parasito.

1.2 - Reparo de DNA

A correta duplicação e manutenção da informação genética é constantemente desafiada por agentes físicos e químicos que geram estresse genotóxico. Os eventos que resultam em lesões no DNA incluem radiação, hidrólise, exposição a espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e agentes alquilantes (Lindahl, 1993; Olinski et al., 2007; Tudek et al., 2006). Visando reverter ou mesmo evitar a formação de danos no DNA, os seres vivos desenvolveram uma ampla gama de vias moleculares que são capazes de promover o reparo de diferentes tipos de lesões no DNA. Desta forma, o genoma está protegido de modificações potencialmente mutagênicas, o que permite uma transmissão precisa da informação genética para as gerações seguintes (Friedberg, 1995).

Os estudos no campo do reparo de DNA se iniciaram de forma indireta na primeira metade do século XX, nos Estados Unidos da América (EUA) (revisado em Friedberg, 2008). O aumento acelerado em pesquisas para confecção de armas atômicas trouxe uma maior atenção da comunidade científica para os efeitos da radiação em organismos biológicos. No começo da década de 1940 já se tornava evidente que agentes que levam a alterações mutagênicas (tais como radiação ionizante e ultravioleta) são capazes de interagir e causar danos no material genético das células. Em adição a isso, emergiam evidências que sugeriam que organismos vivos eram capazes de recuperar dos efeitos letais destes agentes (Hollaender & Curtis, 1935).

Nesse contexto histórico foi descoberto o primeiro mecanismo de reparo de DNA, denominado fotorreativação enzimática. Curiosamente, acredita-se que este tenha sido o primeiro mecanismo de reparo a surgir durante a história evolutiva. A fotorreativação enzimática é um processo no qual dímeros de pirimidina – geralmente gerados por exposição à radiação UV – são reparados através da sua monomerização (Friedberg, 1995). Sua descoberta ocorreu acidentalmente, quando pesquisadores observaram que células irradiadas com UV apresentavam uma maior sobrevivência se, após a irradiação, fossem deixadas na bancada na presença da luz (Dulbecco, 1949; Kelner, 1949). Foram necessários mais alguns anos para se verificar bioquimicamente que a fotorreativação é catalisada por uma enzima que requer luz visível para sua atividade (Goodgal, et al., 1957).

Os próximos mecanismos de reparo a serem descobertos foram os processos de reparo por excisão. No final da década de 1950, pesquisadores canadenses isolaram uma linhagem de *Escherichia coli* que apresentava uma alta sensibilidade à radiação UV (Hill, 1958). Em paralelo, vários outros grupos de pesquisa verificaram que células expostas a UV, se mantidas por um período de tempo em meio líquido antes de serem plaqueadas, apresentavam maior sobrevivência quando comparadas a células que eram plaqueadas imediatamente (Friedberg, 1995). Este evento era independente da presença de luz visível, sugerindo a existência de outros mecanismos de reparo além da fotorreativação enzimática. Durante o meio da década de 1960 foi observado que, após exposição à luz UV, a *E. coli* era capaz de remover do seu genoma pequenos fragmentos de DNA, os quais continham lesões induzidas por UV, principalmente dímeros de pirimidina (Boyce & Howard-Flanders, 1964; Setlow & Carrier, 1964). A obtenção de três linhagens incapazes de realizar este tipo de reparo (denominadas *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*) serviu para mostrar que múltiplos genes estavam envolvidos no processo de excisão do DNA (Howard-Flanders et al., 1962). Paralelamente, mecanismos similares de reparo por excisão também eram descritos em células de mamíferos (Rasmussen & Painter, 1964).

Na década seguinte, pesquisadores mostraram que a remoção de uracila do DNA é realizada de forma diferente da remoção de dímeros de pirimidina. Enquanto os dímeros são removidos com a retirada do fragmento do DNA que contém o dano, a uracila é retirada na forma de uma base livre (Tomas Lindahl, 1974). Esta descoberta levou a diferenciação entre o reparo por excisão de nucleotídeo e o reparo por excisão de base. Ao final da década de 70, novos avanços se seguiram, levando a um conhecimento mais detalhado dos mecanismos de reparo citados acima, bem como a descoberta de novas vias de reparo de DNA (Friedberg, 1995).

De forma resumida, os principais mecanismos de reparo de DNA são (i) reversão direta, responsável pela reversão enzimática da lesão; (ii) reparo de erro de pareamento (MMR, do inglês *mismatch repair*), o qual repara bases incorporadas de forma errônea (Arczewska & Kuśmierk, 2007); (iii) reparo por excisão de nucleotídeo (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), responsável pela remoção de lesões que alteram a conformação do DNA (Maddukuri et al., 2007); (iv) reparo por excisão de base (BER, do inglês *base excision repair*), no qual bases oxidadas, metiladas ou desaminadas são removidas por uma glicosilase (Krwawicz et al., 2007); (v) reparo de

quebras duplas, o qual pode ser feito por recombinação (usando regiões de homologia no cromossomo homólogo para reparar o DNA) (Nowosielska, 2007) ou por junção das regiões terminais (NHEJ, do inglês *non-homologous end-joining*) (Hasty, 2008); e (vi) reparo de crosslinks interfitas (ICL, do inglês *interstrand crosslink*) (Muniandy et al., 2010).

A seguir, detalharei as vias de reparo de DNA que foram investigadas durante a realização deste trabalho científico, abordando suas características moleculares gerais e o conhecimento corrente a respeito dessas vias em *T. cruzi*.

1.2.1 - Reparo por excisão de nucleotídeo

O reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é um dos mecanismos de reparo de DNA mais versáteis, responsável por reparar lesões que alteram a conformação tridimensional do DNA, tais como adutos de cisplatina (Trimmer & Essigmann, 1999) e lesões induzidas por UV (Tijsterman, de Pril, Tasserón-de Jong, & Brouwer, 1999). Este mecanismo pode ser dividido em duas vias principais: reparo genômico global (GGR, do inglês *global genome repair*), o qual opera em partes não-codificantes do genoma e na fita não transcrita de genes ativos; e o reparo acoplado à transcrição (TCR, do inglês *transcription coupled repair*), o qual é ativado quando uma lesão surge em um gene que está sendo transcrito, garantindo que a fita transcrita de genes ativos possua uma maior prioridade em ser reparada do que o resto do genoma (Nospikel, 2009).

O mecanismo do GGR-NER em eucariotos é composto de várias etapas (Figura 4): (i) detecção da distorção, realizada por XPC e HR23B (M. Araki et al., 2001) ou alternativamente por DDB1/XPE-DDB2 (Tang & Chu, 2002); (ii) abertura da dupla fita pelo complexo TFIIH através de suas subunidades helicases XPB e XPD (Coin et al., 2007); (iii) recrutamento de XPA complexada com as três subunidades heterotriméricas de RPA (Sugasawa et al., 1998); (iv) incisão no DNA pela endonuclease XPG (no lado 3' da lesão) e pelo heterodímero XPF-ERCC1 (no lado 5' da lesão) (Mu et al., 1996; O'Donovan et al., 1994); (v) preenchimento das lacunas pelas DNA polimerases replicativas δ e ϵ (Popanda & Thielmann, 1992; Shivji et al., 1992);

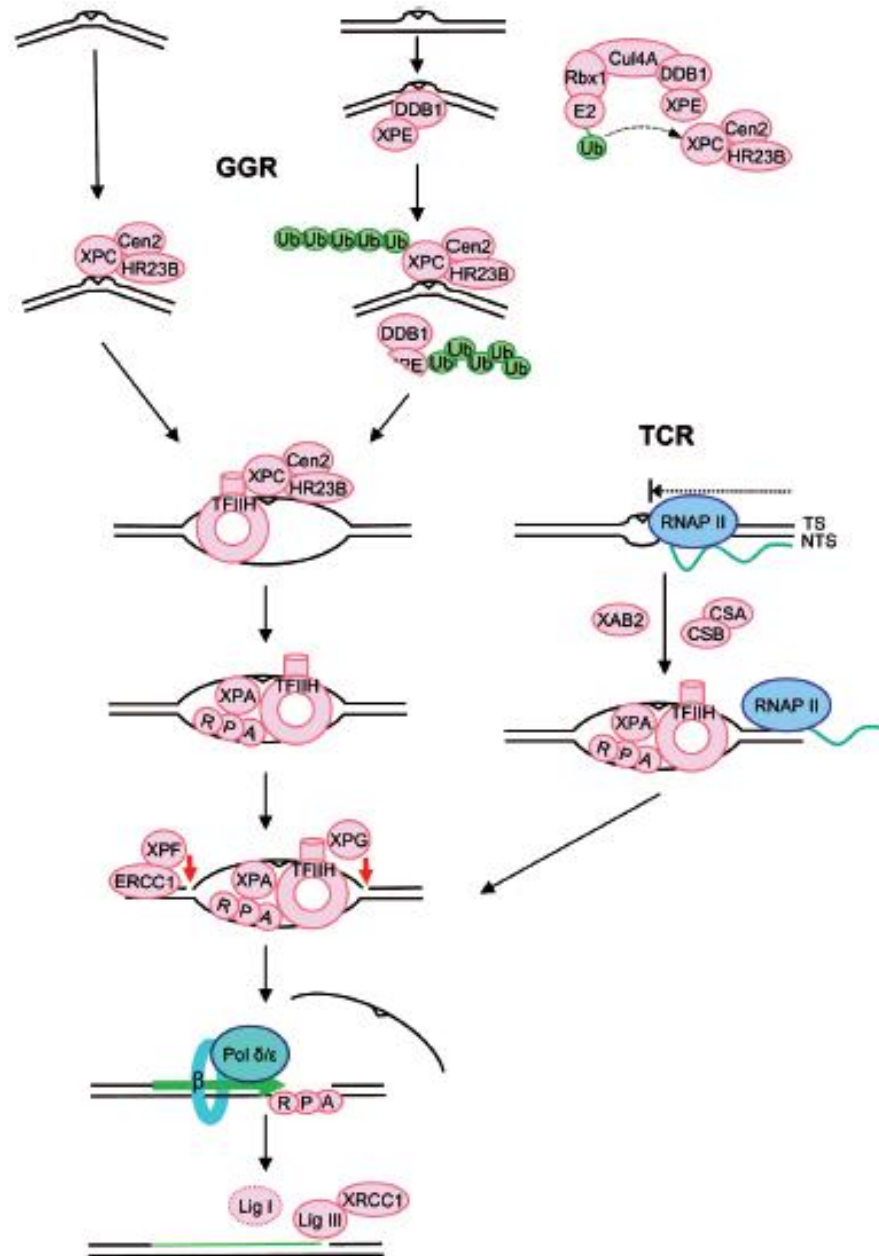


Figura 4 – Mecanismo do NER. A figura destaca as sub-vias do GGR e do TCR (adaptado de Nousepikel, 2009). As lesões que causam distorções severas na molécula de DNA são detectadas diretamente pelo complexo XPC-HR23B-Cen2. Lesões que causam pouca distorção são detectadas pelo complexo DDB1-XPE. A ubiquitinação de XPC aumenta sua afinidade pelo DNA, e a ubiquitinação de XPE a leva à degradação. TFIIH abre a fita dupla, onde o complexo XPA-RPA se acopla, retirando XPC do local contendo a lesão. As incisões são feitas por XPG e XPF-ERCC1. Após a retirada do fragmento contendo a lesão, a lacuna é preenchida por polimerases replicativas acopladas ao PCNA, e depois ligada pela DNA ligase I ou pelo complexo DNA ligase III-XRCC1.

(vi) selamento das incisões pela ligase III junto com XRCC1, ou em menor grau pela ligase I (Moser et al., 2007).

O TCR-NER possui um mecanismo semelhante ao GGR, porém esse difere nas etapas iniciais devido à ausência dos complexos de XPC e DDB1. O TCR é ativado através da parada da RNA polimerase II, o que subsequenteiramente recruta CSA, CSB e XAB2. Os passos seguintes são realizados pelo complexo TFIIH da mesma forma como no GGR (Tornaletti, 2009).

Apesar de o mecanismo do NER ser bem conservado na natureza, não existe uma homologia de seqüência entre proteínas do NER de bactérias e eucariotos. E mesmo existindo uma conservação entre as seqüências protéicas eucarióticas, nem todos os genes que codificam estas proteínas são encontrados em grupos filogeneticamente distantes. Os exemplos mais marcantes são a ausência de XPA em *Arabidopsis thaliana* e a ausência de XPA, XPC e XPE em *Plasmodium falciparum* (Costa et al., 2003), o que sugere que o mecanismo do NER pode apresentar pequenas variações entre táxons diferentes.

O genoma do *T. cruzi* contém a maioria dos genes que codificam os componentes do NER (Aslett et al., 2010; El-Sayed et al., 2005; Passos-Silva et al., 2010), mas os mecanismos bioquímicos desta via aparentam possuir pequenas diferenças em relação aos outros eucariotos. Por exemplo, os genes que codificam XPB e DDB1 estão duplicados. Já outros genes não são identificáveis no genoma do parasito, como é o caso de XPA e ligase III. Os genes que codificam DDB2 (a qual interage com DDB1 e reconhece lesões induzidas por UV) e RPA3 (um componente do heterotrímero RPA) também não são identificáveis no genoma do *T. cruzi*, assim como os genes que codificam algumas subunidades do complexo TFIIH e CSA (Passos-Silva et al., 2010).

1.2.2 - Reparo por excisão de base

O reparo por excisão de base (BER) é a principal via de reparo envolvida na correção de lesão de bases resultantes de processos de oxidação, metilação e desaminação. A via do BER consiste de diversas etapas (Figura 5): detecção e remoção da base danificada; clivagem do esqueleto de carbono-fosfato, seguido pela

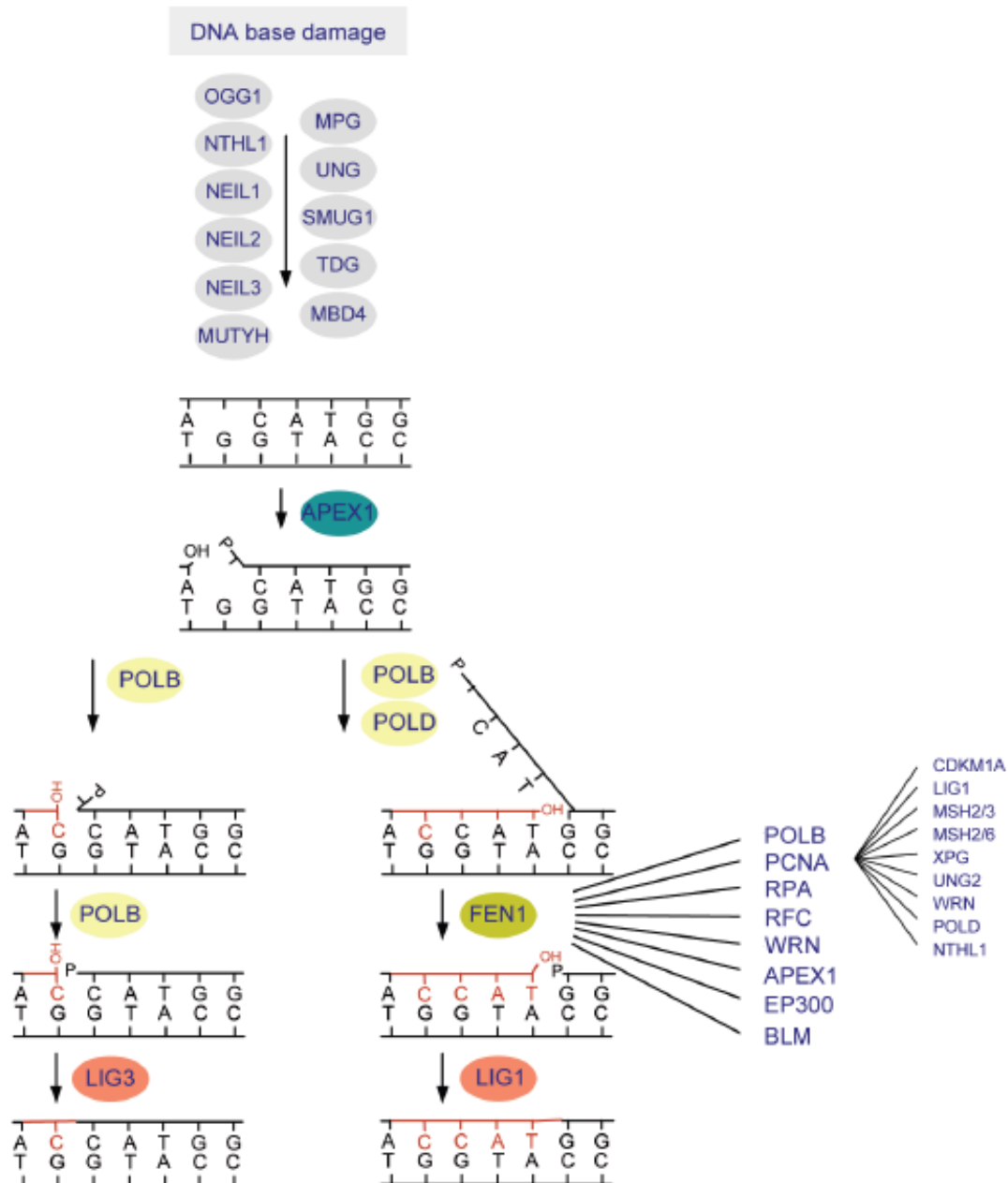


Figura 5 – Mecanismo do BER. A figura representa esquematicamente as sub-vias curta (esquerda) e longa (direita). A lesão é removida por uma glicosilase (ex: OGG1). Em seguida, o esqueleto carbono-fosfato é clivado por uma AP endonuclease. Na via curta, o processamento da extremidade 5' e o preenchimento da lacuna são feitos pela Pol β , e a quebra é selada pela DNA ligase III acoplada a XRCC1. Na via longa, a incorporação de nucleotídeos é feita por Pol β ou Pol δ/ϵ , acompanhada por deslocamento de fita. A fita deslocada é removida por FEN1, e a ligação feita pela DNA ligase I (adaptado de Robertson et al., 2009)

excisão do mesmo; preenchimento da lacuna por uma DNA polimerase; e ligação da nova base incorporada ao restante da seqüência de DNA (Robertson et al., 2009).

A primeira etapa do BER – reconhecimento e remoção da lesão – é catalisada por uma DNA glicosilase específica (Figura 5). O sítio abásico criado pela DNA glicosilase pode ser processado de duas maneiras distintas. Se a glicosilase envolvida for bifuncional (por exemplo, NTHL, MUTY, OGG1 ou NEIL), sua atividade intrínseca de 3' AP-liase cliva o esqueleto carbono-fosfato no lado 3' da lesão. Quando a glicosilase envolvida é monofuncional (por exemplo, MBD, UNG, TDG, SMUG ou MPG), uma AP endonuclease cria uma incisão em uma das fitas do sítio AP. Em ambos os casos a extremidade gerada necessita ter suas terminações 3' OH e 5' fosfato restauradas para que seja possível a síntese de DNA por uma DNA polimerase. A incisão na porção 3', criada pela atividade AP-liásica intrínseca da DNA glicosilase bifuncional, é removida pela atividade 3'-diesterase da AP endonuclease. Já a porção 5' desoxiribose-fosfato deixada pela AP endonuclease pode ser removida pela atividade 5'-desoxiribose-fosfatase da DNA polimerase beta (Pol β). Durante este processo, XRCC1 atua como uma proteína suporte para os componentes do BER, uma vez que esta proteína interage com DNA glicosilases, AP endonucleases, bem como com as proteínas envolvidas nas etapas subseqüentes (revisado em Krwawicz et al., 2007; Robertson et al., 2009).

Após o processamento da extremidade 3', a via do BER continua através do preenchimento da lacuna gerada e pela ligação. Este processo também pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira, denominada “via curta do BER”, consiste na incorporação de nucleotídeos no sítio AP pela Pol β e a subseqüente ligação da extremidade 3' pela DNA ligase III, sendo ambas essas etapas coordenadas pela XRCC1. Na segunda sub-via, denominada “via longa do BER”, acredita-se que a Pol β também incorpora o primeiro nucleotídeo, entretanto ocorre uma síntese adicional de nucleotídeos e um deslocamento da fita de DNA pelas DNA polimerases delta (Pol δ) e épsilon (Pol ϵ). Esta porção de fita de DNA que é deslocada, usualmente chamada de estrutura *flap*, é removida pela endonuclease FEN1 (do inglês *Flap structure-specific endonuclease*) e em seguida a religação da extremidade 3' é feita pela DNA ligase I. O mecanismo que determina se o reparo será realizado através da via curta ou longa ainda não foi completamente elucidado. Estudos sugerem que a

troca da via curta pela longa depende da concentração relativa de ATP perto do sítio AP (revisado em Krwawicz et al., 2007; Robertson et al., 2009).

Os principais componentes do BER foram identificados no genoma do *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005; Passos-Silva et al., 2010). Entretanto, o genoma deste parasito não apresenta ortólogos da DNA ligase III e XRCC1, além de também não possuir uma Pol β nuclear. Uma vez que essas proteínas são supostamente essenciais para a via curta do BER, não é possível afirmar se o *T. cruzi* é capaz de reparar DNA utilizando essa sub-via.

Entre os componentes do BER de *T. cruzi* já caracterizados experimentalmente estão a uracil-DNA glicosilase, cuja análise de seqüência protéica sugere localização tanto no núcleo quanto na mitocôndria (Fárez-Vidal et al., 2001); OGG1, a qual localiza-se primariamente no núcleo do parasito, mas com um modesto endereçamento para a mitocôndria (Kunrath-Lima, 2010); e a AP endonuclease 1 (APE1) (Pérez et al., 1999). A Pol β de *T. cruzi* também se encontra caracterizada experimentalmente, estudo no qual se revelou que esta DNA polimerase possui uma inesperada localização mitocondrial (Lopes et al., 2008). Esta peculiaridade sugere que um possível mecanismo de BER mitocondrial pode ter um papel importante na biologia deste parasito.

1.2.3 - Recombinação homóloga

A recombinação homóloga é um processo metabólico do DNA encontrado em todas as formas de vida que apresentam um reparo de DNA de alta fidelidade e uma tolerância a danos complexos do DNA como quebras de fita dupla (DSBs, do inglês *double-strand breaks*) e *crosslinks* inter-fita de DNA (ICL, do inglês *interstrand crosslinks*). Além de atuar na conservação da integridade genômica, a HR também possui um importante papel na duplicação do genoma, funcionando como um suporte para a replicação do DNA e para a manutenção dos telômeros (revisado em Li & Heyer, 2008).

O mecanismo geral da recombinação homóloga (Figura 6) pode ser resumido em três eventos principais: (i) iniciação (ou pré-sinapse), na qual a DSB é preparada

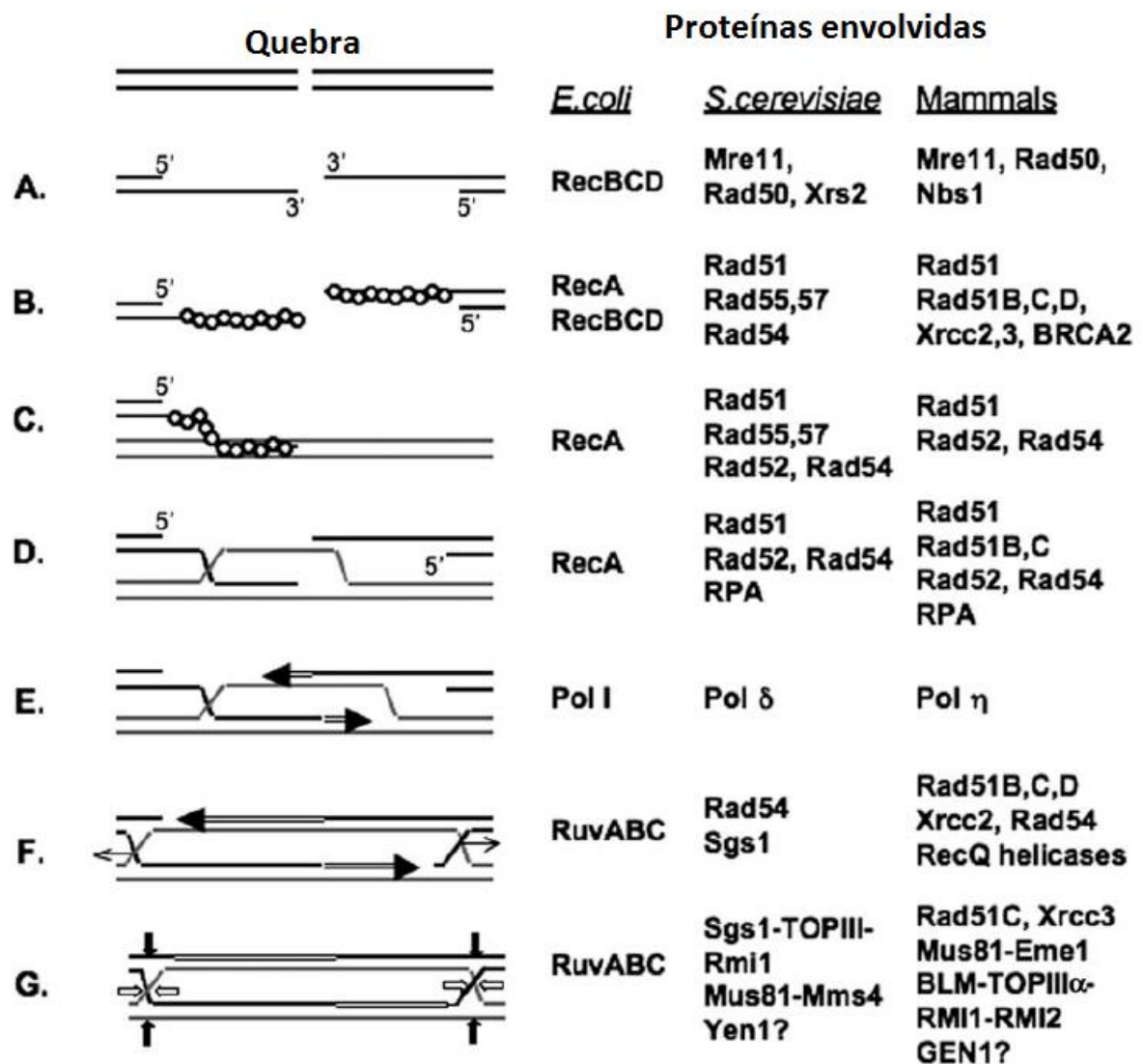


Figura 6 – Mecanismo da recombinação homóloga para o reparo de DSBs. O mecanismo em mamíferos é composto pelas etapas de **(A)** ressecção da extremidade 5' através de Mre11, Rad50 e Nbs1; **(B)** Formação do filamento pré-sináptico com a recombinase Rad51, auxiliada por Rad51B, C, D, XRCC2, XRCC3 e BRCA2; **(C)** busca por seqüência de homologia e sinapse, feitas por Rad51, Rad52 e Rad54; **(D)** deslocamento da fita e formação de heteroduplex, feitas por Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad52, Rad54 e RPA; **(E)** síntese de DNA, feita pela Pol η ; **(F)** Migração da ramificação, feita por Rad51B, C, D, XRCC2, Rad54 e a helicase RecQ; **(G)** resolução da junção de Holliday, feita por Rad51C, XRCC3, Mus81-Eme1, BLM-TopIII α -RMI1-RMI2 e Gen1 (adaptado de Hinz, 2010).

para a recombinação; (ii) troca entre as fitas (sinapse), onde a extremidade da DSB invade a molécula intacta de DNA, através de regiões de homologia; e resolução (pós-sinapse), na qual os intermediários da troca entre as fitas de DNA são separados, finalizando com o reparo da DSB (revisado em Wyman et al., 2004).

Em leveduras e mamíferos, as cromátides irmãs são preferencialmente usadas como molde para o reparo por recombinação homóloga (Hinz, 2010). Em mamíferos, o reparo de DSBs é iniciado pela ressecção das quebras nas terminações na fita 5' pelo complexo protéico MSN, formado pelas proteínas Mre11/Rad50/Nbs1 (Paull & Gellert, 1998). Esta ressecção gera as extremidades 3' de fita simples que são utilizadas nas etapas posteriores. Em eucariotos, a Rad51 (recombinase homóloga à RecA de bactéria) é a principal enzima recombinase (Aboussekhra et al., 1992). Esta proteína atua formando filamentos DNA-proteína com as extremidades 3' de fita simples, fazendo a busca por regiões de homologia e a posterior invasão da fita na região homóloga (Sung, 1994). Essas etapas ocorrem com o auxílio das proteínas Rad52, Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3, BRCA2 e Rad54 (Brenneman et al., 2002; Liu et al., 2004). Em complemento a essa função, o complexo Rad51B, C, D, XRCC2 ajuda na formação das estruturas de Holliday (Yokoyama et al., 2004), e os complexos Rad51C, XRCC3 auxilia na resolução das junções de Holliday (Liu et al., 2004; Masson et al., 2001).

A etapa de síntese do DNA na estrutura intermediária da recombinação aparentemente é realizada primariamente pela DNA polimerase η (McIlwraith et al., 2005), a qual também atua na síntese translesão, tema este que será abordado a seguir nesta tese. Em seguida ocorrem os processos de migração das ramificações – auxiliado por helicases (Singh et al., 2009) – e de resolução das junções de Holliday – realizado por enzimas resolvases (Heyer et al., 2003).

O genoma do *T. cruzi* apresenta os genes que codificam os componentes essenciais para a realização da recombinação homóloga (El-Sayed et al., 2005; Passos-Silva et al., 2010). A proteína Rad51 de *T. cruzi* vem sendo caracterizada por nosso grupo de pesquisa. Nestes estudos, foi possível verificar que a superexpressão desta recombinase acelera o reparo de DSBs, o que resulta em uma recuperação mais rápida do parasito após exposição à radiação gama (Regis-da-Silva et al., 2006). Além disso, a superexpressão de TcRad51 também confere maior resistência à H₂O₂.

Os resultados obtidos em nosso laboratório também mostram que apesar de estar localizada de forma difusa no corpo celular do *T. cruzi*, a Rad51 acumula no núcleo do parasito após exposição à radiação gama (Passos-Silva et al., dados não publicados).

1.2.4 - Reparo de *crosslinks* inter-fita

As lesões do tipo *crosslinks* inter-fita (ICLs) são lesões que resultam da ligação covalente entre as duas fitas opostas do DNA, o que leva ao bloqueio de atividades celulares que dependem da separação entre as fitas, como a replicação do DNA e a transcrição (Hinz, 2010). O envolvimento das duas fitas opostas do DNA na lesão ICL leva à necessidade de um reparo de DSBs. Entretanto, a recombinação homóloga por si só é insuficiente no reparo de ICLs, necessitando de proteínas acessórias das vias de reparo por excisão. Dessa forma, o mecanismo do reparo de ICLs é um processo complexo que requer a colaboração de múltiplas proteínas de diferentes vias de reparo, incluindo proteínas da recombinação homóloga, do NER, do BER e da síntese translesão (revisado em Muniandy, et al., 2010).

Em eucariotos, o reparo de ICLs aparenta ocorrer majoritariamente após a parada de forquilhas de replicação na fase S do ciclo celular. Apesar de existirem vários modelos propostos para explicar o reparo de ICLs associado à replicação, o modelo mais aceito encontra-se esquematizado na Figura 7 (extraído de Niedernhofer et al., 2004). O ponto chave deste reparo seria a criação – adjacente à lesão que está bloqueando a replicação – de uma DSB com apenas uma extremidade, a qual é usada para a realização da recombinação homóloga nas etapas posteriores. Este modelo requer a atuação de síntese translesão para replicar através da fita que apresenta a lesão ainda presa à sua molécula (Figura 7F). Os mecanismos de síntese translesão e suas DNA polimerases serão abordados no próximo tópico. Após esta etapa, a região contendo a DSB pode ser reparada através de recombinação homóloga, usando a dupla fita intacta como molde (Figura 7J).

As incisões em uma das fitas na molécula de DNA que contém a lesão são realizadas pela endonuclease Mus81-Eme1 – no lado 3' da lesão (Hanada et al., 2006) – e pela complexo de endonucleases do NER, XPF-ERCC1 – no lado 5' da

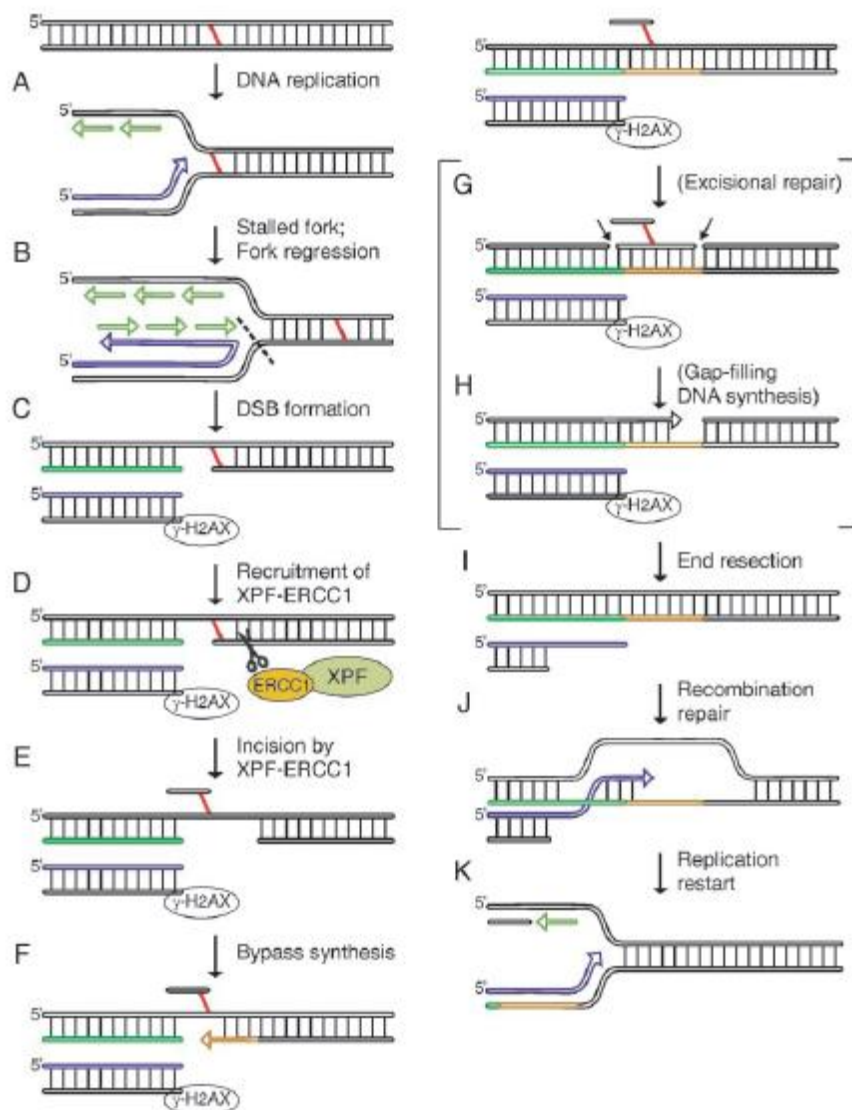


Figura 7 – Reparo de ICLs associado à replicação. (A) replicação é bloqueada pela lesão. **(B)** é feita uma incisão adjacente à lesão, de forma a criar uma DSB com apenas uma extremidade, em uma das duplas fitas **(C)**. **(D – E)** ocorre uma segunda incisão na molécula contendo o ICL. **(F)** síntese translesão na fita contendo o ICL permite a recuperação de uma das moléculas de DNA. **(G – H)** Remoção do ICL e preenchimento da lacuna. **(I)** Ressecção da molécula contendo a DSB. **(J)** A terminação 3' da DSB é reintegrada ao duplex homólogo e a forquilha de replicação é reiniciada através da recombinação homóloga **(K)** (extraído de Niedernhofer et al., 2004).

lesão (Figura 7B e 7D, respectivamente) (Niedernhofer et al., 2004). O mecanismo do NER contribui claramente para o reparo de ICLs.

Entretanto, a via do NER não aparenta ser predominante para esse tipo de reparo, já que células mutantes para o NER – com exceção dos mutantes em XPF-ERCC1 – não são tão sensíveis a agentes *crosslinks*, quando comparadas a células deficientes na recombinação homóloga (Nojima et al., 2005; Wang et al., 2001).

1.3 - Síntese translesão

Como descrito nos tópicos anteriores, o conteúdo genético dos organismos está continuamente exposto a uma ampla variedade de agentes que danificam a molécula de DNA, podendo provocar distorções na sua geometria estrutural, modificações de bases ou mesmo formação de adutos, todos estes obstáculos para a replicação do DNA (Friedberg, 1995). Mesmo com a existência de diferentes vias de reparo de DNA, algumas lesões podem não ser reparadas a tempo de a célula entrar em processo de divisão celular. As DNA polimerases replicativas (α , δ e ϵ) são extremamente eficientes e fidedignas na replicação de DNA não-danificado, mas são incapazes de acomodar bases danificadas, sendo bloqueadas na presença dessas lesões (revisado em Prakash et al., 2005).

Ao longo da evolução, algumas DNA polimerases se especializaram em tolerar determinados tipos de lesões através de uma via bioquímica conhecida como síntese translesão (TLS, do inglês *translesion synthesis*) (H. Ohmori et al., 2001). Tais proteínas conseguem replicar através de distorções na molécula de DNA por possuírem um sítio catalítico menos restrito, o que possibilita uma maior liberdade conformacional para o substrato (Zhou et al., 2001). Porém, essa menor especificidade catalítica possibilita a incorporação errônea de nucleotídeos em DNA não danificado, o que pode resultar em mutações pontuais. Devido a esta característica, estas enzimas são freqüentemente chamadas de DNA polimerases mutases ou adaptativas (revisado em Bavoux et al., 2005).

A via de síntese translesão possui duas etapas principais – a incorporação do nucleotídeo oposto à lesão e a subsequente extensão da fita a partir do nucleotídeo

incorporado. Embora algumas dessas DNA polimerases especializadas consigam realizar as duas etapas da TLS, geralmente a replicação através de uma lesão ocorre com a participação de duas DNA polimerases mutases distintas, onde uma faz a inserção do nucleotídeo e a outra realiza a posterior extensão da fita (Prakash et al., 2005).

Este complexo mecanismo que necessita atuar em resposta a condições adversas é orquestrado pelo PCNA, um trímero protéico deslizante que envolve o DNA de forma similar a um anel. O PCNA fornece o suporte estrutural no qual as diversas DNA polimerases podem se ligar (Figura 8). Quando uma forquilha de replicação trava, DNA polimerases replicativas são desligadas do PCNA, retiradas da forquilha e então substituídas por uma das DNA polimerases mutases. Após a síntese de DNA através da lesão, a maquinaria normal de replicação é restabelecida por um mecanismo inverso (Maga & Hubscher, 2003).

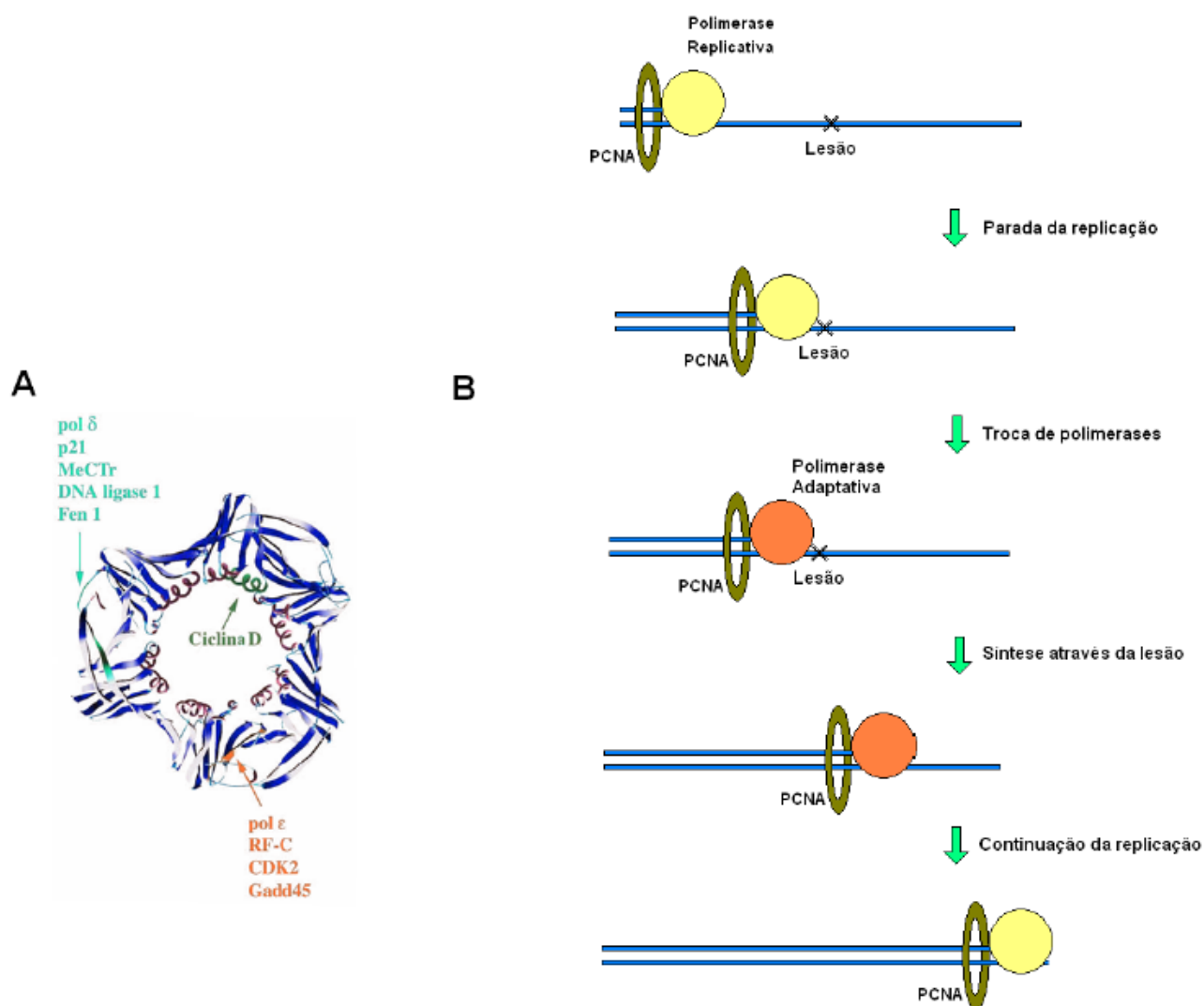


Figura 8 – PCNA na síntese translesão. (A) Estrutura tridimensional do PCNA, destacando alguns de seus sítios de interação, junto com os respectivos parceiros protéicos. (B) Representação esquemática mostrando a troca de DNA polimerases pelo PCNA. Uma DNA polimerase replicativa, ligada ao PCNA, é bloqueada por uma lesão. Após a parada da forquilha de replicação, ocorre a troca da DNA polimerase replicativa pela DNA polimerase especializada. Essa DNA polimerase é capaz de sintetizar DNA através da lesão. Após a síntese de alguns nucleotídeos, a DNA polimerase especializada pela replicativa, e a

replicação do DNA então continua normalmente. O recrutamento e troca de DNA polimerases é orquestrado pelo PCNA.

1.3.1 - DNA polimerases da síntese translesão

A elucidação da síntese translesão começou em Fevereiro de 1999 com a descoberta de uma DNA polimerase capaz de replicar DNA contendo dímeros de timina, lesões conhecidas por bloquearem as DNA polimerases replicativas. Johnson e colaboradores mostraram que o produto do gene *RAD30* de *Saccharomyces cerevisiae* incorpora duas adeninas na posição oposta ao dímero de timina. Por ter sido a sétima DNA polimerase de eucariotos a ser descrita, ela recebeu o nome de DNA Polimerase eta ($Pol\eta$) (Johnson et al., 1999).

Apenas quatro meses depois, outro trabalho de similar repercussão anunciava a descoberta do ortólogo da $Pol\eta$ em células humanas. Esse dado foi obtido em um estudo sobre Xeroderma pigmentosum variante (XP-V), uma desordem hereditária que está associada com cânceres de pele induzidos por luz solar. Células portadoras de XP-V possuem a via do NER funcionando normalmente, porém são incapazes de replicar uma molécula de DNA danificada por radiação ultravioleta (A. R. Lehmann et al., 1975). Por muitos anos suspeitou-se que o gene *XPV* codificaria uma proteína envolvida em um processo de síntese translesão de DNA, mas o produto desse gene nunca havia sido isolado. A partir de experimentos de polimerização *in vitro*, foi verificado que uma DNA polimerase isolada de células humanas normais era capaz de continuar a replicação *in vitro* de DNA danificado por raios UV. Por possuir alta homologia com a $Pol\eta$ de levedura, foi dado o mesmo nome para essa proteína codificada pelo gene humano *XPV* (Masutani et al., 1999).

Em Agosto do mesmo ano, foi descrita a primeira DNA polimerase mutase de procariotos, através de um estudo sobre a mutagênese resultante da via SOS em *Escherichia coli* (Wagner et al., 1999). Quando essas bactérias são expostas a agentes genotóxicos, ocorre a ativação da via SOS, a qual leva à indução dos genes *recA*, *umuD'*, *umuC* e *dinB* (Fijalkowska et al., 1997). Durante este estudo, Wagner e colaboradores verificaram que o gene *dinB* de *Escherichia coli* era na realidade uma DNA polimerase, a qual sintetiza DNA de forma pouco fiel, o que estaria sendo responsável pelo fenótipo mutador encontrado nestas bactérias. Por ter sido a quarta

DNA polimerase a ser descoberta em organismos procariotos, deram então a essa proteína o nome de Pol IV.

A Pol IV apresenta como características bioquímicas a ausência de atividade revisora (exonuclease 3' - 5'); possui baixa processividade, ou seja, após a incorporação de alguns poucos nucleotídeos ela se desliga do DNA; e possui uma clara tendência a polimerizar em moléculas de DNA que possuem o iniciador e o molde desalinhados (Wagner et al., 1999).

Após esses estudos, vários outros artigos foram publicados neste mesmo ano – bem como nos anos posteriores – descrevendo outras DNA polimerases mutases. A partir de estudos *in vivo*, vários trabalhos vêm mostrando que essas DNA polimerases têm um papel chave em alguns tipos de câncer e que a deleção (mas também a superexpressão) dos genes que codificam tais enzimas pode trazer complicações para o organismo (Bavoux, et al., 2005; O-Wang et al., 2001).

Com base nas relações filogenéticas existentes, todas DNA polimerases foram agrupadas em seis famílias – A, B, C, D, X e Y (Figura 9) (Braithwaite & J. Ito, 1993; H. Ohmori et al., 2001). As DNA polimerases da síntese translesão fazem parte da família Y (DNA polimerases η , ι , κ e Rev1) e da família B (polimerase ζ), diferindo das demais basicamente por possuírem baixa fidelidade, por terem a capacidade de replicar através de lesões no DNA e por possuírem uma baixa processividade (Prakash et al., 2005).

As DNA polimerases da família Y compartilham cinco motivos de seqüências conservadas, bem como uma arquitetura estrutural comum que se assemelha à forma de uma mão. Esta estrutura é formada pelos domínios *fingers*, *palm* e *thumb*, os quais estão diretamente envolvidos na atividade de DNA polimerase (Figura 10B). A porção N-terminal do motivo I e os motivos III e IV formam o domínio *palm*, o qual coordena os dois íons metálicos que ativam a incorporação de nucleotídeos. A porção C-terminal do motivo I e o motivo II formam o domínio *fingers*, envolvido na seleção do nucleotídeo correto a ser incorporado. O motivo V forma o domínio *thumb*, que participa no acoplamento ao DNA (Zhou et al., 2001)

Além destes cinco motivos conservados, as DNA polimerases da família Y apresentam outras particularidades, as quais podem estar presentes em apenas uma

DNA polimerase, ou que pode ser compartilhada por mais de uma. A enzima Rev1, por exemplo, possui uma extensão na porção N-terminal na qual se encontra o domínio BRCT. Este domínio é importante para a regulação da síntese translesão, já que ele se liga a proteínas fosforiladas por ATR e ATM, essenciais para a resposta a estresse durante a replicação celular (Manke et al., 2003). Outras duas regiões conservadas de grande importância são os domínios de ligação ao PCNA e os motivos estruturais dedos de zinco, conhecidos por terem participação no acoplamento de uma proteína ao DNA.

O genoma do *T. cruzi* apresenta os genes que codificam as DNA polimerases η , κ , ζ e Rev1 (El-Sayed et al., 2005; Passos-Silva et al., 2010). A DNA polimerase η de *T. cruzi* (TcPol η) foi caracterizada por Moura e colaboradores (2009) através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foi mostrado que TcPol η é uma DNA polimerase nuclear, sendo que sua superexpressão aumenta a sobrevivência do *T. cruzi* ao tratamento com H₂O₂, e a proteína purificada apresenta a capacidade de sintetizar DNA através de lesões de 8-oxoguanina. Esta DNA polimerase também foi capaz de complementar leveduras mutantes Rad30 (deficientes em Pol η), aumentando a sobrevivência destas leveduras à radiação UV, sugerindo que TcPol η é capaz de sintetizar DNA através de lesões induzidas por UV.

O genoma do *T. cruzi* apresenta duas cópias da DNA polimerase β (DNA polimerases β e β -PAK) as quais também foram caracterizadas. Ambas apresentam localização mitocondrial, embora a TcPol β esteja situada nos sítios antipodais e a TcPol β -PAK apresente uma localização restrita ao centro do cinetoplasto (Lopes et al., 2008). A TcPol β aparentemente é capaz de atuar no BER mitocondrial, uma vez que sua superexpressão aumenta a sobrevivência à H₂O₂ e a proteína purificada possui a atividade de liase e de preenchimento de lacunas (Lopes et al., 2008; Schamber-Reis, dados não publicados). A TcPol β não apresenta atividade de síntese translesão frente a 8-oxoG, aparentando estar restrita ao reparo de DNA. Já a TcPol β -PAK é capaz de sintetizar através de 8-oxoG, realizando ambos os passos de inserção e extensão de nucleotídeos (Lopes et al., 2008).

Família A	Função
Pol γ	replicação do DNA mitocondrial
Família B	
Pol α	replicação do DNA
Pol δ	
Pol ϵ	
Pol ζ	síntese translesão
Família X	
Pol β	reparo por excisão de base
Pol λ	reparo por junção das regiões terminais
Pol μ	
Pol σ	?
TdT	recombinação V(D)J
Família Y	
Pol η	síntese translesão
Pol ι	
Pol κ	
Rev1	

Figura 9 – DNA polimerases em eucariotos. Estas compõem as famílias A, B, X e Y. As famílias C e D, não representadas aqui, são compostas por DNA polimerases de procaríotos e arquea, respectivamente. A família A contém a DNA polimerase mitocondrial γ . A família B contém as DNA polimerases replicativas α , δ e ϵ , além da DNA polimerase de síntese translesão ζ . A família X possui DNA polimerases envolvidas no reparo de DNA, e a família Y apresenta as DNA polimerases da síntese translesão.

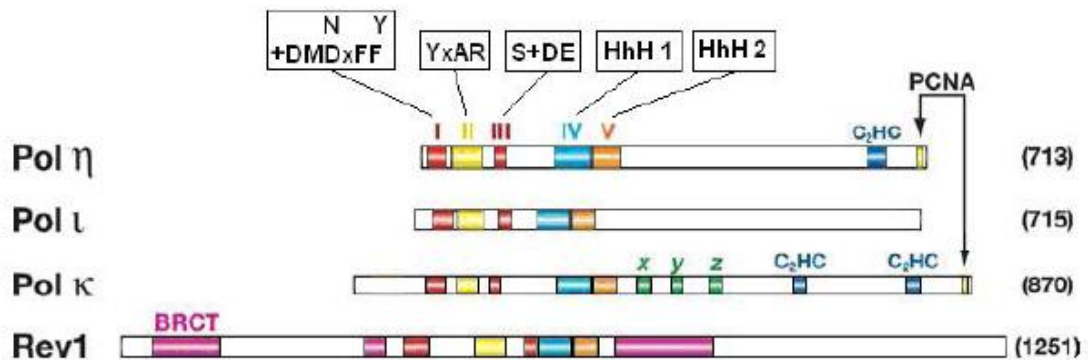
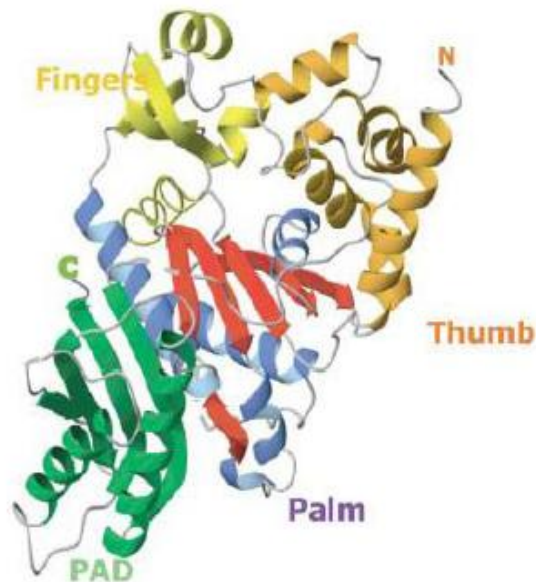
A**B**

Figura 10 – DNA polimerases da família Y. **(A)** As seqüências primárias das DNA polimerases η , ι e κ , e da Rev 1 estão mostradas em branco. Os motivos I a V estão mostrados em cores diferentes, junto com suas seqüências consenso. O símbolo + indica resíduo hidrofóbico; x indica qualquer aminoácido e HhH indica estruturas hélice-grampo-hélice (*helix-hairpin-helix*). A região em rosa representa o domínio de ligação a BRCT. Os motivos específicos de Pol κ estão indicados por x, y e z. As regiões em azul escuro representam domínios de dedos de zinco C₂HC e as regiões na extremidade C-terminal representam domínios de ligação ao PCNA. **(B)** Modelo de uma DNA polimerase da família Y, indicando os domínios *palm*, *fingers*, *thumb* e PAD (adaptado de Prakash et al., 2005).

1.3.2 - DNA polimerase kappa

Na procura por um ortólogo da Pol IV em eucariotos, o grupo de pesquisa liderado por Errol Friedberg clonou os homólogos humano e murino do gene *dinB* de *Escherichia coli*, iniciando o trabalho de caracterização molecular. O gene humano *DINB1* (também denominado *POLK*) se localiza no cromossomo 5q13 e codifica uma DNA polimerase de 870 aminoácidos, à qual se deu o nome de DNA Polimerase kappa (*Polκ*). Essa DNA polimerase possui várias propriedades em comum com a Pol IV de *E. coli*, como por exemplo, a ausência de atividade exonuclease 3' – 5' (V L Gerlach et al., 1999).

A *Polκ* pertence à subfamília DinB da família Y das DNA polimerases, a qual também inclui a Pol IV de *E. coli* e a Dpo4 de arquea. Além dos cinco motivos conservados presentes em todas DNA polimerases da família Y, os membros da subfamília DinB apresentam os motivos conservados *x*, *y*, e *z* (Figuras 10 e 11), que formam o domínio associado a polimerase (PAD, do inglês *Polymerase-Associated Domain*). As DNA polimerases kappa de humano e de outros eucariotos, entretanto, diferem de seus homólogos em procariotos e arquea pela presença de um prolongamento da região amino e da região carboxi-terminal da seqüência protéica (Lone et al., 2007).

Em células humanas, a *Polκ* se distribui uniformemente no núcleo de células não danificadas, porém, também pode ser concentrada em focos de replicação quando essas células sofrem algum dano genotóxico (Bergoglio et al., 2002), característica também compartilhada pelas demais DNA polimerases que realizam síntese translesão.

A *Polκ* difere das outras DNA polimerases da família Y quanto à especificidade de incorporação e na sua habilidade de estender erros de pareamento. Esta enzima é a mais fiel das DNA polimerases mutases na replicação de DNA não-danificado, incorporando nucleotídeos erroneamente com uma freqüência de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-4} (Johnson et al., 2000), freqüência esta menor que a da Pol η , Pol ι , Rev1, e menor até que o ortólogo Dpo4 em arquea (Boudsocq et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Silvian et al., 2001; Trincao et al., 2004). Entretanto, a DNA polimerase kappa tem uma alta capacidade de estender extremidades 3'OH que estão pareadas

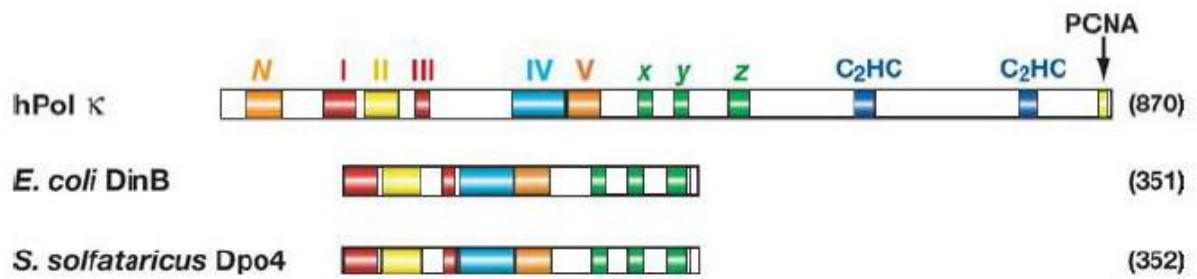


Figura 11 – DNA polimerases da subfamília DinB. As seqüências primárias das proteínas estão representadas em branco. Os domínios presentes em todas DNA polimerases da família Y estão numerados de I a V. Os domínios específicos da subfamília DinB estão representados por x, y e z. A Pol κ de eucariotos também difere dos ortólogos em procariotos e arquea por possuir domínios de dedos de zinco C₂HC, uma extensão N-terminal contendo a região de homologia N. PCNA indica o domínio de interação com PCNA (adaptado de Prakash et al., 2005).

incorretamente (*mismatches*), fazendo isso a uma frequência de 10^{-1} a 10^{-2} (Washington et al., 2002).

Uma de suas características marcantes é a sua tendência a gerar erros de mudança de fase de leitura (*frameshifts*), principalmente por deleção de um nucleotídeo. Esses *frameshifts* são gerados quando essa proteína desloca – para fora da hélice do DNA – o nucleotídeo da fita molde que está pareado errado, fazendo com que o nucleotídeo do iniciador fique corretamente pareado com a próxima base da fita molde (Wofle, et al., 2003).

Uma questão intrigante acerca desta enzima é o fato de que apesar de várias de suas características moleculares terem sido descritas, ainda não se sabe exatamente qual seria sua função biológica. Porém, aspectos ligados à sua expressão protéica e à sua eficiência na replicação através de certas lesões permitiram a formulação de algumas hipóteses.

A Polk possui expressão aumentada nos testículos, ovários e glândulas adrenais (V L Gerlach et al., 1999; T Ogi et al., 2001). Como nestes tecidos ocorre uma alta produção de hormônios derivados do colesterol (tais como testosterona, aldosterona e estrógeno), alguns pesquisadores propuseram que a Polk poderia estar envolvida na replicação de DNA contendo adutos de benzo[a]pireno-dihidrodiol epóxido (BPDE). Esse composto possui grande semelhança química com a molécula de colesterol (da qual ele é um derivado), e a sua ligação à guanina provoca uma distorção espacial na dupla hélice do DNA, impedindo sua replicação normal. De fato, experimentos de síntese translesão *in vitro* mostraram que a Polk é capaz de replicar através deste tipo de lesão (Zhang et al., 2000). O BPDE é um dos compostos químicos presentes nos cigarros, e alguns estudos apontam uma forte associação entre o câncer de pulmão e o aumento da expressão de Polk (O-Wang et al., 2001).

Em uma análise mais precisa da expressão de Polk em testículos de camundongos, foi verificado que seu gene é transcrito em estágios específicos da espermatogênese, sugerindo que esta enzima tenha uma participação especial neste processo. Entretanto, camundongos deficientes em Polk são férteis e viáveis, o que sugere que mesmo que esta DNA polimerase desempenhe um papel específico neste

estágio, sua atividade pode ser sobreposta pela atividade de outra DNA polimerase (Velasco-Miguel et al., 2003).

Pelo fato de que nos tecidos nos quais a Polκ é mais expressa há alta produção de espécies reativas de oxigênio, existem também algumas hipóteses que sugerem que a Polκ seria uma adaptação de células que sofrem alta taxa de danos oxidativos. De fato, camundongos Polκ^{-/-} apresentam um fenótipo mutador ligado ao envelhecimento e acúmulo de lesões endógenas. Em adição a isto, ensaios *in vitro* mostraram que a Polκ possui a capacidade de replicar DNA contendo resíduos de timina glicol, um tipo bem conhecido de lesão oxidativa (Paula L Fischhaber et al., 2002).

Outros estudos *in vitro*, avaliando os tipos de lesões que a DNA polimerase kappa consegue passar, mostraram que esta enzima também é capaz de replicar DNA contendo resíduos de 8-oxoguanina, mas é ineficiente na síntese através de dímeros de timina e TT (6-4) fotoprodutos (Zhang et al., 2000).

Em 2006, o papel biológico de Polκ ganhou um pouco mais esclarecimento, uma vez que foi demonstrado que esta DNA polimerase poderia estar envolvida no NER de lesões causadas por raios UV (Ogi & Lehmann, 2006). Este resultado correlaciona com trabalhos anteriores, os quais mostraram que a sensibilidade de células Polκ^{-/-} ao tratamento com BPDE era similar à sensibilidade observada em células deficientes em XPA, proteína envolvida no NER (Ogi et al., 2002).

Visando aumentar os conhecimentos sobre o metabolismo do DNA do *T. cruzi*, nosso grupo de pesquisa vem investigando os seus mecanismos de reparo de DNA e de suas DNA polimerases envolvidas na síntese translesão. Nesta tese, iniciamos o estudo de uma das cópias do gene *TcPOLK* e investigamos o reparo de DNA do *T. cruzi* através da técnica qPCR e da localização de diversas proteínas envolvidas no reparo.

2. Objetivos

Objetivos gerais

Fazer a caracterização de uma das cópias da DNA polimerase kappa de *T. cruzi* (TcPolκ), abordando suas propriedades moleculares e biológicas. Adicionalmente, examinar o aparecimento e o reparo de lesões no DNA do *T. cruzi*, após tratamento com diferentes agentes genotóxicos.

Objetivos específicos

- Verificar a localização celular de TcPolκ
- Investigar as propriedades bioquímicas de TcPolκ através de ensaios de polimerização *in vitro*.
- Investigar as propriedades biológicas de TcPolκ no *T. cruzi*, através da realização de curvas de sobrevivência a agentes genotóxicos, utilizando parasitos superexpressores de *TcPOLK*.
- Investigar os processos de reparo de DNA do *T. cruzi*, através da quantificação do aparecimento e do reparo de lesões nos genomas nuclear e mitocondrial
- Verificar a localização, em *T. cruzi*, de algumas proteínas envolvidas no reparo de DNA

3. Material e métodos

3.1 - Soluções e meios utilizados

Meio de Cultura 2xYT

16g Bacto-Triptona
10g Extrato de Levedura
5g NaCl
pH 7,0
qsp 1L ddH₂O

Meio de Cultura 2xYT ágar

16g Bacto-Triptona
10g Extrato de Levedura
5g NaCl
15g de ágar bacteriológico
pH 7,0
qsp 1L ddH₂O

Solução estoque de Brometo de etídeo

10mg/mL em ddH₂O

TAE 50X

2M Tris-acetato
0,05M EDTA
pH 8,0

TBE 5X

455mM Tris-borato
10mM EDTA
pH 8,3

SSC 20x

NaCl 3M
Citrato trissódico.2H₂O 0,3M
pH 7,0

MOPS 10x

200mM de MOPS
50mM de Acetato de sódio
10mM EDTA pH 8,0

PSG

NaH₂PO₄ 75mM
NaCl 60mM

ESP

EDTA 0,5M
Lauroyl sarcosine 1%
Proteinase K 0,5mg/mL

TE

1mM de EDTA pH 8,0
10mM de Tris-HCl pH 8,0

PBS

0,15M pH 7,2
0,003M KH₂PO₄
0,092M Na₂HPO₄
0,15M NaCl

LIT

5g Liver Digest Neutralized
4g NaCl

5g Bacto Tryptose
0,4g KCl
8,0g Na₂HPO₄
2,0g de Dextrose
10mL Hemin 0.2%
pH 7,3, qsp 900mL de ddH₂O

EPB

21mM Hepes
137mM NaCl
5mM KCl
0,7 Na₂HPO₄
6mM glicose

Citomix

120mM KCl
1mM CaCl₂
10mM K₂HPO₄
25mM Hepes
2mM EDTA
5mM MgCl₂

3.2 - Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular, a 28 °C, em meio LIT (*liver infusion tryptose*) pH 7,3 suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina (0,2 g/L), e penicilina (200.000 unidades/L). As culturas foram cultivadas até a fase exponencial de crescimento (entre 1×10^7 e 1×10^7 células/mL), mantendo o parasita nesse estágio através de repiques semanais.

3.3 - Extração de DNA total de *T. cruzi*

DNA total foi obtido de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL Brener pelo protocolo de extração com proteinase K - fenol/clorofórmio. Cerca de 1 mL de cultura (a 10^8 células/mL) foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e lavado duas vezes com PBS. Após lavagem, o precipitado foi lisado com 300 μ L de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS), RNase (20 μ g/mL) e incubado por 1 hora a 37 °C. Foi adicionada Proteinase K (100 μ g/mL) e feita incubação por 3 horas a 50 °C. Após incubação, foram adicionados 300 μ L de fenol, agitando em seguida o tubo por 5 minutos e centrifugando-o a 3000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a ela foram adicionados 150 μ L de fenol e 150 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1. Repetiram-se os passos de agitação e centrifugação e em seguida a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Foram adicionados 300 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, agitando o tubo por mais 5 minutos e centrifugando-o novamente a 3000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, a -20 °C *overnight*.

3.4 - Amplificação por PCR para clonagem

Todos os iniciadores utilizados para amplificar os genes investigados nesta tese foram fornecidos pela AlphaDNA ou pela Sigma, e estão listados abaixo, no Quadro 1.

Quadro 1 – Iniciadores usados para clonagem

Iniciador	Seqüência *
PolK30- <i>Xba</i> I-F	5'- <u>TCTAGA</u> AATGCAGCGCTGCTGGGCGAG-3'
PolK30- <i>Eco</i> RI-F	5'- <u>GAATTC</u> ATGCAGCGCTGCTGGGCGAG-3'
PolK30- <i>Xho</i> I-R	5'- <u>CTCGAG</u> CTAAATAGAGAAAAAACAC-3'

PolK30- <i>EcoRI</i> -R	5'- <u>GAATTC</u> AATAGAGAAAAAACAC-3'
PolK30- <i>XbaI</i> -R	5'- <u>TCTAGA</u> AATAGAGAAAAAACAC-3'
PolK30-truncada- <i>XbaI</i> -F	5'- <u>TCTAGA</u> ATGGTGGACATGGACATGTTCTATG-3'
PolK10- <i>XbaI</i> -F	5'- <u>TCTAGA</u> ATGAGTGTGGTAAAAAGCCGCCTTCA-3'
PolK10- <i>EcoRI</i> -R	5'- <u>GAATTC</u> ATCAATCACGATGATGTCGTCACCAC-3'
XPD- <i>XbaI</i> -F	5'- <u>TCTAGA</u> ATGAATACGCTTCAGATTACAAATTCACACAAAT-3'
XPD- <i>EcoRI</i> -R	5'- <u>GAATTC</u> TCCCCGAAGTCGTTTCCTATGC-3'
HR23B- <i>NheI</i> -F	5'- <u>GCTAGC</u> ATGAAGATTGTAAGTGGTCCATTG-3'
HR23B- <i>MfeI</i> -R	5'- <u>CAATTG</u> TTCAAAGAAGTTACTAAAAAGAAGATGAGCCG-3'
ERCC1- <i>XbaI</i> -F	5'- <u>TCTAGA</u> ATGCCTCCACTTCCACGAG-3'
ERCC1- <i>EcoRI</i> -R	5'- <u>GAATTC</u> ATCCGTTGGCGATTCCCTCCT-3'
XRCC3- <i>NheI</i> -F	5'- <u>GCTAGC</u> ATGACGCTTATGCATGC-3'
XRCC3- <i>MfeI</i> -R	5'- <u>CAATTG</u> CAAATCCCCGCGAATACC-3'

* Os sítios de restrição presentes nos iniciadores estão sublinhados

As reações de amplificações por PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) foram feitas em um volume final de 20 μ L, contendo 0,5 μ M dos iniciadores *forward* e *reverse*, 200 μ M de cada dNTP e 0,3 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Phoneutria) em tampão de reação (Tris-HCl 10 mM pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM). As amplificações a partir de DNA genômico foram realizadas adicionando 150 ng de DNA a cada tubo de reação. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador seguindo o programa:

Passo 1: desnaturação (94 °C por 1 minuto)

Passo 2: desnaturação (94 °C por 30 segundos)

Passo 3: anelamento (30 segundos a 52 °C ou 60 °C, dependendo do par de iniciadores usado)

Passo 4: extensão (72 °C por 2 minutos)

Passo 5: voltar 30 vezes ao passo 2

Passo 6: extensão final (72 °C por 10 minutos)

Passo 7: 4 °C indefinidamente

Os produtos amplificados foram visualizados submetendo 1 µL da reação à eletroforese em gel de agarose 1% feito em TAE 0,5 x, previamente corado com brometo de etídio. A eletroforese foi feita a 80 V, por 30 minutos. A visualização dos fragmentos foi feita utilizando luz UV.

3.5 - Clonagens

Os fragmentos amplificados, os respectivos iniciadores usados na amplificação e os vetores nos quais os fragmentos foram clonados estão listados no Quadro 2.

Quadro 2 – Combinação de iniciadores para amplificação dos fragmentos de interesse

Iniciadores utilizados	Vetor onde foi clonado	Finalidade
PolK30- <i>Xba</i> I-F + PolK30- <i>Eco</i> RI-R	pTREX-GFP	Localização
PolK30-truncada- <i>Xba</i> I-F + PolK30- <i>Eco</i> RI-R	pTREX-GFP	Localização
PolK30- <i>Eco</i> RI-F + PolK30- <i>Xba</i> I-R	pMALc2g	Purificação
PolK30- <i>Xba</i> I-F + PolK30- <i>Xho</i> I-R	pROCK-NEO	Superexpressão
PolK10- <i>Xba</i> I-F + PolK10- <i>Eco</i> RI-R	pTREX-GFP	Localização
XPD- <i>Xba</i> I-F + XPD- <i>Eco</i> RI-R	pTREX-GFP	Localização
HR23B- <i>Nhe</i> I-F + HR23B- <i>Mfe</i> I-R	pTREX-GFP	Localização
ERCC1- <i>Xba</i> I-F + ERCC1- <i>Eco</i> RI-R	pTREX-GFP	Localização
XRCC3- <i>Nhe</i> I-F + XRCC3- <i>Mfe</i> I-R	pTREX-GFP	Localização

As clonagens realizadas neste trabalho foram feitas seguindo o mesmo princípio. Os fragmentos amplificados foram purificados do gel de agarose 1% utilizando *kits* de purificação de bandas em gel de agarose (dos fabricantes Promega ou GE). Em seguida, os fragmentos purificados foram clonados, separadamente, no vetor pCR®2.1 pertencente ao kit de clonagem *TA Cloning Kit* (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. Estes vetores de clonagem contendo os insertos foram posteriormente digeridos com as enzimas específicas e os fragmentos liberados foram ligados nos diferentes vetores (pTREX-GFP, pMALc2g ou pROCK-NEO), na proporção de 3 inserto : 1 vetor. As reações de digestão foram feitas por pelo menos 2 horas a 37 °C. As reações de ligação foram feitas utilizando os fragmentos previamente digeridos e purificados, os vetores de interesse previamente digeridos e purificados, a enzima T4 DNA ligase (Jena Bioscience) e seu tampão 10 X (Jena Bioscience). As reações de ligação foram incubadas por 16 horas a 14 °C.

3.6 - Transformação de bactérias

Bactérias *E. coli* DH5 α (F'/endA1 hsdR17 supE44 thi1-1 GyrA relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169deoR RecA) ou BL-21 (F'/dcm ompT hsdS(_{r_B}- m_B-) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S)) foram tornadas eletrocompetentes da seguinte forma:

Cerca de 1 L de cultura com OD₆₀₀ igual a 0,6 foi centrifugada a 7000 x g por 10 minutos, e lavada 3 vezes com 200 mL de glicerol 10%. Em seguida foi feita uma outra lavagem com 50 mL de glicerol 20%. As células foram solubilizadas em 1 mL de glicerol 10% de forma que a diluição 1/10 apresentasse OD600 igual a 0,15. Foram feitas alíquotas de 40 μ L de cultura, as quais foram estocadas a -80 °C.

Cada transformação foi realizada incubando a alíquota com o plasmídeo de interesse, por 5 minutos em gelo. Em seguida, a alíquota foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) e eletroporada a 2,5 kV, em um eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 200 μ L de meio 2xYT, transferindo todo o volume para tubos de 1,5 mL. Após 45 minutos de incubação a 37 °C, a cultura foi plaqueada em meio sólido 2xYT ágar contendo 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C.

3.7 - Seleção de clones contendo o inserto e purificação de plasmídeo

As colônias transformadas foram isoladas da placa e inoculadas em um tubo contendo os reagentes de PCR e os iniciadores específicos, conforme listados anteriormente. Após a reação de PCR, a presença dos insertos de interesse foi avaliada correndo os produtos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Os plasmídeos dos clones selecionados foram extraídos utilizando o *Kit Wizard Mini Prep*, conforme especificação do fabricante. Posteriormente, foi realizada a quantificação do plasmídeo através de leitura no espectrofotômetro.

3.8 - Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento foram preparadas usando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator kit* (GE Healthcare) e seqüenciadas no seqüenciador automático *MegaBace 1000* (GE Healthcare), utilizando 300 ng do DNA e 5 pmol dos iniciadores. As reações foram feitas no termociclador *Mastercycle gradient* (Eppendorf) usando o seguinte programa:

Passo 1: desnaturaçãõ (95 °C por 20 segundos)

Passo 2: anelamento (50 °C por 15 segundos)

Passo 3: extensão (60 °C por 1 minuto) 30 ciclos

Passo 4: desnaturaçãõ, anelamento e extensão final de 10 minutos

Passo 5: 4 °C indefinidamente

Após reação no termociclador, os produtos foram submetidos à precipitação com etanol e aplicados no seqüenciador *MegaBace 1000*, de acordo com as especificações do fabricante.

3.9 - Análise de seqüência e motivos protéicos

A análise de seqüência e de motivos foi realizada usando as interfaces Multalign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Corpet, 1988) e Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Os sinais de endereçamento protéico foram preditos usando as interfaces MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros & Vincens, 1996), Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>; Small et al, 2004), predictNLS (<http://www.predictprotein.org/>; Cokol et al., 2000) e NucPred (<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>; Brameier et al., 2007). A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA 4.0.2. A árvore filogenética foi construída usando o alinhamento de uma porção do sítio catalítico (motivos I – III) dos ortólogos de Polk.

3.10 - Expressão e purificação de MBP-TcPolk-2

A expressão do vetor pMALc2gPolk foi realizada de acordo com o sistema *pMAL™ Protein Fusion and Purification System* (New England Biolabs). O vetor pMALTcPolk foi eletroporado em *Escherichia coli* (BL-21) como descrito anteriormente. Inicialmente foi feita uma expressão em pequena escala, para verificar se o gene *TcPOLK* seria expresso neste sistema. Esta expressão piloto foi feita em 15 mL de meio 2xYT contendo ampicilina (50 µg/mL) em um tubo Falcon de 50 mL. A expressão foi realizada a 30 °C e a indução com IPTG (800 nM) foi realizada quando o meio contendo bactéria atingiu a OD₆₀₀ 0,4. Uma vez verificada a expressão em pequena escala, foi feita a expressão em larga escala. O experimento em larga escala foi realizado no volume de 500 mL de meio 2xYT contendo ampicilina (50 µg/mL) em um erlenmeyer com capacidade para 2 L. A expressão foi realizada a 30 °C e a indução com IPTG (600 nM) foi realizada quando o meio contendo bactéria atingiu a OD₆₀₀ 0,4. Amostras de aproximadamente 1 mL foram retiradas 0, 1 e 3 horas após a indução com IPTG, para corrida em gel desnaturante de poliacrilamida 10%. Após 3 horas de indução, o volume total de meio contendo bactéria (500 mL) foi dividido em duas garrafas para centrifugação e, posteriormente, centrifugado a 4000 x g por 20 minutos a 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos separadamente em 10 mL de

tampão de coluna e transferidos para dois tubos Falcon de 50 mL. A lise celular foi feita tratando as bactérias com lisozima (100 µg/mL), aplicando 3 choques térmicos (-80 °C a 37 °C) e submetendo-as a sonicação (3 ciclos de 3 pulsos de 5 segundos ON e 3 segundos OFF, com 30 segundos entre cada ciclo).

A purificação da proteína em fusão com MBP foi feita por cromatografia em coluna de amilose de acordo com as especificações do fabricante. A visualização da expressão e da purificação de TcPolk foi feita correndo os extratos protéicos em gel desnaturante de poli(acrilamida) 10%, a 120 V por 2 horas. O gel foi corado com azul de Coomassie e descorado com solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30%, em ddH₂O).

3.11 - Substratos para o ensaio de polimerização

Todos oligonucleotídeos usados como substratos foram fornecidos pela AlphaDNA e estão listados no Quadro 3.

Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados para gerar os iniciadores-moldes usados nos ensaios de polimerização

Oligonucleotídeo	Seqüência
M13	5'-fluor-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' *
DloopF	5'-CTTCTCATCTCTCGGTCGTGACTGGGAAAACAAGTGGTCAGTGGT-3'
DloopR	5'-ACCACTGACCACTTACCCCCATTTTCGCTAGTCGAGAGATGAGAAG-3'
SintM138HG	5'-AGTACGATCTCTCGAAGCTGTGGGTCA 8-oxoG GTCGTGACTGGGAAAAC-3' **


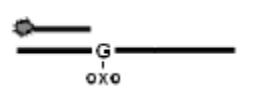

* "Fluor" representa marcação com fluoresceína

** "8-oxoG" representa o nucleotídeo modificado 8-oxoguanina

O anelamento dos oligonucleotídeos foi realizado em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM e EDTA 1 mM, em um volume final de 50 µL. A mistura de

oligonucleotídeos foi aquecida a 80 °C por 5 minutos e resfriada lentamente até atingir 25 °C. A quantidade utilizada de cada oligonucleotídeo nos anelamentos e os respectivos iniciadores-moldes gerados estão listados no Quadro 4.

Quadro 4 – Nome, estrutura e composição dos iniciadores-moldes utilizados nos ensaios de polimerização.

Iniciador molde	Estrutura *	Composição
Oligo controle		M13 (2 μM) + DloopF (5 μM)
poxoG		M13 (2 μM) + SintM138HG (5 μM)
D-loop		M13 (2 μM) + DloopF (5 μM) + DloopR (7,5 μM)

* O círculo cinza indica a marcação com fluoresceína

A pureza da estrutura *D-loop* foi aferida correndo as reações de anelamento em gel não desnaturante de poliacrilamida 10%. Para visualização das bandas referentes aos produtos do anelamento, o gel de poliacrilamida foi corado com prata segundo o seguinte protocolo:

- 10 minutos em solução fixadora (10% etanol, 5% ácido acético)
- descarta a solução e lava com ddH₂O
- 10 minutos em solução de prata (150 mg de nitrato de prata em 150 mL de ddH₂O)
- descarta a solução e lava com ddH₂O
- 10 minutos em solução reveladora (40 g de NaOH, 3 mL de formaldeído 37%, qsp 1000 mL de ddH₂O).

3.12 - Ensaio de polimerização

Os ensaios de polimerização foram realizados de acordo com protocolo descrito por Lopes e colaboradores (2007). Cada reação (10 μ L) continha 200 ng de proteína, 50 nM do iniciador-molde e 200 μ M de dNTP. As reações foram feitas em Tris-HCl 10 mM pH 8,0, ditiotretol 5 mM, albumina sérica bovina 100 μ g/mL, $MgCl_2$ 10 mM e NaCl 50 mM e foram incubadas a 30 °C por 30 minutos. A inativação do ensaio foi feita pela adição de 6 μ L de *stop solution* (formamida deionizada 80%, EDTA 10 mM, pH 8,0, xileno cianol 1 mg/mL e azul de bromofenol 1 mg/mL) aquecidas a 90 °C por 2 min e resfriadas em gelo. Os produtos da reação foram resolvidos em gel desnaturante de poliacrilamida em um seqüenciador automático *ALF DNA sequencer* (GE Healthcare). As análises de incorporação de desoxinucleotídeos foram realizadas usando o programa Allelelinks, versão 1.0 (GE Healthcare).

O experimento de polimerização utilizando o iniciador-molde D-loop foi realizado com as seguintes alterações neste protocolo: para evitar desanelamentos parciais da estrutura *D-loop* – decorrente do armazenamento e descongelamento da mistura contendo o anelado – este ensaio de polimerização foi realizado imediatamente após confirmar a pureza do anelamento por gel de acrilamida 10% não desnaturante.

3.13 - Transfecção de epimastigotas

A transfecção dos plasmídeos foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Cultivou-se a cepa CL Brener em meio de cultura LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino e de estreptomicina (200 μ g/mL). Após atingir a sua fase exponencial de crescimento (concentração final de 1×10^7 células/mL), a cultura foi centrifugada a 3000 rpm, lavada em PBS e em seguida ressuspensa com 400 μ L de tampão para eletroporação. Para realizar a transfecção, utilizou-se entre 50 e 100 μ g dos vetores em um volume final de 50 μ L. Culturas de epimastigotas foram transfectadas em cubetas para eletroporação *Gene Pulser* (Biorad) de 0,2 cm, a uma voltagem de 0,3 KV e capacitância 500 μ F. Aplicou-se 3 pulsos elétricos utilizando o eletroporador *Gene Pulser System* (Biorad).

Após a eletroporação, as cubetas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio de cultura e incubados a 28 °C. No caso dos parasitos transfectados com o vetor pROCKPolκNEO, foi adicionado ao meio 200 µg/mL de G418 (Gibco), 48 horas após a eletroporação.

3.14 - Microscopia confocal

Parasitas epimastigotas transfectados com os vetores pTREX-GFP, pTREX-PolκGFP, ou pTREX-Polκ-truncada-GFP foram coletados 24 horas após eletroporação, centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e lavados em PBS duas vezes. Os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de PBS e fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos a 15 °C. Após outra lavagem com PBS, as células foram tratadas com RNase 0,1 mg/mL por 15 minutos a 37 °C e então incubadas com iodeto de propídeo 0,1 µg/mL por 15 minutos, para marcação do DNA. As células foram novamente lavadas em PBS e aplicadas na lâmina. Junto com as células, foi aplicado glicerol 90%/Tris-HCl 10%, pH 9,0, para aumentar a meia vida da fluorescência. Os pontos de localização de TcPolκ foram visualizados pela auto fluorescência da proteína GFP. As fotografias foram capturadas em um microscópio Zeiss LSM 510 META, utilizando uma objetiva Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. As fluorescências verde e vermelha foram excitadas com 20% da potência dos lasers 488 nm e 543 nm, respectivamente. A imagem foi obtida no modo *single-track*. Em ambos os canais (verde e vermelho) a abertura do *pinhole* foi configurada para gerar uma imagem com menos de 1 *airy unit* de espessura no eixo Z. As imagens foram analisadas usando o programa Zeiss LSM Image Browser software.

3.15 - PFGE e Southern blot

As bandas cromossômicas de *T. cruzi* foram separadas por eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE, do inglês *Pulse Field Gel Electrophoresis*) de acordo com o protocolo descrito por Regis e colaboradores (2006). Células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e lavadas em PBS duas vezes. Cada bloco continha 1×10^7

células em 50 μ L de PSG 2x (0,8% glicose) e 50 μ L de agarose *low melting*. Os blocos foram tratados em ESP por 48 horas e aplicados em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x e submetidos à eletroforese de campo pulsátil no aparelho *GeneNavigator* (Amersham Pharmacia), em tampão TBE 0,5x, à temperatura constante de 8,2 °C. O programa da eletroforese consiste dos seguintes passos:

- pulsos de 90 segundos alternando entre as direções norte/sul e leste/oeste, por 30 horas;
- pulsos de 120 segundos alternando entre as direções norte/sul e leste/oeste, por 30 horas;
- pulsos de 180 segundos alternando entre as direções norte/sul e leste/oeste, por 25 horas;
- pulsos de 210 segundos alternando entre as direções norte/sul e leste/oeste por 25 horas;
- pulsos de 350 segundos alternando entre as direções norte/sul e leste/oeste por 25 horas.

Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídeo. Após ser fotografado, o gel foi tratado com solução de depurinação (HCl 0,25 M) por 30 minutos, em seguida com solução de desnaturação (NaCl 0,5 M, NaOH 0,5 M) por 30 minutos e finalmente com solução de neutralização (Tris-base 1 M, NaCl 0,5 M SSC 2x) por 40 minutos. O DNA contido no gel foi transferido para uma membrana Hybond-N+ (GE Healthcare), por capilaridade, de acordo com protocolo anteriormente descrito

3.16 - Extração de RNA total e *Northern blot*

RNA total foi purificado de epimastigotas selvagens e transfectados com pROCKPol κ NEO, usando o kit RNAeasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O kit consiste na extração por isotiocianato de guanidina. O *Northern blot* foi feito de acordo com protocolo anteriormente descrito (Ausubel et al., 1997). Após extração do RNA total, foi feita eletroforese em gel de agarose (1,2% agarose e 2% formaldeído em tampão MOPS 1x). O gel foi tratado por 20 minutos em SSC 10x e posteriormente transferido para uma membrana Hybond-N+ (GE Healthcare), por capilaridade.

3.17 - Hibridização e blotting

A sonda de *TcPOLK* foi obtida digerindo o vetor pROCKPolκNEO com as enzimas *XbaI* e *XhoI* e purificando a banda referente à *TcPOLK* por eletroforese em gel de agarose. A marcação da sonda com [α - 32 P]dCTP foi feita usando o *Kit MegaPrimer* (Amershan), conforme especificações do fabricante. As membranas de *Southern* e *Northern blot* foram submetidas 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 (Amershan Biosciences).

3.18 - Tratamentos com agentes genotóxicos para curvas de sobrevivência e crescimento

Todos os experimentos descritos abaixo foram feitos em triplicata e as contagens foram feitas em uma câmara citométrica, usando corante vital (eritrosina) para diferenciar células vivas e mortas.

3.18.1 - Tratamento com H₂O₂

Garrafas contendo 3 mL de cultura com 1×10^7 células/mL foram tratadas com 0, 150 e 300 μ M de H₂O₂ e contadas após 48 horas.

3.18.2 - Exposição à radiação gama (γ)

Garrafas contendo 5 mL de cultura com 1×10^7 células/mL foram expostas a 0 e 500G γ de radiação gama proveniente de uma fonte cobalto (60 Co), disponível no CDTN/UFMG. A exposição foi feita a uma taxa de 1578 G γ /h por 0 e 19 min, com a supervisão do técnico Ricardo Ferracini. A concentração de parasitas foi contabilizada durante 20 dias após a irradiação.

3.18.3 - Tratamento com zeocina

Garrafas contendo 3 mL de cultura com 1×10^7 células/mL foram tratadas com 0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ e contadas após 4 dias.

3.18.4 - Tratamento com metil metanosulfonato (MMS)

Garrafas contendo 3 mL de cultura com 1×10^7 células/mL foram tratadas com 0, 0,15 e 0,30 mM de MMS e contadas após 48 horas.

3.18.5 - Tratamento com benzonidazol (BZ)

Garrafas contendo 3 mL de cultura com 1×10^7 células/mL foram tratadas com 0, 60, 120 e 240 μM de BZ e contadas após 48 horas.

3.19 - Análise do número de lesões por qPCR

3.19.1 - Tratamentos genotóxicos para análise de número de lesões

Todos os tratamentos com agentes químicos foram realizados seguindo o mesmo procedimento básico, descrito a seguir. Cultura de parasitos contendo 1×10^7 células foram coletadas através de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Para cada ponto do experimento, 5 mL 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 do agente químico ao PBS, durante um período específico de tempo. 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°C para posterior extração do DNA.

3.19.1.1 - Tratamento com MMS

O tratamento com metil metanosulfonato (MMS) para o experimento de dose-resposta foi realizado incubando os parasitos por 60 minutos com 0, 0,5, 1, 1,5 e 2 mM de MMS. No experimento de reparo de DNA, os parasitos foram incubados com 1,5 mM de MMS por 60 minutos.

3.19.1.2 - Tratamento com H₂O₂

O tratamento com H₂O₂ para o experimento de dose-resposta foi feito incubando os parasitos por 15 minutos com 0, 50, 100, 200 ou 400 µM de H₂O₂. O experimento de reparo de DNA foi realizado incubando os parasitos com 200 µM de H₂O₂ por 15 minutos. Alternativamente, posteriormente foi feito um tratamento com 200 µM de H₂O₂ por 20 minutos.

3.19.1.3 - Tratamento com cisplatina

O experimento de dose-resposta foi feito incubando os parasitos por 60 minutos com 0, 50, 100, 200 e 400 µM de cisplatina. O experimento de reparo de DNA foi realizado incubando os parasitos com 300 µM de cisplatina por 60 minutos.

3.19.1.4 - Tratamento com radiação UV

O tratamento com radiação UV foi feito irradiando uma placa de Petri contendo os parasitos em meio de cultura. A irradiação foi feita em um UV Crosslinker (FisherBiotech) previamente esterilizado. As células foram irradiadas com 1500 J/m² de UVC e coletadas imediatamente ou deixadas para recuperar por até 24 horas.

3.19.2 - 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 longos fragmentos 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 DNA. 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 °C *overnight*. Após as etapas de lavagem com etanol 70%, as amostras de DNA ficaram dissolvendo em 50 µL de TE por pelo menos 2 dias a 4 °C.

3.19.3 - Dosagem das amostras de DNA

Após a extração de DNA, as amostras tiveram suas concentrações acertadas para 3 ng/ μ 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/ μ 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%.

3.19.4 - Amplificação por qPCR

Ensaio de quantificações de lesões é realizado comparando 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 é 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 no quadro abaixo.

Quadro 5 – Iniciadores usados no ensaio de qPCR

Iniciadores	Seqüência
QPCRNuc2F	5'-GCACACGGCTGCGAGTGACCATTCAACTTT-3'
QPCRNuc2R	5'-CCTCGCACATTTCTACCTTGTCCTTCAATGCCTGC-3'
QPCRNuc2Int	5'-TCGAGCAAGCTGACACTCGATGCAACCAAAG-3'
QPCRMitF	5'-TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG-3'
QPCRMitR	5'-TTGAACTGCTTTCCCAAACGCC-3'
QPCRMitInt	5'-CGCTCTGCCCCATAAAAAACCTT-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.

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 μL : 9,6 μL de ddH₂O, 15 μL de 3.3x Buffer, 5 μL de BSA (1 mg/mL), 4 μL de dNTP (2,5 mM cada nucleotídeo), 2,4 μL de MgO(Ac)₂ (25 mM), 2 μL de iniciador *forward* (10 μM), 2 μL de iniciador *reverse* (10 μM). A DNA polimerase é adicionada depois (*hot start*), em seu devido tampão, e as quantidades para cada reação de 50 μL são: 0,5 μL de *rTth XL DNA Polymerase*, 3,13 μL de ddH₂O e 1,36 μL 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 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: 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.

3.19.5 - 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 $-\ln$ (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.

3.20 - Análise do consumo de oxigênio

Células foram tratadas com 200 μM de H_2O_2 , como descrito no ensaio de análise lesões. A análise do consumo de oxigênio basal (OCR, do inglês *oxygen consumption rate*) foi realizada como descrito por Qian e Van Houten (2010). A OCR foi medida em tempo real utilizando o analisador de fluxo extracelular *Seahorse Bioscience XF24* (Billerica). Após o tratamento, as células foram colocadas em placas de XF de 24 poços (5×10^6 células por poço), de forma a se aderirem ao fundo da placa. As células foram lavadas em meio DMEM não-tamponado e incubadas a por 1 hora a 37 °C na ausência de CO_2 , em meio DMEM não-tamponado suplementado com GlutaMax-1 (200 mM), glicose (25 mM), cloreto de sódio (32 mM) e vermelho fenol. A OCR basal foi medida e os resultados foram analisados utilizando o algoritmo descrito por Gerencser e colaboradores (2009).

3.21 - Microscopia óptica

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas com diferentes construções do vetor pTREX-GFP contendo os genes de interesse em fusão com GFP (pTREX-HR23B-GFP, pTREX-XPD-GFP, pTREX-ERCC1-GFP e pTREX-

XRCC3-GFP). Após 24 horas, as células foram coletadas através de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e foram lavadas em PBS duas vezes. Os precipitados foram ressuspendidos em PBS e fixados em paraformaldeído 2% gelado por 20 minutos. Em seguida, as células foram deixadas aderindo a lâminas de poli-L-lisina por 15 minutos. As células foram então lavadas 3 vezes em PBS (na própria lâmina), permeabilizadas com Triton X-100 (0,3% em PBS) por 3 minutos, e depois foram lavadas novamente por 3 vezes. As células foram bloqueadas com albumina sérica bovina (3% em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Os parasitos transfectados com pTREX-ERCC1-GFP e pTREX-XRCC3-GFP foram incubados com o anticorpo de camundongo anti-Hsp70 (1:5000), diluído em PBS contendo 3% de albumina sérica bovina, por 1 hora para marcação do citoplasma, e em seguida foram incubadas com Alexa-fluor 546 conjugada a um anticorpo anti-IgG de camundongo a uma diluição de 1:1000 por 40 minutos. Todas as células foram lavadas com PBS e coradas com 1 μ M 4,6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) antes de serem cobertas com o meio Vectashield (Vector Laboratories). As células foram visualizadas com um microscópio motorizado Olympus IBX-81. As imagens foram processadas por deconvolução usando o programa Autoquant X 2.

4. Resultados

4.1 – Análise *in silico* do gene *TcPOLK*

O Projeto Genoma do *T. cruzi* revelou que este organismo possui duas cópias do gene *TcPOLK* (El-Sayed et al., 2005). Visando investigar o papel de TcPolκ no *T. cruzi*, nós decidimos estudar uma das cópias deste gene (<http://www.tritrypdb.org>, nº de acesso Tc00.1047053503755.30), a qual nesta tese inicialmente será chamada de *TcPOLK-2* por se localizar à 3' da outra cópia (*TcPOLK-1*). A Figura 12 mostra o alinhamento da seqüência deduzida dos aminoácidos de TcPolκ-2 com vários outros integrantes da subfamília DinB, incluindo a outra cópia de TcPolκ (TcPolκ-1; nº de acesso Tc00.1047053503755.10) e seus ortólogos de *L. major* e *T. brucei*. Para facilitar a interpretação do alinhamento, nós mostramos apenas uma das cópias dos ortólogos presentes em *T. brucei* e *L. major*. Como visto no alinhamento, as duas cópias de TcPolκ contém todos os motivos protéicos conservados que caracterizam as DNA polimerases da família Y (motivos I, II, III, IV e V), bem como os motivos x, y e z que são específicos dos ortólogos de Polκ. Assim como os ortólogos encontrados em outros eucariotos, as duas cópias de TcPolκ possuem uma extensão N-terminal, incluindo a região de homologia denominada motivo N. Entretanto, suas regiões C-terminais são mais semelhantes aos homólogos de procariotos e arquea, uma vez que estas DNA polimerases também não apresentam os motivos de dedos de zinco C₂HC (Figura 12, 13 e 14). Nós não encontramos um possível domínio de interação com PCNA nas seqüências de TcPolκ, embora a extremidade C-terminal de TcPolκ-2 apresente dois resíduos de fenilalanina, o qual também está presente no domínio de ligação a PCNA de várias proteínas, incluindo a Polκ de humano (Figura 12).

Através de análise *in silico*, verificamos que TcPolκ-2 possui um sinal putativo de endereçamento para a mitocôndria na região N-terminal, bem como um sinal putativo de endereçamento para o núcleo localizado entre os resíduos 72 e 100 (Figura 12). Porém, a análise de sinais de endereçamento celular em TcPolκ-1 não resultou em nenhuma predição conclusiva (Figura 12).

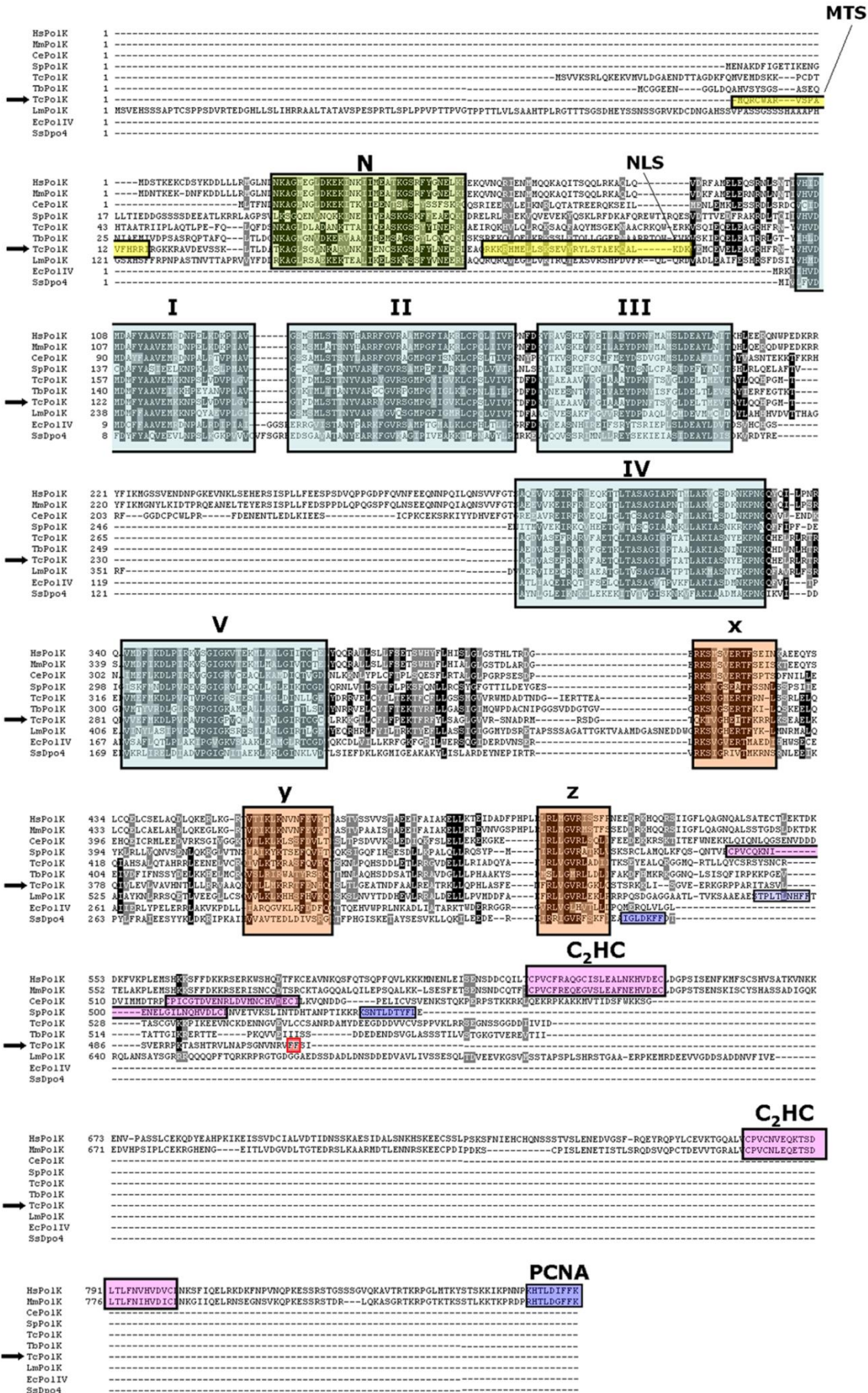


Figura 12 (página anterior) – Alinhamento das duas cópias de TcPolκ com vários ortólogos em outros organismos. Retângulos preenchidos representam regiões de homologia. Os retângulos I – V representam motivos da família Y. Retângulos x, y e z representam motivos específicos da subfamília DinB. N indica a região conservada nas extensões N-terminais dos ortólogos eucarióticos de Polκ. A seta indica a cópia de TcPolκ estudada nesta tese (TcPolκ-2). Os motivos dedos de zinco estão representados por C₂HC. PCNA indica o domínio de interação a PCNA. O retângulo em vermelho destaca os dois resíduos de fenilalanina na extremidade C-terminal de TcPolκ-2. MTS, sinal de endereçamento mitocondrial; NLS, sinal de localização nuclear. Hs, *Homo sapiens*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Lm, *Leishmania major*; Tb, *Trypanosoma brucei*; Tc, *Trypanosoma cruzi*; Ec, *Escherichia coli*; Ss, *Sulfolobus solfataricus*.

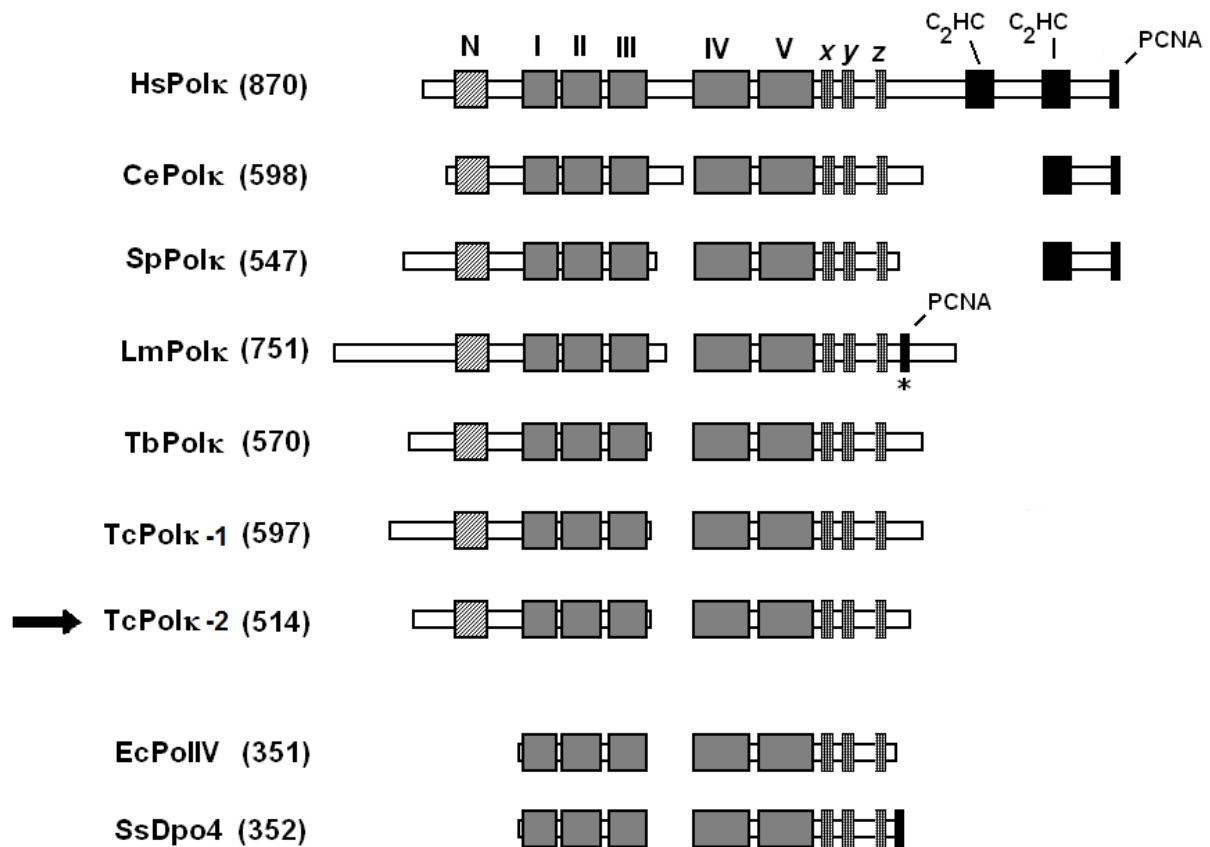


Figura 13 – Alinhamento esquemático das duas cópias de TcPolκ com vários ortólogos. Retângulos preenchidos representam regiões de homologia. Os retângulos I – V representam motivos da família Y. Retângulos x, y e z representam motivos específicos da subfamília DinB. N indica a região conservada nas extensões N-terminais dos ortólogos eucarióticos de Polκ. A seta indica a cópia de TcPolκ estudada nesta tese (TcPolκ-2). Os motivos dedos de zinco estão representados por C₂HC. PCNA indica o domínio de interação a PCNA. Asterisco indica putativo. Hs, *Homo sapiens*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Lm, *Leishmania major*; Tb, *Trypanosoma brucei*; Tc, *Trypanosoma cruzi*; Ec, *Escherichia coli*; Ss, *Sulfolobus solfataricus*.

4.2 – Comparação entre as duas cópias de *TcPOLK*

As duas cópias do gene *TcPOLK* distanciam uma da outra por aproximadamente 1500 pb e estão separadas por um gene de função desconhecida (www.tritrypdb.org). O alinhamento entre as duas cópias de TcPolκ mostrou que estas duas DNA polimerases possuem regiões catalíticas praticamente idênticas (Figura 14). Entretanto, as seqüências que residem fora dos motivos I – V possuem menor similaridade. A TcPolκ-1 apresenta regiões N e C-terminais ligeiramente maiores, embora também não apresente os motivos de ligação a zinco C₂HC nem motivos conservados de interação a PCNA. Diferentemente da outra cópia, TcPolκ-1 não possui os dois resíduos de fenilalanina na extremidade C-terminal. Também foi realizada uma análise filogenética das duas cópias de TcPolκ com os seus ortólogos. Esta análise mostrou que – de forma semelhante aos próprios tripanosomatídeos – as Polκ pertencentes aos organismos tripanosomatídeos divergiram antes dos outros correspondentes eucarióticos (Figura 15).

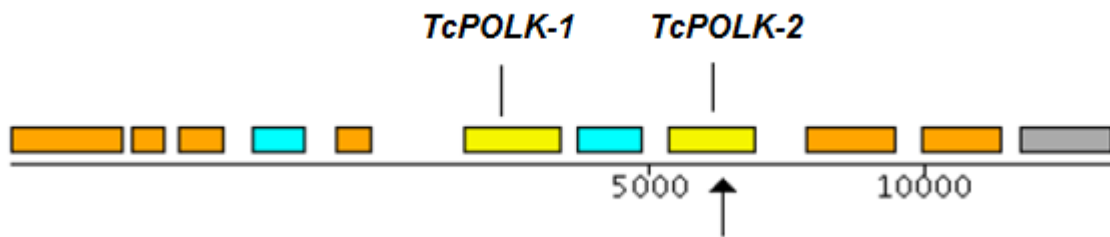
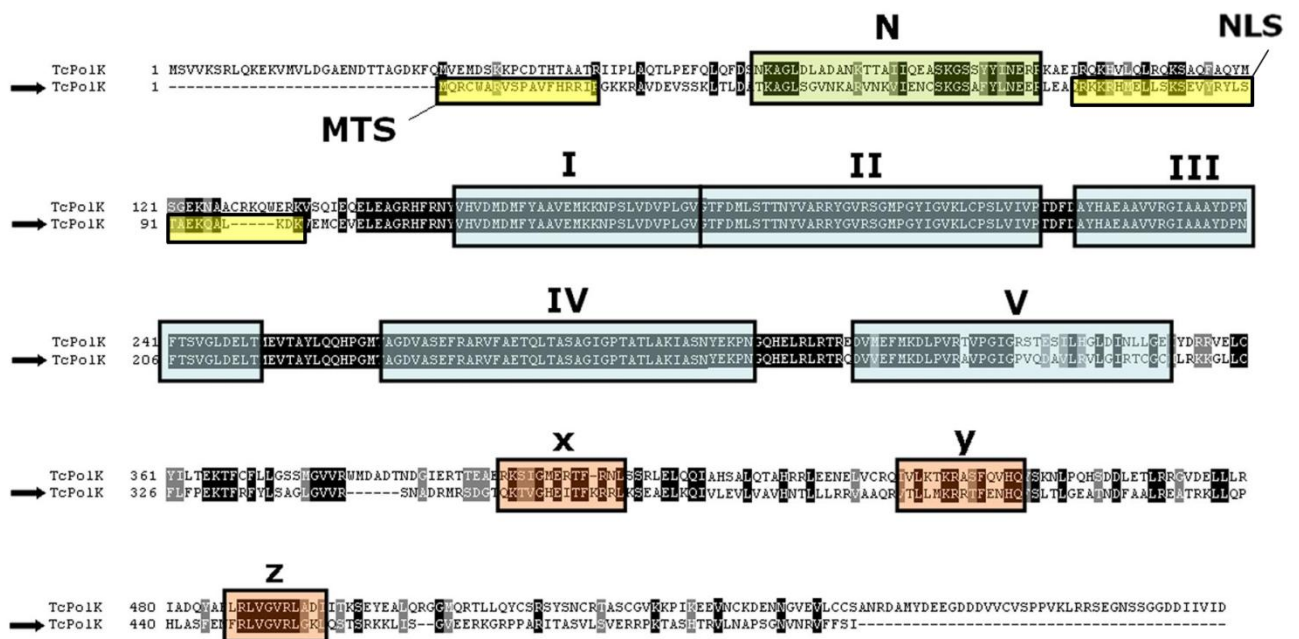
A**B**

Figura 14 – Comparação entre as cópias de *TcPOLK*. (A) Figura esquemática mostrando a posição das duas cópias de *TcPOLK* no genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*. A seta indica a cópia estudada nesta tese (*TcPOLK-2*). (B) Alinhamento entre as duas cópias de *TcPOLK*. As setas indicam a cópia de *TcPOLK* estudada nesta tese (*TcPOLK-2*). Os alinhamentos foram gerados usando as interfaces Multalin e Boxshade. Os resíduos destacados em preto indicam aminoácidos idênticos. Resíduos destacados em cinza indicam aminoácidos similares. Retângulos destacados em azul claro indicam motivos I – V específicos da família Y. Retângulos destacados em verde indicam o motivo N. Os motivos x, y e z são indicados por retângulos vermelhos. Os sinais putativos de endereçamento celular são indicados pelos retângulos amarelos: MTS, sinal de endereçamento mitocondrial.

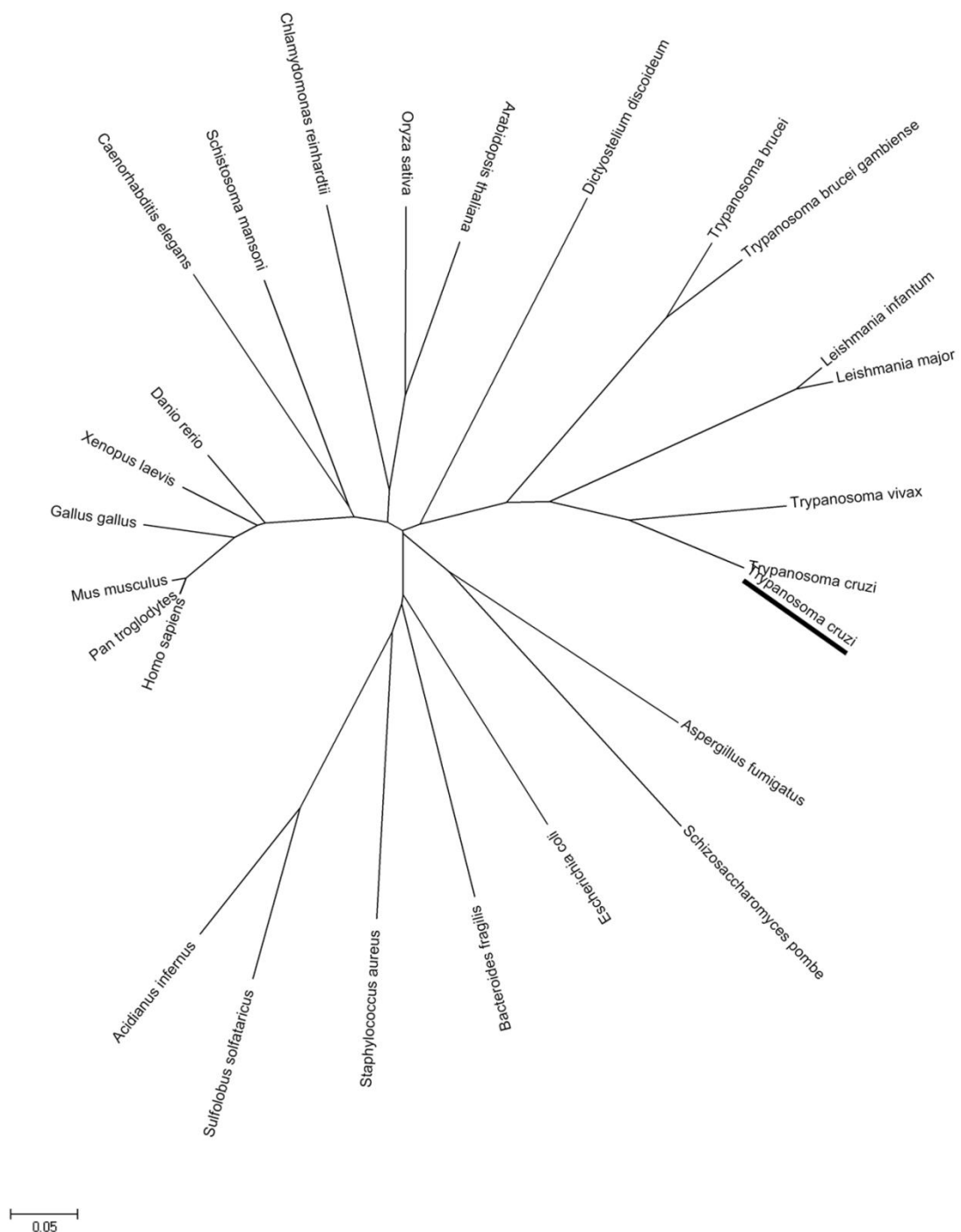


Figura 15 – Árvore filogenética construída com as seqüências de vários ortólogos de Polk. A árvore filogenética foi obtida através do alinhamento da região contendo apenas o cerne catalítico (entre os motivos I e III) dos diferentes ortólogos de Polk. A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA 4.0.2. Na árvore é possível observar que os tripanosomatídeos formam um grupo separado dos demais eucariotos. O sublinhado indica a cópia de TcPolk que foi estudada nesta tese (TcPolk-2).

4.3 - Localização celular de TcPolκ-2

A presença de dois sinais putativos de endereçamento protéico na seqüência de TcPolκ-2 nos levou a investigar qual seria sua localização celular no *T. cruzi*. Para isto, nós construímos o vetor pTREX-Polκ-GFP (Figura 16), o qual expressa transientemente a TcPolκ-2 com a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) fusionada a sua extremidade C-terminal. Paralelamente, construímos vetores contendo seqüências truncadas de TcPolκ-2, sendo que em uma destas o sinal de endereçamento mitocondrial foi retirado e na outra ambos os sinais mitocondrial e nuclear estavam ausentes.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas com os diferentes plasmídeos construídos, incluindo o controle pTREX-GFP – o qual expressa GFP não modificada. Vinte e quatro horas após a transfecção, os parasitos foram analisados por microscopia confocal. A Figura 17A mostra uma representação esquemática da forma epimastigota do *T. cruzi*, onde estão assinalados o núcleo e a mitocôndria única com o seu cinetoplasto. Parasitos transfectados com o vetor pTREX-GFP apresentaram fluorescência verde difundida em todo o seu corpo celular (Figura 17B), enquanto parasitos expressando o vetor pTREX-Polκ-GFP apresentaram fluorescência apenas na região do cinetoplasto (Figura 17C). A análise de vários parasitos em diferentes campos microscópicos revelou que a localização de TcPolκ-2 é maior – e às vezes restrita – nos flancos do cinetoplasto (Figura 17C). Estes flancos possuem um padrão de localização que é semelhante aos sítios antipodais, onde algumas etapas da replicação do kDNA ocorre.

Para verificar se o endereçamento de TcPolκ-2 para a região do cinetoplasto é dependente do sítio de endereçamento mitocondrial, transfectamos o parasito com vetores que apresentavam as versões truncadas de TcPolκ-2. Como podemos verificar na Figura 17D, os parasitos transfectados com o vetor contendo a seqüência de TcPolκ-2 sem nenhum dos sítios de endereçamento celular apresentam TcPolκ-2 difundida em todo o corpo celular. Já a transfecção com o vetor que possuía TcPolκ-2 contendo apenas o sinal nuclear não resultou em nenhuma visualização de fluorescência (dados não mostrados).

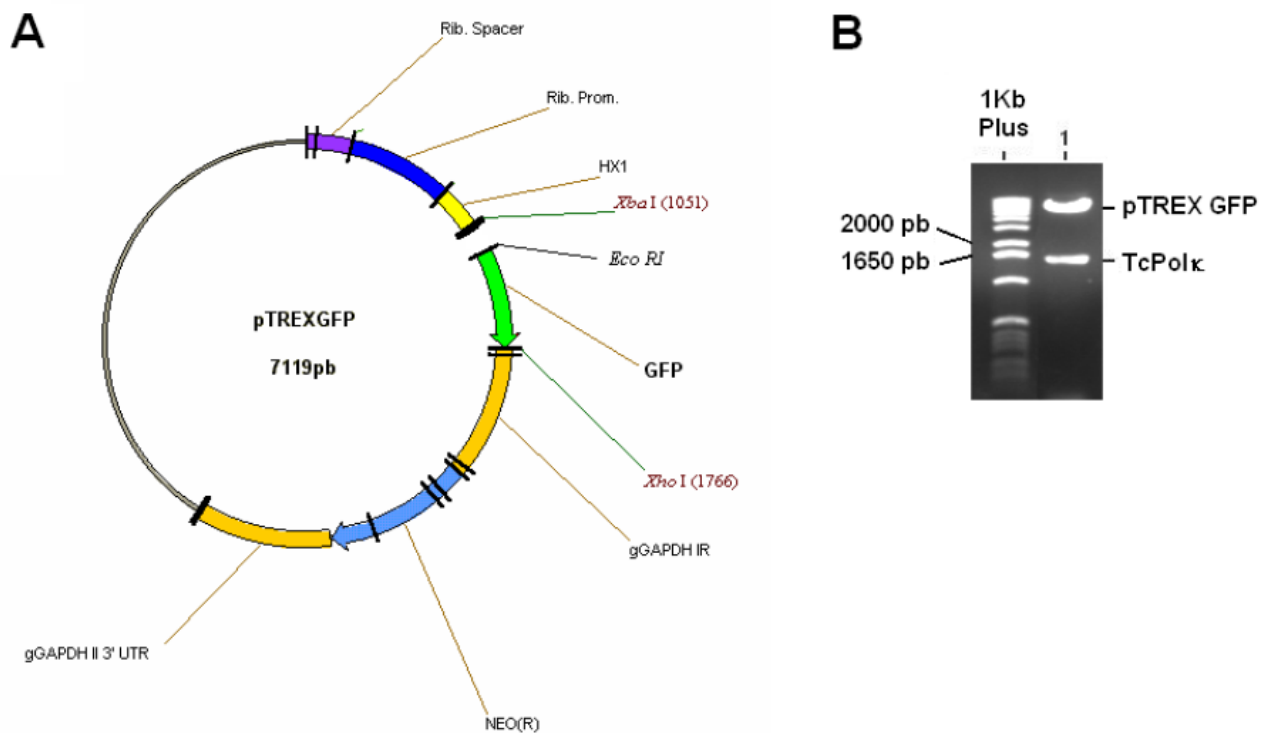


Figura 16 – Clonagem no vetor pTREX-GFP (A) Representação esquemática do vetor pTREX-GFP, o qual permite que o gene de interesse seja clonado em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP), entre os sítios *XbaI* e *EcoRI*. Sua expressão é intensificada pela presença do promotor ribossômico. **(B)** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando digestão do vetor pTREX-Polκ-GFP, liberando o gene *TcPOLK-2* (canaleta 1).

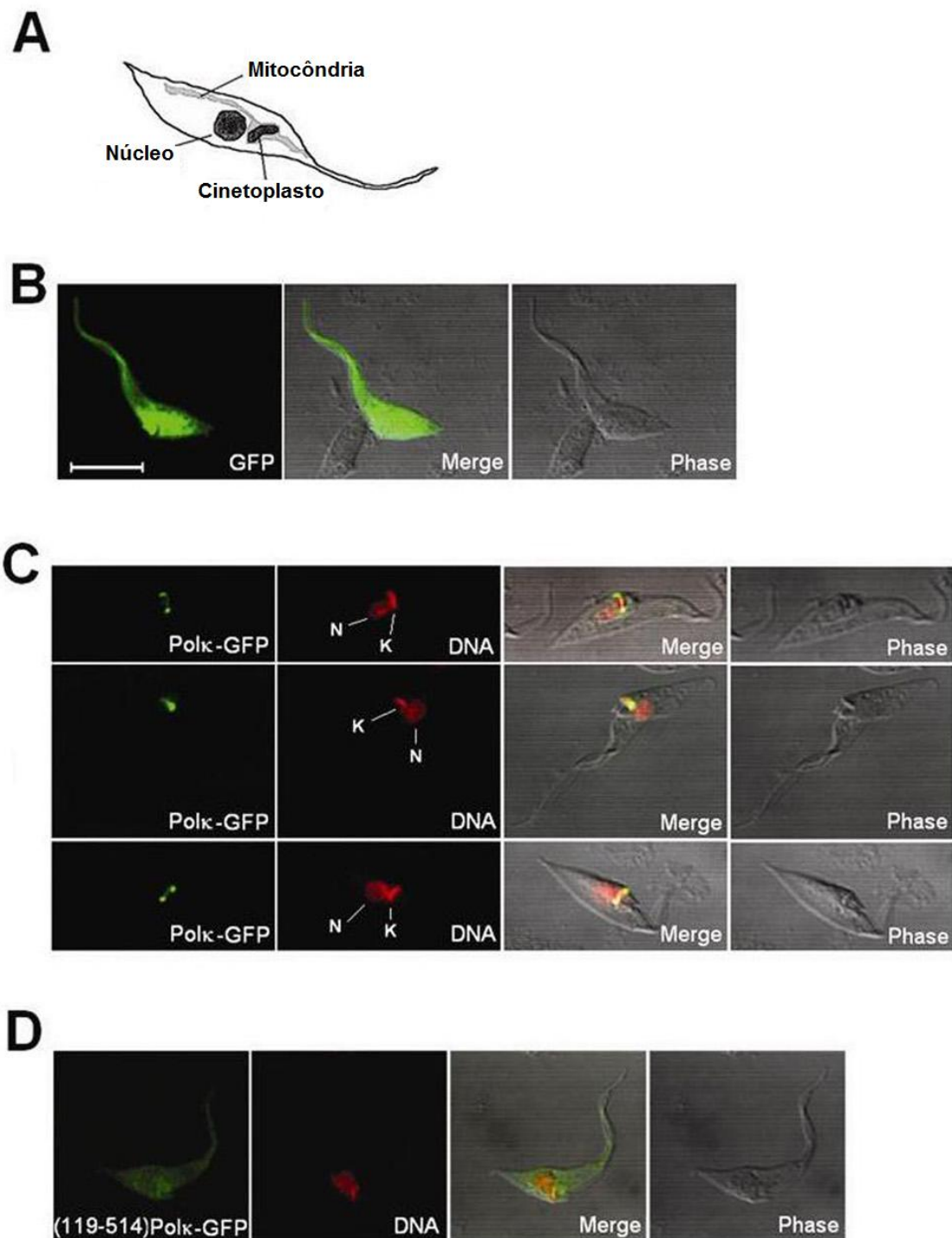


Figura 17 – Localização subcelular de TcPolκ-2. (A) representação esquemática da forma epimastigota de *T. cruzi*. (B – D) Células transfectadas com diferentes plasmídeos para expressão de GFP (B), TcPolκ-GFP (C), TcPolκ-truncada-GFP (D). O DNA foi corado com iodeto de propídeo, e as imagens visualizadas em um microscópio confocal LSM 510 META. K, cinetoplasto. N, núcleo. Merge: sobreposição das imagens. Phase: imagem em contraste de interferência diferencial. Barra, 10 μM.

4.4 - TcPolκ-2 possui atividade de DNA polimerase

Para determinar se o gene *TcPOLK-2* codifica uma DNA polimerase, foi feita a clonagem deste gene no vetor pMALc2g (Figura 18). Este vetor permite que o gene de interesse seja expresso em fusão com a porção C-terminal da proteína de ligação a maltose (MBP, do inglês *maltose binding protein*). A expressão heteróloga do gene *TcPOLK-2* em *Escherichia coli* (BL-21) foi observada em extratos protéicos totais da bactéria separado em gel de poliacrilamida 10% (Figura 19A). Uma vez confirmada a expressão, foi feita a purificação do produto protéico por cromatografia de afinidade em coluna de amilose. A fração eluída foi visualizada em gel de poliacrilamida 10%, no qual foi possível verificar a purificação de MBP-TcPolκ-2 (Figura 19B). A atividade de DNA polimerase foi testada de acordo com a metodologia descrita por Lopes e colaboradores (Lopes et al., 2007). Um iniciador M13 marcado com fluorescência na extremidade 5' foi anelado ao molde DloopF e posteriormente usado como substrato. Os produtos da reação foram resolvidos em gel desnaturante de poliacrilamida no seqüenciador automático ALF. Em uma reação controle contendo Mg⁺² e dNTPs, o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* estendeu o iniciador eficientemente (Figura 20, canaleta 6). A proteína de fusão MBP-TcPolκ-2 foi capaz de estender o iniciador-molde de maneira dose-dependente (Figura 20, canaletas 3 – 5), indicando que o gene *TcPOLK-2* codifica uma proteína com atividade de DNA polimerase. A MBP foi usada como controle negativo no ensaio de polimerização, tendo sido purificada seguindo o mesmo procedimento empregado na purificação de TcPolκ-2. Como esperado, a MBP não estendeu o iniciador-molde (Figura 20, canaleta 2), confirmando que a atividade de DNA polimerase anteriormente observada é intrínseca à TcPolκ-2.

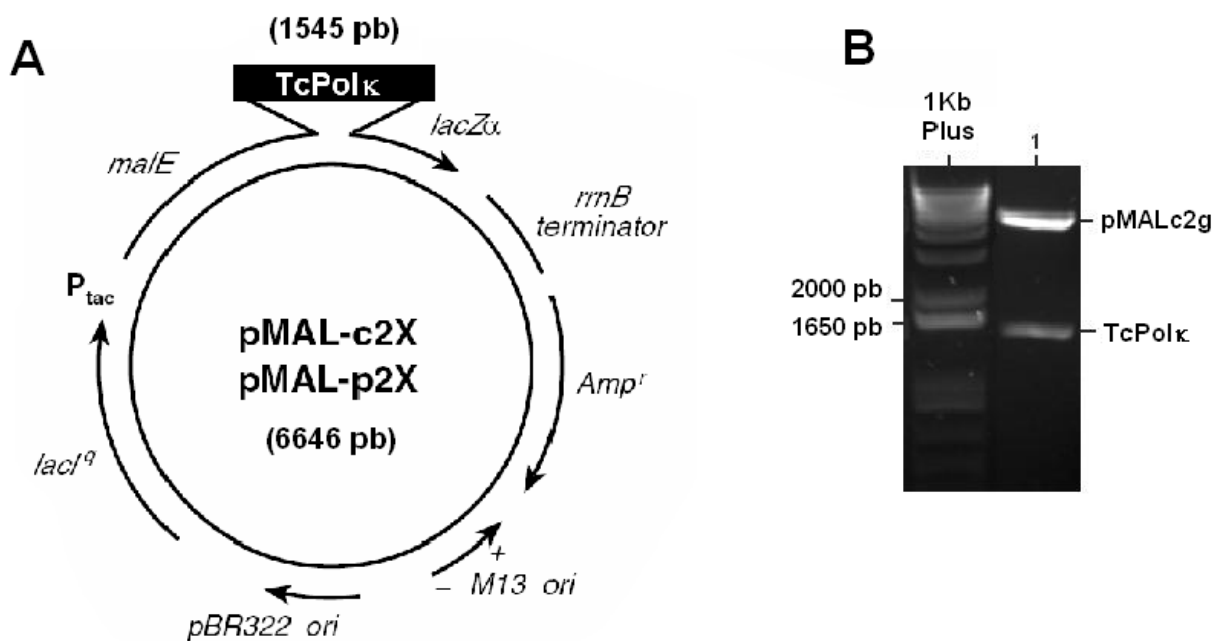


Figura 18 – Clonagem no vetor pMALc2g. (A) Representação do plasmídeo pMALc2g, o qual permite que o gene de interesse seja expresso em fusão com MBP. Sua seqüência apresenta o gene de resistência à ampicilina. A proteína MBP é codificada pelo gene *malE*. A clonagem do gene de interesse inibe a expressão do gene *lacZα*, codificador da α complementação da enzima β -galactosidase. O sítio onde o gene *TcPOLK-2* foi clonado está indicado. (B) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando digestão do vetor pMALc2g-TcPol κ , liberando o gene TcPol κ -2 (canaleta 1).

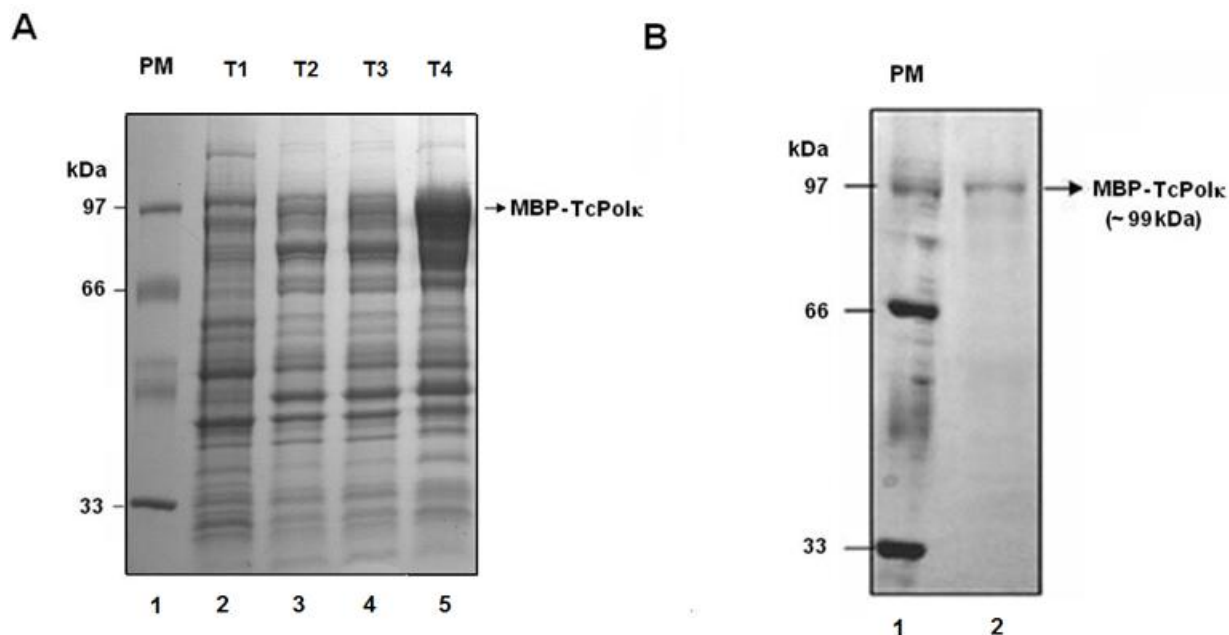


Figura 19 – Obtenção da proteína recombinante. Expressão e purificação de TcPolκ-2 fusionada a MBP, analisada em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Coomassie. **(A)** Expressão de MBP-TcPolκ-2. Canaleta 1, marcador de peso molecular (PM). Canaleta 2, 0 hora após indução. Canaleta 3, 1 hora após indução. Canaleta 4, 3 horas após indução, Canaleta 5, 4 horas após indução. **(B)** Purificação de MBP-TcPolκ-2. Canaleta 1, marcador de peso molecular (PM). Canaleta 2, fração eluída contendo MBP-TcPolκ-2 purificada.

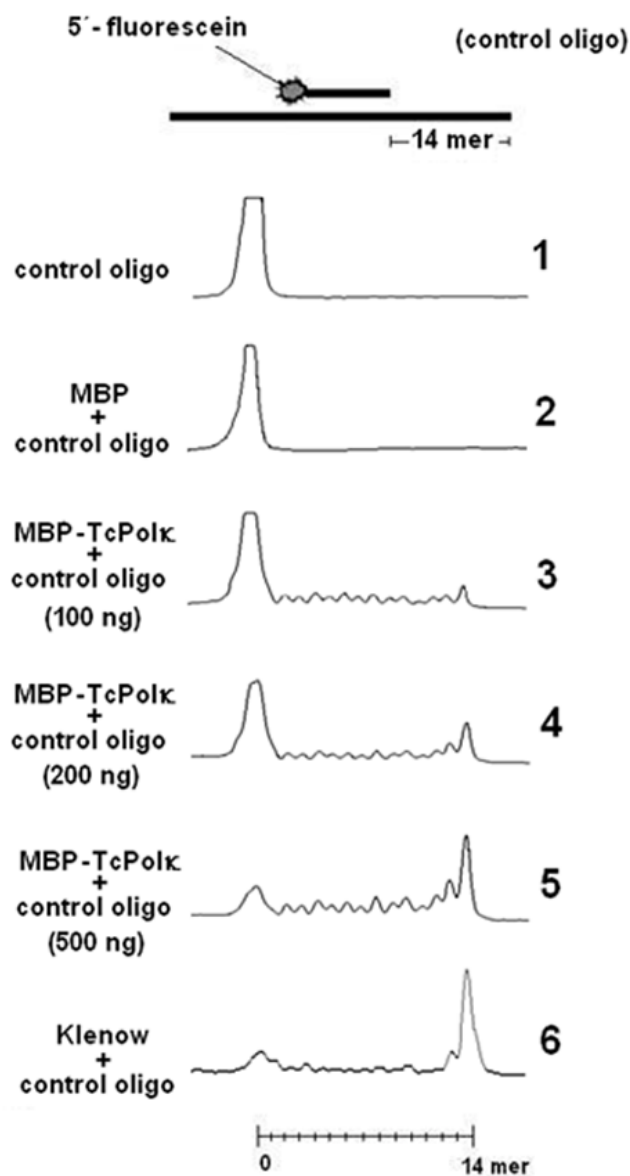


Figura 20 – Atividade de DNA polimerase de MBP-TcPolk-2. O iniciador-molde usado como substrato está esquematicamente representado (oligo controle, ou *control oligo*). Canaleta 1, oligo controle. Canaleta 2, 1 µg de MBP incubada com o oligo controle. Canaleta 3 – 5, MBP-TcPolk-2, nas quantidades indicadas, incubada com o oligo controle. Canaleta 6, fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* (10 unidades) incubada com o oligo controle. Os produtos de DNA foram resolvidos em um gel de poliacrilamida desnaturante, em um seqüenciador automático ALF. As análises de incorporação de nucleotídeos foram realizadas usando o programa Allelinks.

4.5 - Obtenção de parasitos superexpressando *TcPOLK-2*

Uma vez confirmado que o produto do gene *TcPOLK-2* é de fato uma DNA polimerase, decidimos investigar em quais processos bioquímicos esta proteína poderia estar atuando. Uma estratégia eficiente para a caracterização de um gene é examinar os efeitos resultantes da eliminação da expressão do gene de interesse. Em *T. cruzi*, no entanto, a construção de uma cultura *knockout* seria extremamente difícil de se conseguir, uma vez que o gene *TcPOLK* apresenta duas cópias, as quais estão intercaladas por um gene de função desconhecida. Por outro lado, a realização de um *knockdown* por silenciamento de RNA também não seria possível, já que o *T. cruzi* não possui enzimas chaves da via bioquímica de RNAi. Este fato nos levou a investigar os efeitos resultantes de uma expressão aumentada de *TcPOLK-2* para o parasito.

Nós obtivemos uma cultura de *T. cruzi* superexpressando este gene, usando o vetor integrativo pROCK-Polκ-NEO para a expressão estável de *TcPOLK-2* (Figura 21). Este vetor se integra ao genoma do parasito através de recombinação homóloga no locus de β -tubulina, onde estão situadas múltiplas cópias alternadas dos genes codificadores de α e β tubulina (DaRocha et al., 2004). A integração do vetor ao genoma do *T. cruzi* foi verificada através da hibridização de DNA às bandas cromossômicas separadas por PFGE (Figura 22A). De fato, podemos perceber que o gene exógeno provavelmente se integrou ao genoma mais de uma vez, uma vez que o sinal de *TcPOLK-2* exógena se mostra mais intenso que o sinal do gene endógeno (Figura 22A). A análise por *Northern blot* indicou a presença de altos níveis de RNA mensageiro de *TcPOLK-2* em parasitos transfectados, bem como também mostrou que em células selvagens a expressão de *TcPOLK-2* não pôde ser detectada (Figura 22B).

Para avaliar se a superexpressão de *TcPOLK-2* provocaria alterações na cinética de crescimento do *T. cruzi*, foram realizadas curvas de crescimento com parasitos selvagens e transfectados. A Figura 23 mostra que parasitos superexpressando *TcPOLK-2* apresentam um perfil de crescimento semelhante a parasitos selvagens.

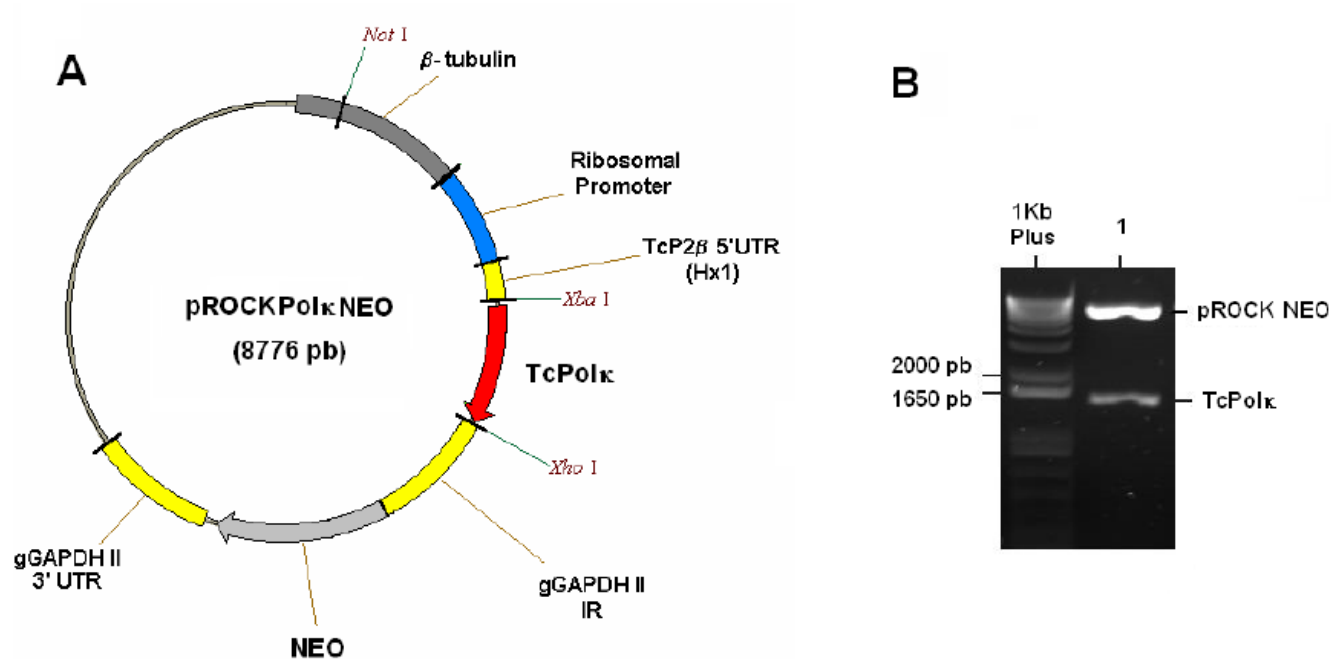


Figura 21 – Clonagem no vetor pROCK-NEO. **(A)** Representação do plasmídeo pROCK-Polκ-NEO, que permite integração no *locus* de β -tubulina através de recombinação homóloga. Sua seqüência possui um promotor ribossômico e regiões 5' UTR de TcP2 β , bem como regiões 3' UTR e intergênica de GAPDHII, as quais auxiliam na expressão da proteína de interesse e na da proteína de resistência a neomicina. O gene *NEO* indica o gene de resistência à neomicina (ou ao análogo G418). **(B)** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando digestão do vetor pROCK-Polκ-NEO, liberando o gene TcPolκ-2 (canaleta 1).

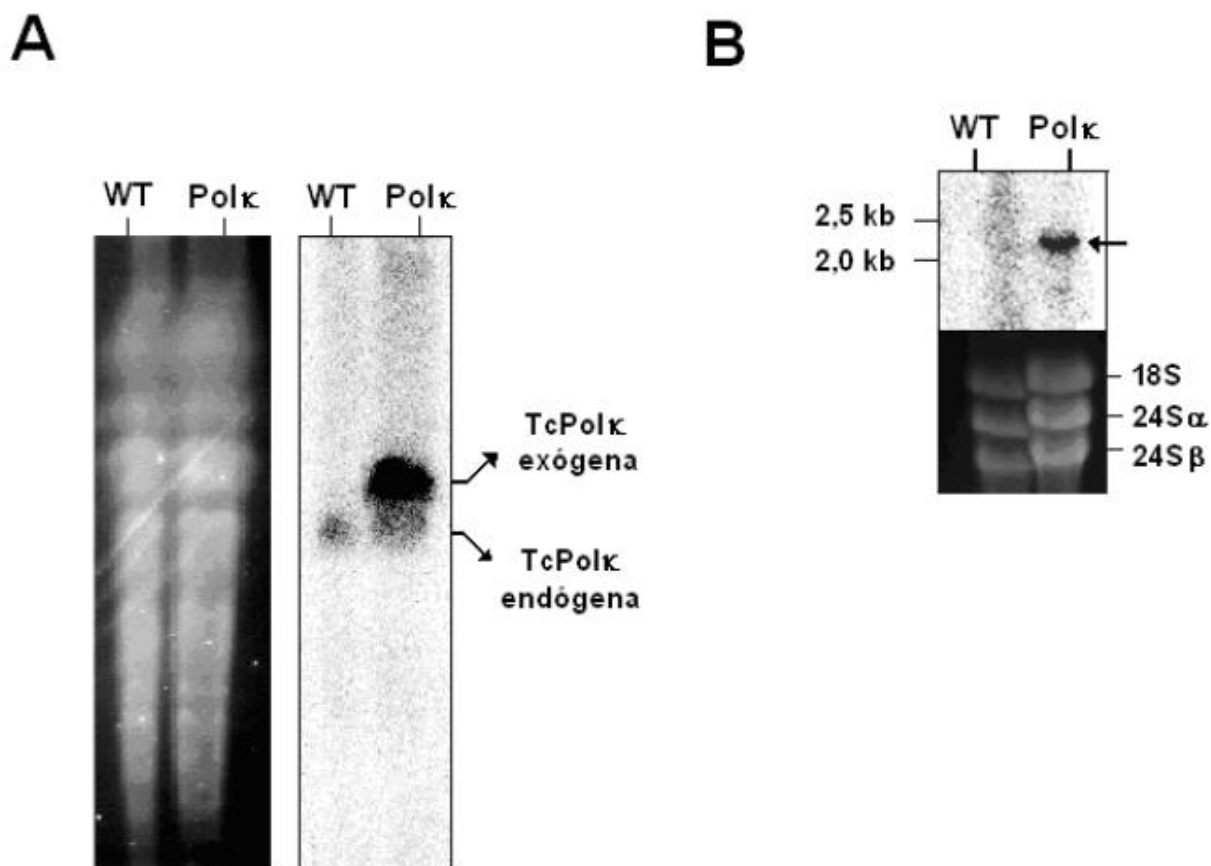


Figura 22 – Confirmação da superexpressão de *TcPOLK-2* (A) Análise de *Southern blot*. À esquerda: bandas cromossômicas das culturas selvagens (WT) e transfectadas com *TcPOLK-2* (Polκ) separadas em um PFGE corado com brometo de etídeo. À direita: o DNA foi transferido do PFGE para uma membrana Hybond-N+ e hibridizado com uma sonda para *TcPOLK-2*. Setas indicam *TcPOLK-2* endógeno e exógeno. (B) Análise por *Northern blot* das culturas selvagens (WT) e transfectadas com *TcPOLK-2* (Polκ). RNA total foi extraído hibridizado com sonda para *TcPOLK-2*. A seta indica mRNA de *TcPOLK-2*. O gel de agarose corado com brometo de etídeo mostra RNA total extraído das culturas selvagens e transfectadas.

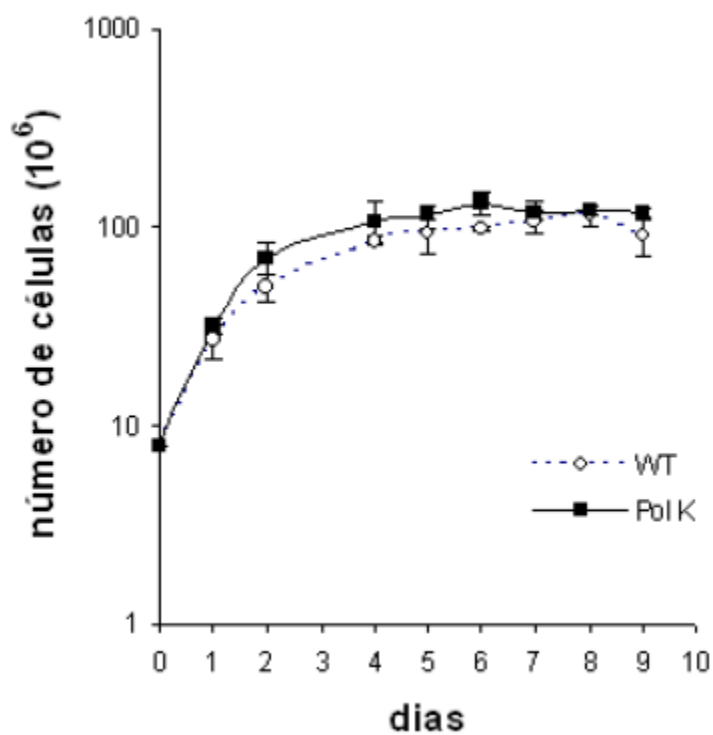


Figura 23 - Curva de crescimento de parasitos superexpressores. Curva de crescimento de parasitos selvagens (WT, \circ) e superexpressando o gene *TcPOLK-2* (PolK, \blacksquare). Os parasitos foram contados por 9 dias em uma câmara citométrica. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6 - TcPolκ-2 altera a resposta a estresse oxidativo e realiza síntese translesão

A 8-oxoG é uma lesão oxidativa que bloqueia parcialmente as DNA polimerases replicativas e que pode ser causadas por agentes oxidantes (por exemplo, H₂O₂) (Friedberg, 1995). Zhang e colaboradores mostraram que a Polκ de humano possui a capacidade de realizar síntese translesão livre de erros quando encontra lesões de 8-oxoG durante a replicação do DNA (Zhang et al., 2000). Este dado nos levou a investigar se um aumento na expressão de *TcPOLK-2* poderia afetar a resposta do *T. cruzi* ao tratamento com H₂O₂. Como mostrado na Figura 24, parasitos superexpressando *TcPOLK-2* apresentam uma sobrevivência a H₂O₂ mais elevada, quando comparada à sobrevivência de parasitos selvagens. Na presença de 400 μM de H₂O₂, 90,7% dos parasitos superexpressores sobreviveram, ao passo que apenas 27,9% dos parasitos selvagens sobreviveram ao mesmo tratamento (Figura 24).

Para verificar se esta maior sobrevivência a H₂O₂ indicaria uma habilidade de TcPolκ-2 em replicar DNA através de 8-oxoG, nós decidimos realizar ensaios de polimerização *in vitro*. Em uma reação contendo um iniciador-molde com uma lesão 8-oxoG, a MBP-TcPolκ-2 foi capaz de sintetizar através da base danificada, realizando ambos os passos de incorporação do nucleotídeo frente à lesão e de extensão a partir do nucleotídeo incorporado (Figura 25, canaleta 2). Como controle negativo, nós usamos a DNA polimerase β de *T. cruzi* em fusão com MBP (Figura 25, canaleta 3), a qual foi purificada pelo aluno Bruno Chamber e em experimentos prévios realizados em nosso laboratório havia demonstrado ser incapaz de replicar por este tipo de lesão (Lopes et al., 2008).

Os resultados obtidos aqui sugerem que TcPolκ-2 pode atuar na resistência ao dano oxidativo no DNA do *T. cruzi*, provavelmente através de síntese translesão.

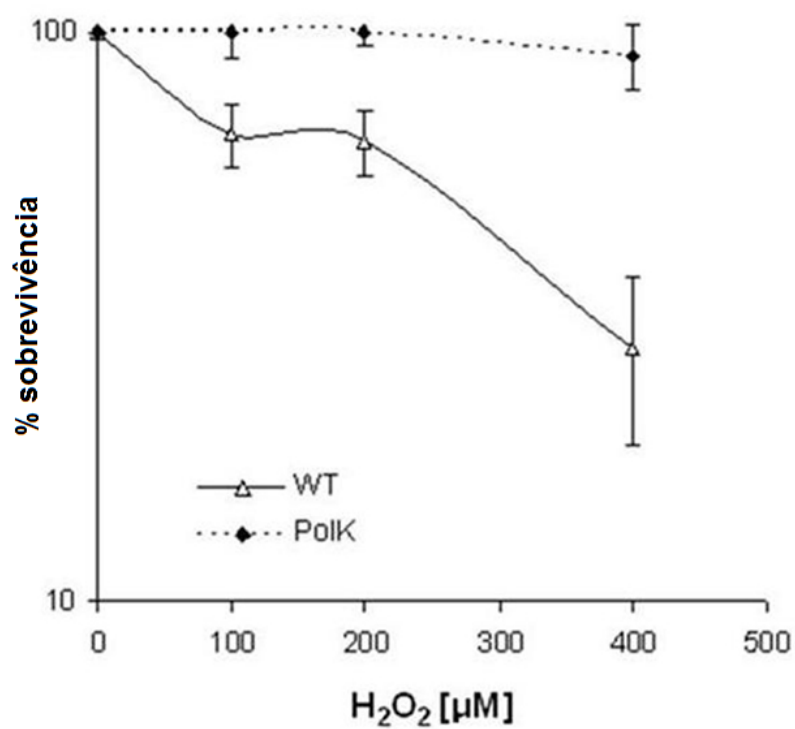


Figura 24 – Sobrevivência de superexpressores de *TcPOLK-2* à H₂O₂. Culturas selvagem (WT, Δ) e superexpressando *TcPOLK-2* (PolK, ●) foram tratadas com 0, 100, 200 e 400 μM de H₂O₂. Os parasitos foram contados em uma câmara citométrica 24 horas após o tratamento. O experimento foi realizado em triplicata.

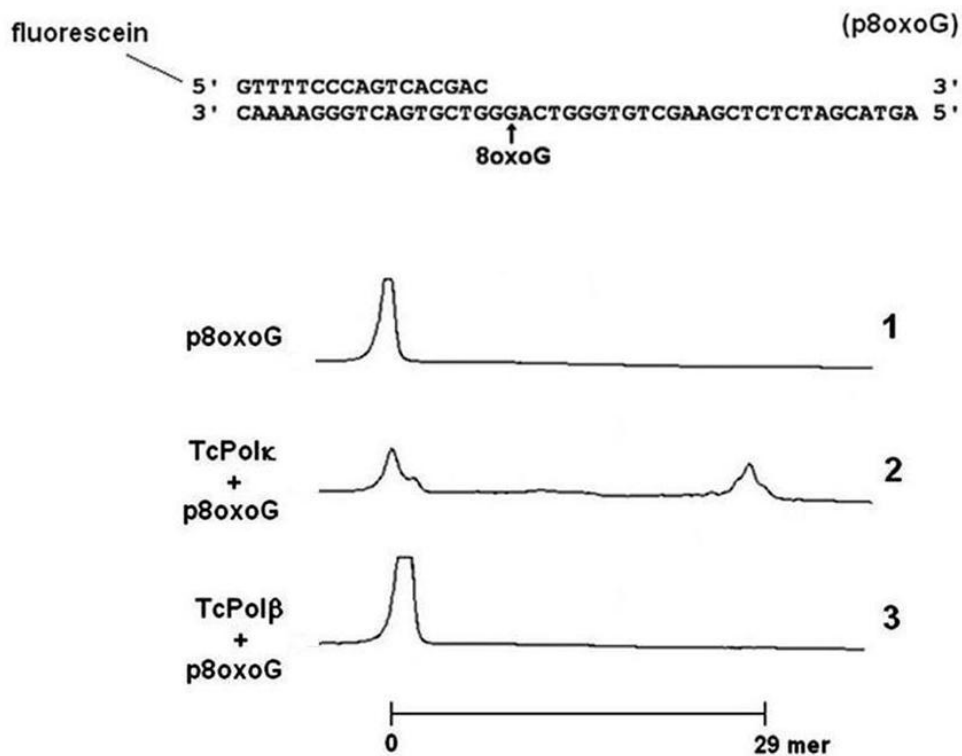


Figura 25 – MBP-TcPolκ-2 é capaz de replicar através de 8-oxoG. O iniciador-molde usado como substrato está representado (p8oxoG). Canaleta 1, p8oxoG. Canaleta 2, MBP-TcPolκ-2 incubada com p8oxoG. Canaleta 3, MBP-TcPolβ incubada com p8oxoG. Os produtos de DNA foram resolvidos em um gel de poliácridamida desnaturante, em um seqüenciador automático ALF. As análises de incorporação de nucleotídeos foram realizadas usando o programa Allelinks.

4.7 - Investigação de um papel de TcPolκ-2 na recombinação do DNA

Nós decidimos examinar a resposta da cultura superexpressando *TcPOLK-2* à irradiação gama e à zeocina. Estes dois tipos de agentes genotóxicos geram danos no DNA, os quais levam principalmente à formação de DSBs (Melin et al., 2001). A Figura 26 mostra que a superexpressão do gene *TcPOLK-2* aumenta a recuperação do crescimento do parasito após a irradiação. A superexpressão de *TcPOLK-2* também levou ao aumento da sobrevivência do parasito ao tratamento com zeocina (Figura 27). Em outros eucariotos, as DSBs podem ser reparadas por dois mecanismos distintos: reparo por recombinação homóloga (HR) e por junção das regiões terminais (NHEJ) (Llorca, 2007). Em *T. cruzi*, no entanto, a ausência de enzimas chave do NHEJ sugere que esta via de reparo está ausente neste organismo (El-Sayed et al., 2005). Para investigar se a maior recuperação após a irradiação gama poderia evidenciar um papel de TcPolκ-2 na HR, nós testamos sua atividade *in vitro* usando uma estrutura *D-loop*. Esta estrutura mimetiza um intermediário da recombinação no qual uma fita invasora funciona como o iniciador (Mcllwraith et al., 2005) e está representada esquematicamente na Figura 28A. O *D-loop* foi obtido como descrito por Mcllwraith e colaboradores (2005), anelando os três oligonucleotídeos e aferindo a pureza da estrutura através de gel de poliacrilamida 10% não desnaturante. O anelamento do *D-loop* foi considerado satisfatório, uma vez que não foi detectada a presença de outra estrutura contendo o oligonucleotídeo M13 fluorescente (Figura 28B). Quando incubada *in vitro* com o *D-loop*, TcPolκ-2 foi capaz de promover a extensão deste iniciador-molde até o final da seqüência (Figura 29A, canaleta 2). Para assegurar que este resultado não refletiu a presença de estruturas parcialmente desaneladas na reação, nós realizamos o mesmo experimento usando a TcPolβ, a qual possui uma atividade adstringente. Nossos resultados mostraram que a TcPolβ foi incapaz de sintetizar DNA na estrutura *D-loop* (Figura 29A, canaleta 3), apesar de ter sintetizado o oligo controle com a mesma eficiência de TcPolκ-2 (Figura 29B). Isto comprova que o resultado obtido com TcPolκ-2 não foi um falso positivo. Juntos, estes resultados sugerem que a TcPolκ-2 poderia funcionar em processos de recombinação homóloga.

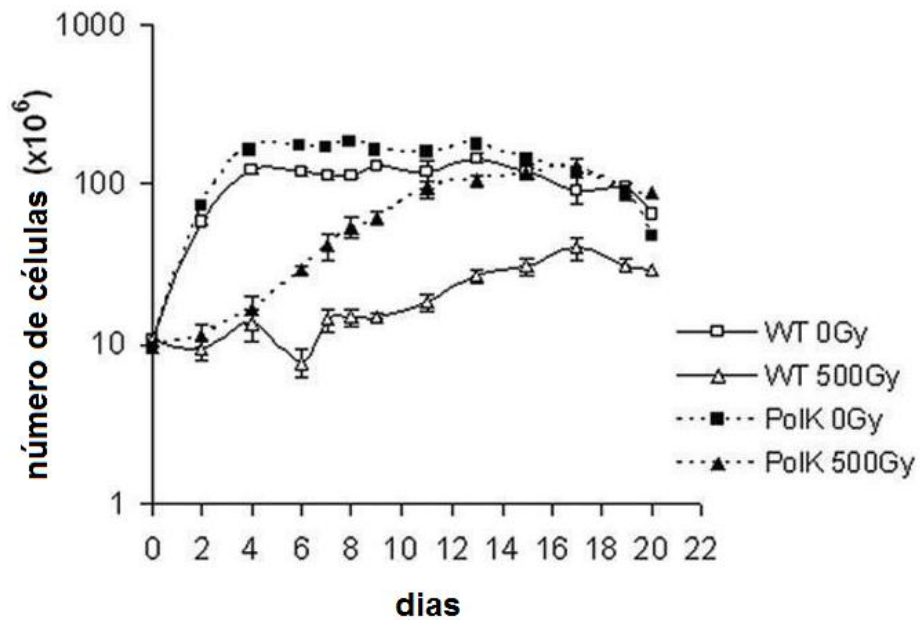


Figura 26 – Resposta de superexpressores de *TcPOLK-2* à irradiação gama. Culturas selvagens foram expostas a 0 Gy (WT 0Gy, □) e 500Gy (WT 500Gy, ○). Culturas superexpressando *TcPOLK-2* foram expostas a 0 Gy (PoIK 0Gy, ■) e 500 Gy (PoIK 500Gy, ▲). Os parasitos foram contados por 20 dias em uma câmara citométrica. O experimento foi realizado em triplicata.

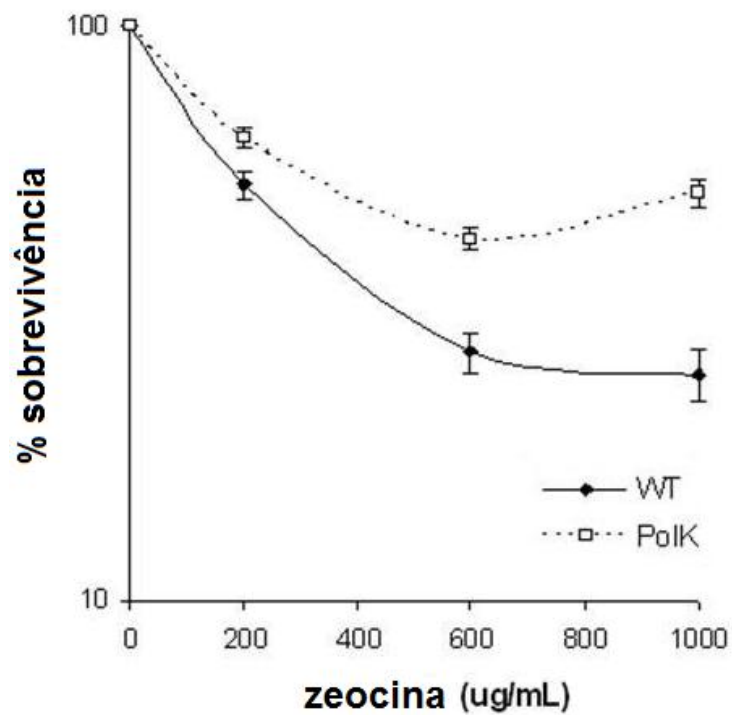


Figura 27 – Sobrevivência de superexpressores de *TcPOLK-2* após tratamento com zeocina. Culturas selvagens (WT, ♦) e culturas superexpressando *TcPOLK-2* (PoIK, □) foram tratadas com 0, 200, 600 e 1000 µg/mL de zeocina. Células foram contadas em uma câmara citométrica após 4 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

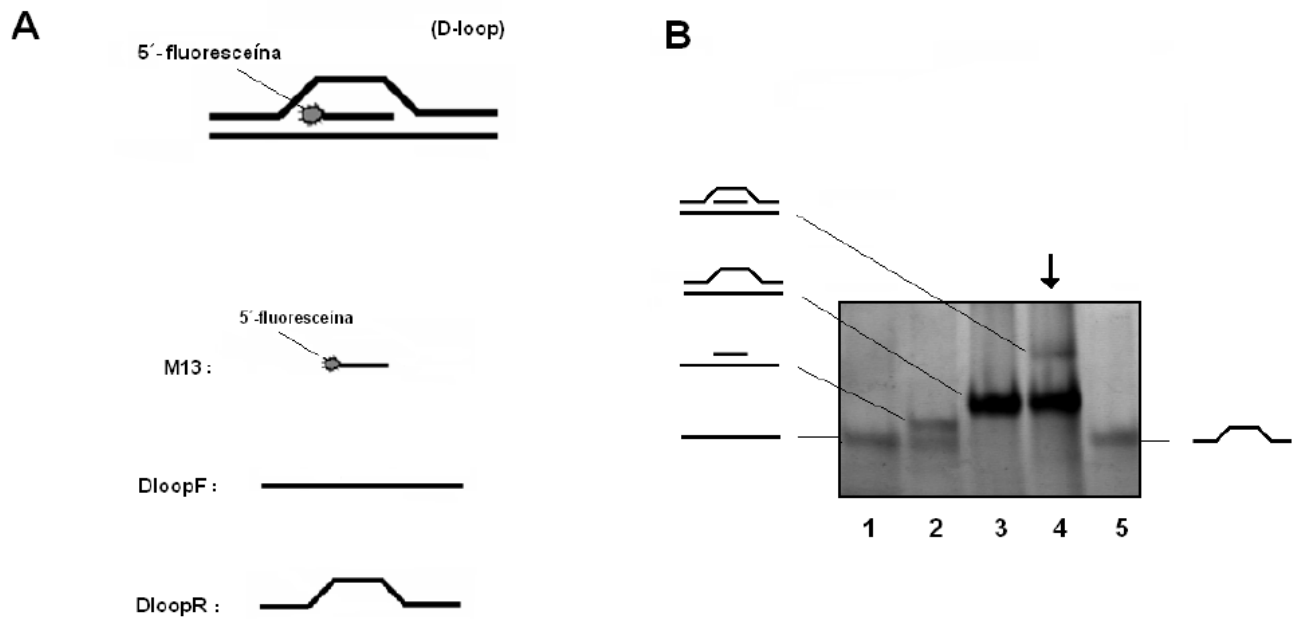


Figura 28 – Obtenção do intermediário de recombinação *D-loop*. **(A)** Representação esquemática da estrutura *D-loop* e dos oligonucleotídeos que o compõem. **(B)** Reações de anelamento corridas em gel de acrilamida 10% não desnaturante. Canaleta 1: DloopF. Canaleta 2: DloopF + M13. Canaleta 3: DloopF + DloopR. Canaleta 4: DloopF + DloopR + M13. Canaleta 5: DloopR. A seta indica o anelamento contendo a estrutura *D-loop*.

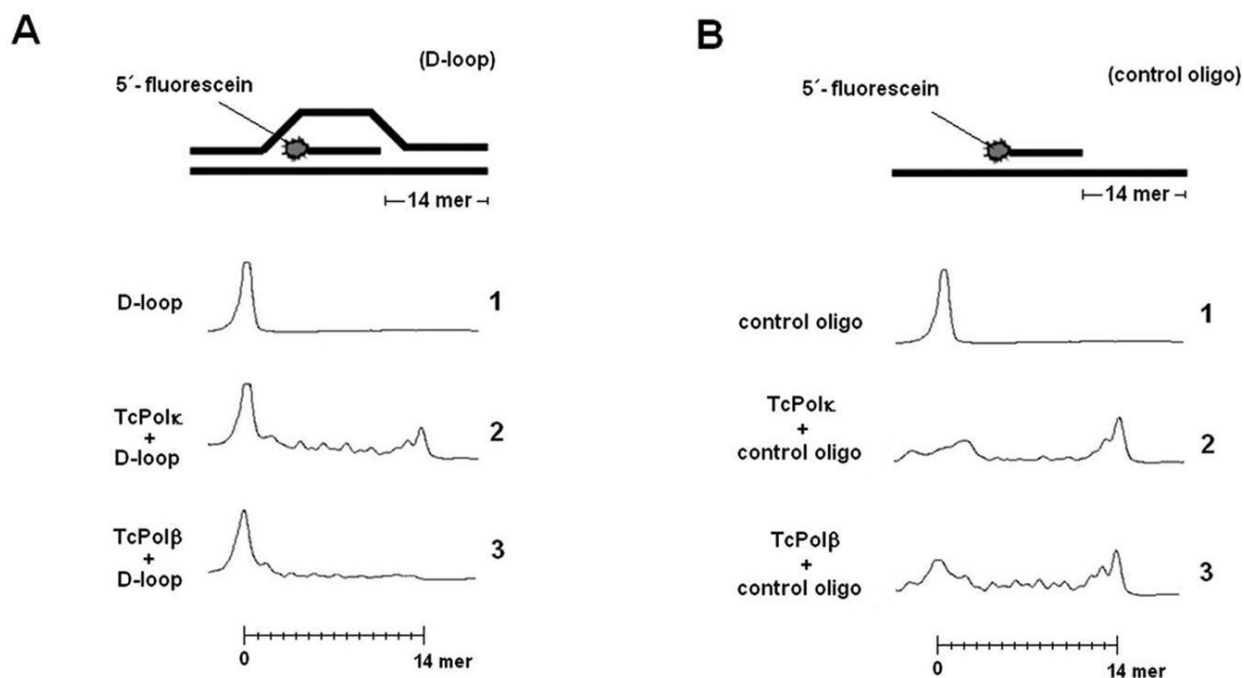


Figura 29 - MBP-TcPolκ-2 é capaz de replicar em intermediários de recombinação. **(A)** Ensaio de DNA polimerase usando o iniciador-molde *D-loop* como substrato. O iniciador-molde *D-loop* está esquematicamente representado (*D-loop*). Canaleta 1, *D-loop*. Canaleta 2, MBP-TcPolκ-2 incubada com o *D-loop*. Canaleta 3, MBP-TcPolβ incubada com o *D-loop*. **(B)** Ensaio de DNA polimerase usando o iniciador-molde oligo controle como substrato. O oligo controle está esquematicamente representado (*control oligo*). Canaleta 1, oligo controle. Canaleta 2, MBP-TcPolκ-2 incubada com o oligo controle. Canaleta 3, MBP-TcPolβ incubada com o oligo controle. Os produtos de DNA foram resolvidos em um gel de poliacrilamida desnaturante, em um seqüenciador automático ALF. As análises de incorporação de nucleotídeos foram realizadas usando o programa Allelinks.

4.8 - TcPolk-2 não altera a sobrevivência do *T. cruzi* a MMS

O metil metanosulfonato (MMS) é conhecido por gerar – sobretudo – metilações nos átomos N⁷ da desoxiguanina e N³ na desoxiadenina (Beranek, 1990). Estas lesões alquilantes são reparadas principalmente pelo BER (Lindahl et al., 1997) e pela recombinação (Krogh & Symington, 2004). Uma vez que a superexpressão de *TcPOLK-2* aumentou a tolerância do *T. cruzi* à radiação gama e à zeocina, decidimos verificar se a superexpressão de *TcPOLK-2* levaria a uma maior sobrevivência ao MMS. Para isso, realizamos uma curva de sobrevivência tratando o parasito com esse agente genotóxico. Parasitos selvagens e superexpressando *TcPOLK-2* foram tratados com diferentes concentrações de MMS, e como é possível observar na Figura 30, a superexpressão de *TcPOLK-2* não alterou a sobrevivência do *T. cruzi* ao MMS.

4.9 - TcPolk-2 aumenta a sobrevivência do *T. cruzi* ao BZ

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 atuação ainda não é conhecido, mas acredita-se que o BZ possa agir ligando-se a proteínas, lipídios e ao DNA (Coura & de Castro, 2002) ou produzindo radicais livres que levam à oxidação de componentes celulares do *T. cruzi* (Pérez-Molina et al., 2009). Decidimos avaliar se a superexpressão de *TcPOLK-2* poderia aumentar a resistência do *T. cruzi* ao BZ, uma vez que nos experimentos anteriores verificamos que esta DNA polimerase confere maior tolerância a agentes oxidantes. Realizamos uma curva de sobrevivência, tratando o parasito com concentrações crescentes de BZ. Nossos resultados mostram que os parasitos superexpressando *TcPOLK-2* apresentam uma maior tolerância ao BZ, uma vez que sua sobrevivência ao tratamento foi maior do que a sobrevivência dos parasitos selvagens (Figura 31). Este resultado sugere que de fato o mecanismo de ação do BZ pode levar ao aparecimento de lesões no DNA.

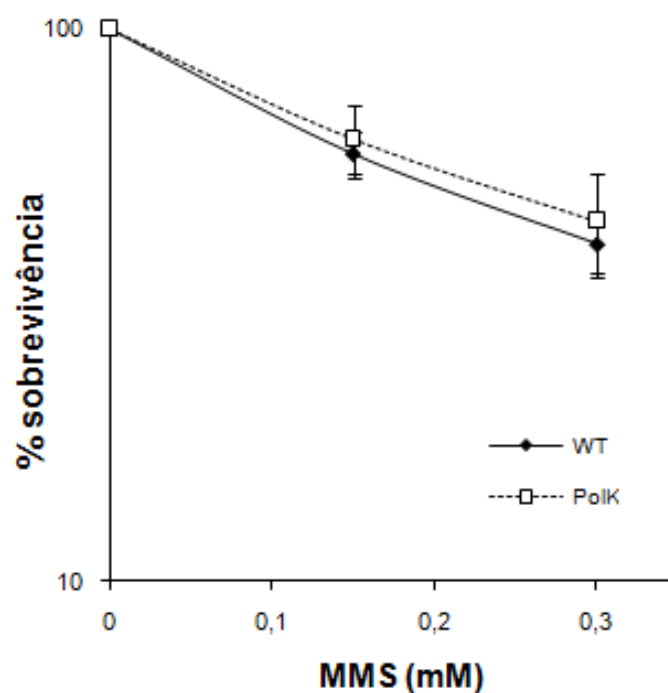


Figura 30 - Sobrevivência de superexpressores de *TcPOLK-2* ao MMS. Culturas selvagem (WT, \blacklozenge) e superexpressando *TcPOLK-2* (PolK, \square) foram tratadas com 0, 0,15 e 0,3 mM de MMS. Os parasitos foram contados em uma câmara citométrica 48 horas após o tratamento. O experimento foi realizado em triplicata.

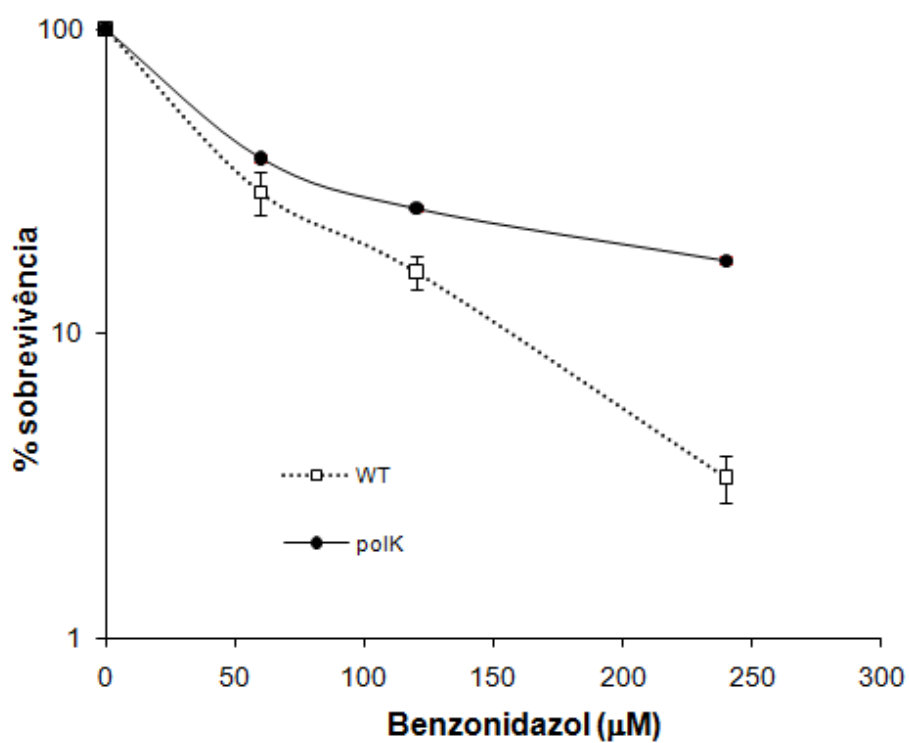


Figura 31 – Sobrevivência de superexpressores de *TcPOLK-2* ao benzonidazol (BZ). Culturas selvagem (WT, □) e superexpressando *TcPOLK-2* (PolK, ●) foram tratadas com 0, 60, 120 e 240 μM de BZ. Os parasitos foram contados em uma câmara citométrica 48 horas após o tratamento. O experimento foi realizado em triplicata.

4.10 - Localização subcelular da outra cópia de TcPolκ **(TcPolκ-1)**

De posse dos resultados obtidos, resolvemos verificar qual seria a localização celular da proteína codificada pela outra cópia do gene *TcPOLK* (*TcPOLK-1*). Empregamos a mesma estratégia descrita anteriormente neste trabalho – expressão transiente do gene de interesse em fusão com GFP. Fizemos a transfecção de formas epimastigotas do *T. cruzi* e observamos a localização de TcPolκ-1, comparando-a com a cópia já caracterizada nos experimentos anteriores.

Como foi possível verificar, apesar de *TcPOLK-1* não apresentar nenhum sítio putativo de endereçamento celular, ela codifica uma proteína com clara localização nuclear (Figura 32).

Deste momento em diante, também iremos diferenciar as duas cópias de TcPolκ referindo a elas quanto a sua localização – TcPolκ mitocondrial e TcPolκ nuclear.

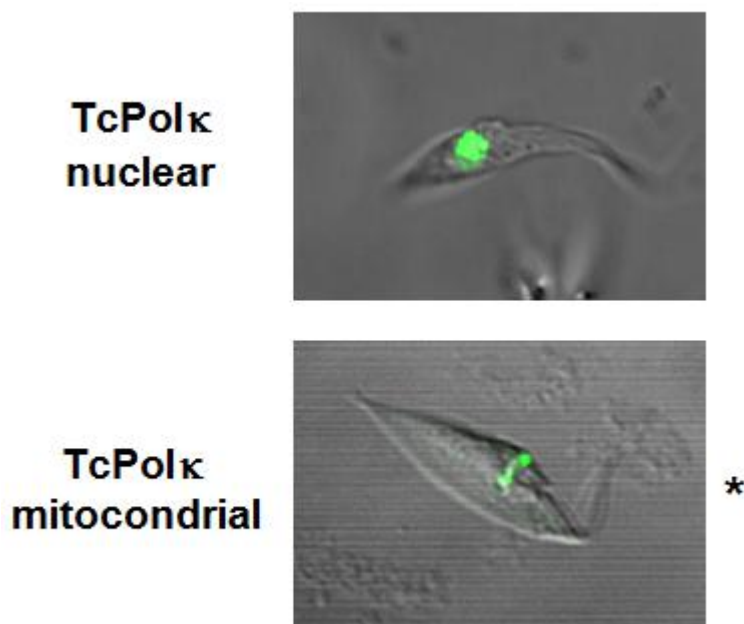


Figura 32 – Localização da outra cópia do gene TcPolκ (TcPolκ-1). TcPolκ-1 apresenta localização nuclear. Formas epimastigotas foram transfectadas com o vetor pTREX-GFP contendo o gene de interesse em sua seqüência. O painel de cima mostra a localização de TcPolκ-1 (TcPolκ nuclear). Como controle, transfectamos parasitos com o vetor pTREX-GFP contendo a TcPolκ-2 (TcPolκ mitocondrial) clonada em sua seqüência, mostrada no painel abaixo. As imagens foram visualizadas em um microscópio confocal Zeiss LSM 510 META. O asterisco indica a cópia de TcPolκ que foi usada nos experimentos anteriores desta tese (TcPolκ-2).

4.11 - Análise do reparo de lesões no DNA do *T. cruzi*

Os resultados obtidos neste trabalho e em outros estudos de nosso grupo de pesquisa nos levaram a querer investigar melhor como funcionam os processos de reparo de DNA no *T. cruzi*. Para tal, precisaríamos de uma ferramenta experimental que nos permitisse quantificar o aparecimento de lesões após tratamentos genotóxicos, bem como o reparo destas lesões ao longo do tempo.

A técnica de análise de danos no DNA através de qPCR é uma metodologia que baseia-se no princípio de que vários tipos de lesões do DNA são capazes de retardar ou mesmo impedir a progressão de uma DNA polimerase (Santos et al., 2006). Desta forma, se quantidades iguais de DNA extraídas de amostras que sofreram tratamentos diferentes são amplificadas por PCR quantitativa (qPCR), o DNA que possuir o menor número de lesões irá amplificar mais do que o DNA mais danificado. Por exemplo, o DNA de uma amostra biológica que foi exposta à radiação UV irá amplificar menos do que o DNA de uma amostra correspondente não-tratada (Santos et al., 2006). Visando aprender e padronizar esta técnica para o estudo em *T. cruzi*, estabelecemos uma colaboração com o Prof. Van Houten, do Instituto de Câncer da Universidade de Pittsburgh (UPCI), nos Estados Unidos da América.

Para a realização do ensaio de qPCR, nós escolhemos as seqüências que iríamos utilizar como iniciadores. Dessa forma, desenhamos pares de iniciadores para a amplificação de fragmentos longos (cerca de 10 kb) e curtos (cerca de 250 pb) dos genomas nuclear e mitocondrial do *T. cruzi*. As regiões contendo as seqüências de 10 kb do núcleo e da mitocôndria estão representadas na Figura 33.

A especificidade dos pares de iniciadores foi aferida (Figura 34) e em seguida padronizamos os números de ciclos necessários para amplificar cada fragmento. Como a qPCR é quantitativa, as reações de amplificação têm que terminar na fase exponencial da curva de amplificação (Santos et al., 2006). Dessa forma, para cada qPCR fizemos um controle no qual uma das reações contém 50% da quantidade de DNA não-tratado. A amplificação desta reação controle tem que gerar um sinal equivalente a 40% – 60% do sinal gerado pela amplificação da reação contendo 100% do DNA não-tratado (Santos et al., 2006).

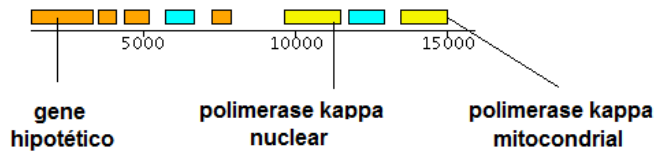
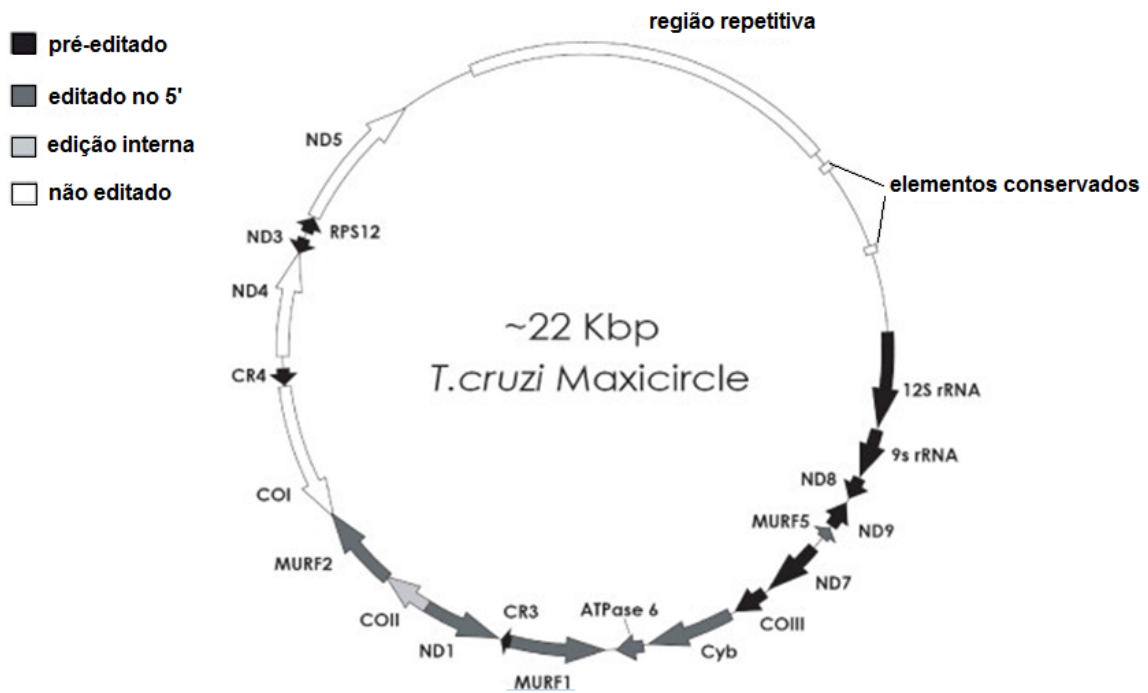
A**B**

Figura 33 – Regiões amplificadas nos ensaios de qPCR. (A) região nuclear. A seqüência de 10 kb se situa na porção entre as marcações 5000 e 15000. Os retângulos em laranja representam genes hipotéticos. Os retângulos em azul representam genes de função desconhecida. Os retângulos em amarelo representam as duas cópias de *TcPOLK*. **(B)** região mitocondrial. A seqüência de 10 kb se situa na porção codificante do DNA do maxicírculo, entre os genes ND8 e ND3.

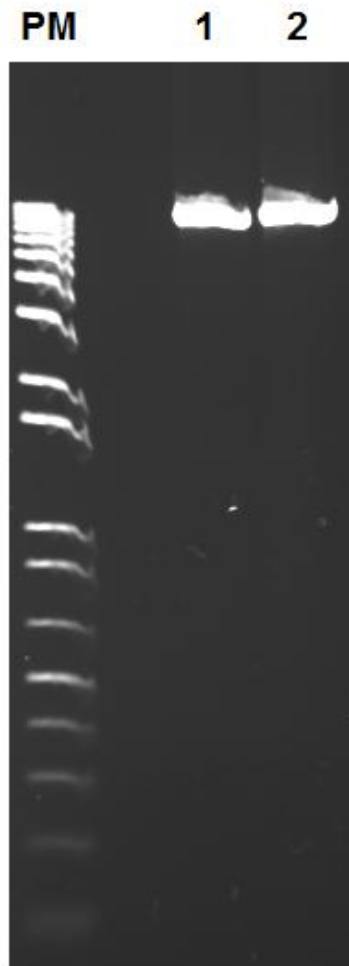


Figura 34 – Amplificação dos fragmentos de 10 kb nuclear e mitocondrial. Eletroforese em gel de agarose 0,5 %, mostrando a amplificação dos fragmentos longos do núcleo e da mitocôndria do *T. cruzi*. O gel foi corado com brometo de etídeo para visualização do DNA. A canaleta 1 contém o fragmento nuclear. A canaleta 2 contém o fragmento mitocondrial. PM indica o padrão de peso molecular (1 kb Plus). Ambos os fragmentos possuem cerca de 10 kb.

4.12 - Cinética do reparo de lesões causadas por MMS

O primeiro agente genotóxico que nós testamos foi o MMS. Inicialmente, fizemos um ensaio dose-resposta para verificar se ao tratar o *T. cruzi* com concentrações crescentes de MMS veríamos um aumento proporcional no número de lesões induzidas por MMS. Como mostrado na Figura 35A, o aumento na concentração de MMS resultou em um número maior de lesões tanto no genoma nuclear quanto no genoma mitocondrial, ambos apresentando quantidade de lesões similares.

Para investigar se o *T. cruzi* é capaz de reparar as lesões causadas por MMS fizemos um ensaio no qual, após o tratamento, os parasitos foram deixados recuperando por um período de 24 horas após o fim do tratamento. Durante esse tempo, coletamos amostras correspondentes aos tempos zero, 1 hora, 5 horas, 10 horas e 24 horas, nos quais seria possível analisar a cinética de reparo dessas lesões ao longo do período de recuperação. Durante este período, também analisamos a densidade de parasitos vivos e mortos para assegurar que a redução do número de lesões não era resultante da replicação de parasitos não danificados ou mesmo da morte dos parasitos danificados. Essa análise de densidade celular também foi feita para todos os tratamentos posteriores, e em todos os experimentos realizados neste trabalho o número de parasitas se mostrou constante (dados não mostrados). Nossos resultados mostraram que o *T. cruzi* é capaz de reparar as lesões no DNA induzidas por MMS de forma eficiente (Figura 35B). Enquanto 100% das lesões mitocondriais são reparadas em 24 horas, o reparo nuclear é ligeiramente menos eficaz (Figura 35B).

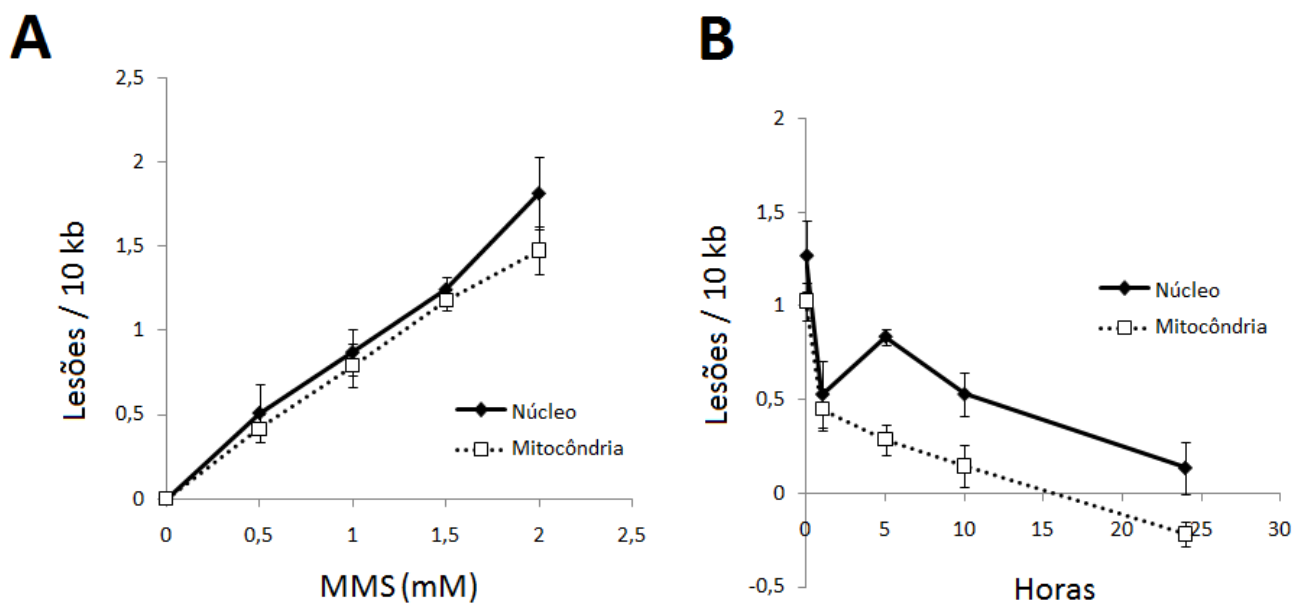


Figura 35 – Surgimento e reparo de lesões causadas por MMS. (A) Ensaio de dose-resposta nuclear e mitocondrial após tratamento com quantidades crescentes de MMS. **(B)** Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial, após tratamento com 1,5 mM de MMS. As células foram tratadas por 60 minutos e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média.

4.13 - Cinética do reparo de lesões causadas por H₂O₂

O próximo agente genotóxico testado foi a H₂O₂. A H₂O₂ é naturalmente formada como um produto secundário do metabolismo celular. Apesar de não ser altamente reativa com o DNA, ela pode reagir com Fe⁺² e formar oxidantes do tipo ^{*}OH. Tais agentes oxidantes podem causar diferentes tipos de lesões no DNA, e como citado anteriormente neste trabalho, a 8-oxoG é a mais estudada, sendo reparada pelo BER (Friedberg, 1995). Nós realizamos um ensaio de dose-resposta tratando o *T. cruzi* com doses crescentes de H₂O₂ por 15 minutos (Figura 36A). Entretanto, diferentemente do experimento com MMS, o tratamento com H₂O₂ não gerou quantidades de lesões semelhantes no núcleo e na mitocôndria. Embora um aumento na concentração de H₂O₂ (50 μM e 100 μM) resulte em um aumento no número de lesões tanto no núcleo quanto na mitocôndria, o número de lesões na mitocôndria atinge o máximo na presença de 100 μM de H₂O₂ (Figura 36A).

Fizemos a análise da remoção das lesões do DNA induzidas por H₂O₂ durante o período de 24 horas após o tratamento, e os resultados foram igualmente distintos. Apesar de o tratamento com 200 μM ter resultado em um alto número de lesões no núcleo do *T. cruzi*, tais lesões são totalmente reparadas 10 horas após o tratamento, ao passo que as lesões mitocondriais persistem após 24 horas do tratamento (Figura 36B).

Essa persistência de lesões no mtDNA após o tratamento com H₂O₂ foi observada em humanos em estudos anteriores (Santos et al., 2003). Nesse trabalho, foi verificado que longos tratamentos com H₂O₂ resultou na perda de função mitocondrial, a qual produziu um aumento das lesões do mtDNA como consequência de uma produção secundária de espécies oxidativas. Para verificar se um tratamento mais longo com H₂O₂ iria amplificar o número de lesões na mitocôndria, nós repetimos o experimento com H₂O₂ incubando o *T. cruzi* com o agente genotóxico por um período mais longo (20 minutos, ao invés da incubação padrão de 15 minutos). Como mostrado na Figura 37A, o tratamento mais longo com H₂O₂ produziu um aumento maior no número de lesões após 24 horas de recuperação. Este resultado sugere que o dano oxidativo causado pela H₂O₂ poderia comprometer a integridade da mitocôndria, o que poderia resultar em um estresse oxidativo que levaria à produção de mais lesões no genoma mitocondrial.

Para investigar se o tratamento com H₂O₂ poderia debilitar o funcionamento da mitocôndria do *T. cruzi*, nós examinamos o consumo basal de oxigênio do parasito, 24 horas após o tratamento com o agente genotóxico. A Figura 37B mostra que – após o tratamento com H₂O₂ – o *T. cruzi* de fato apresenta uma redução na sua função mitocondrial, o que explicaria então o aumento tardio do número de lesões no mtDNA.

4.14 - Cinética do reparo de lesões causadas por cisplatina

O próximo passo de nosso estudo foi avaliar a resposta do *T. cruzi* na presença da cisplatina. A cisplatina é uma droga quimioterápica usada no tratamento de vários tipos de câncer. As principais lesões causadas por este composto são os *crosslinks* intra-fita com bases purínicas, sendo que o *crosslink* intra-fita d(GpG) é o aduto mais comum . As lesões induzidas por cisplatina são majoritariamente reparadas pelo NER e pelo reparo de ICLs (revisado em Guminski et al., 2002). Para examinar o aparecimento de lesões induzidas por cisplatina no genoma do *T. cruzi*, nós realizamos um ensaio dose-resposta tratando o parasito com concentrações crescentes dessa droga. Nós verificamos que o aumento na concentração de cisplatina resultou em maiores quantidades de lesões no DNA nuclear e mitocondrial, ambos com valores similares (Figura 38A). Analisamos também a cinética de remoção das lesões induzidas por cisplatina, e vimos que estas lesões são rapidamente reparadas no núcleo e – surpreendentemente – na mitocôndria (Figura 38B).

O reparo mitocondrial de lesões causadas por cisplatina é um conceito bastante controverso, e que será abordado na Discussão deste trabalho. Até o momento em que esta tese foi escrita, nenhum estudo havia constatado de forma consistente o reparo deste tipo de lesão na mitocôndria em nenhum outro organismo.

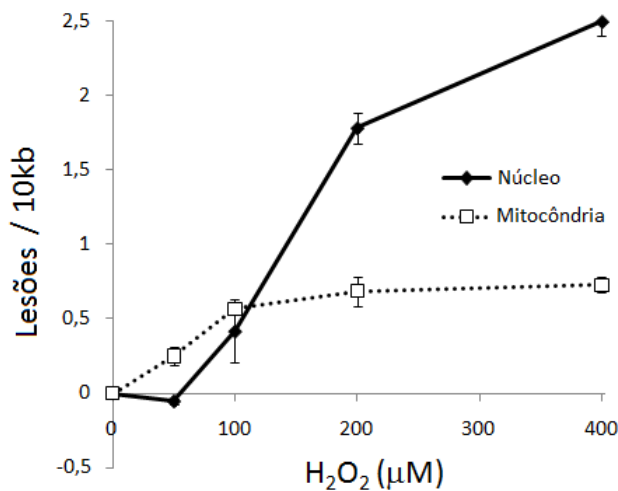
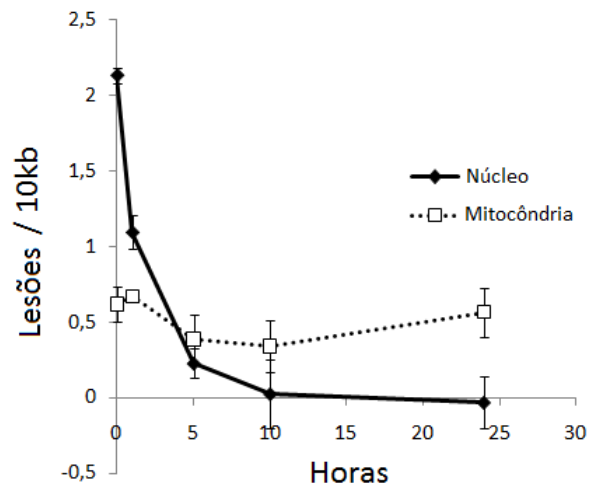
A**B**

Figura 36 – Surgimento e reparo de lesões causadas por H₂O₂. (A) Ensaio de dose-resposta nuclear e mitocondrial após tratamento com quantidades crescentes de H₂O₂. (B) Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial, após tratamento com 200 µM de H₂O₂. As células foram tratadas por 15 minutos e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média.

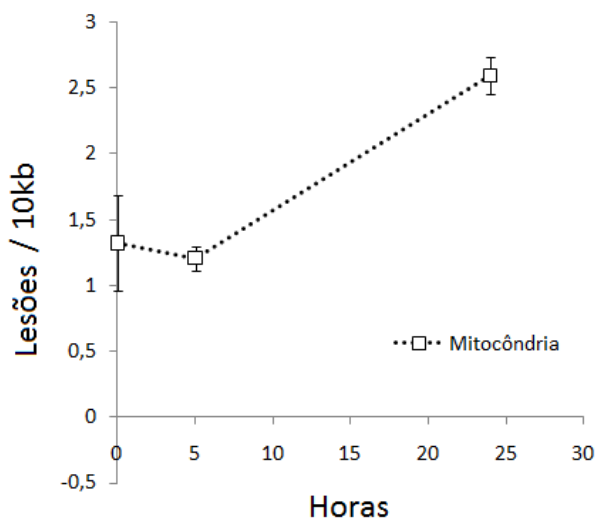
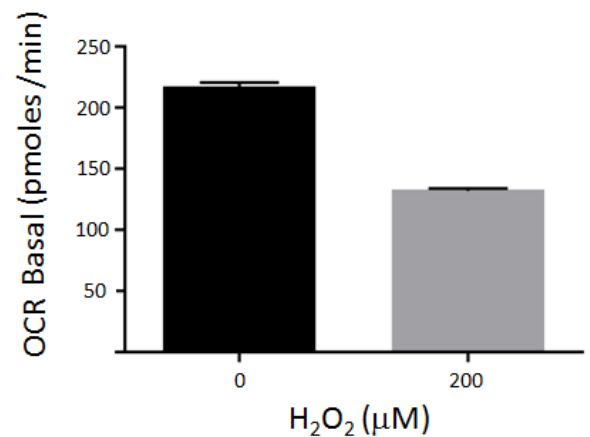
A**B**

Figura 37 – H₂O₂ prejudica a atividade mitocondrial. (A) Cinética do reparo mitocondrial de células expostas a um tratamento mais longo com H₂O₂. As células foram tratadas por 20 minutos com 200 µM de H₂O₂ e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média. (B) Análise da função mitocondrial através de medição da taxa de consumo basal de oxigênio (OCR). As células foram tratadas com 0 µM e 200 µM de H₂O₂ por 20 minutos e deixadas recuperando por até 24 horas. As medições foram feitas no equipamento Seahorse XF. O experimento foi realizado em 4 replicatas.

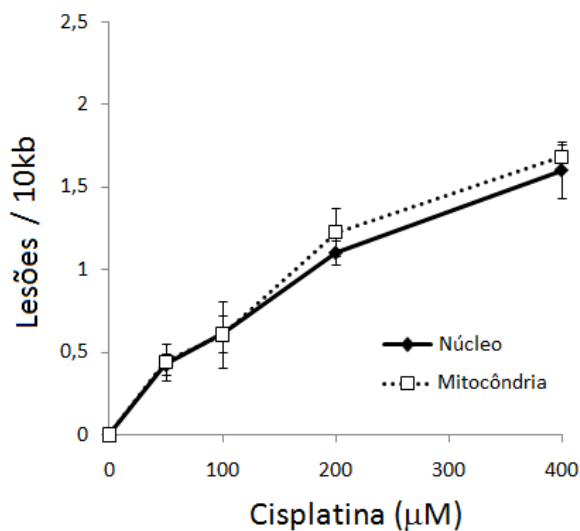
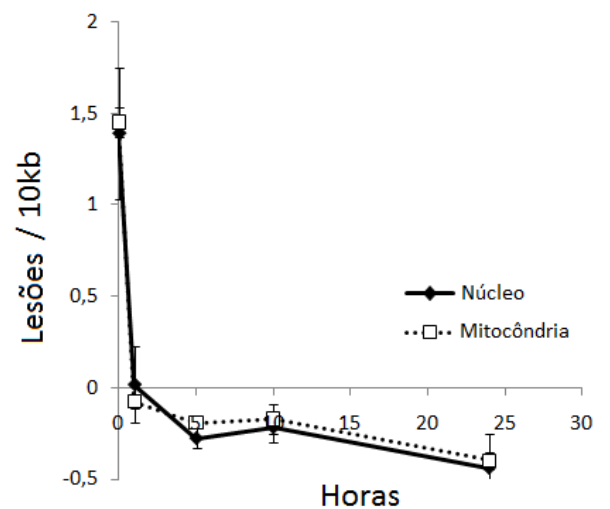
A**B**

Figura 38 – Surgimento e reparo de lesões causadas por cisplatina. (A) Ensaio de dose-resposta nuclear e mitocondrial após tratamento com quantidades crescentes de cisplatina. **(B)** Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial, após tratamento com 300 μM de cisplatina. As células foram tratadas por 60 minutos e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média.

4.15 - Cinética do reparo de lesões causadas por UV

Para examinar a resposta mitocondrial do *T. cruzi* a outro tipo de lesão que também é principalmente reparada pelo NER, realizamos um ensaio tratando o parasito com radiação UV. A radiação UV danifica o DNA, sobretudo pela formação de dímeros de pirimidina (CPDs) e fotoprodutos 6-4. Tais lesões podem bloquear drasticamente as DNA polimerases replicativas e são reparadas pelo NER, ou por fotoreativação enzimática através da enzima fotoliase (revisado em Gruijl et al., 2001). Uma vez que o genoma do *T. cruzi* não codifica nenhum homólogo da fotoliase, seria esperado que o reparo de lesões induzidas por UV refletisse a ação do NER.

O *T. cruzi* foi exposto a uma dose de 1500 J/m² de radiação UV, e deixado recuperando por até 24 horas. Como mostrado na Figura 39, embora não tenha ocorrido reparo de lesões no DNA nuclear, as lesões mitocondriais foram parcialmente reparadas pelo *T. cruzi*.

4.16 - Localização de proteínas do *T. cruzi* pertencentes ao NER e ao reparo de ICLs

Esses resultados que mostraram o reparo mitocondrial de lesões induzidas por cisplatina e UV sugerem que o *T. cruzi* possui um mecanismo mitocondrial de reparo que poderia remover lesões volumosas tais como adutos de cisplatina e dímeros de pirimidina. Visando investigar quais proteínas poderiam estar envolvidas neste processo, nós decidimos examinar a localização subcelular de algumas proteínas de *T. cruzi* que são ortólogas de componentes do NER e do reparo de ICLs. Dessa forma, analisamos a localização das proteínas de *T. cruzi* correspondentes às proteínas XPD e HR23B (exclusivas do NER), e ERCC1 e XRCC3 (NER e reparo de *crosslinks*).

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas com diferentes construções do vetor pTREX-GFP, cada uma contendo um dos genes de interesse clonado em fusão com GFP. A Figura 40 mostra as localizações subcelulares de XPD, HR23B, ERCC1 e XRCC3 em *T. cruzi*. Como possível verificar nestes

resultados, XPD e HR23B apresentam localizações semelhantes. Ambas as proteínas localizam no núcleo do parasito, entretanto elas se concentram nas regiões nucleares onde a cromatina é menos condensada. Isso pode ser observado devido ao fato de que no núcleo essas proteínas não co-localizam com o marcador de DNA utilizado (DAPI), o qual cora com maior intensidade as regiões de heterocromatina (Figura 40).

Em contrapartida à localização de XPD e HR23B, verificamos que ERCC1 e XRCC3 podem ser direcionadas à mitocôndria. Embora essas duas proteínas apresentem uma localização difusa em todo o corpo do parasito, é possível observar que essas proteínas se concentram mais em uma região adjacente ao cinetoplasto (Figura 40). Essa região, conhecida como KFZ (do inglês *kinetoflagellar zone*, Figura 3), é a região onde ocorre a replicação do kDNA e onde acredita-se ocorrer alguns processos de reparo de DNA (Liu et al., 2005). Estes resultados sugerem que o reparo mitocondrial de lesões que provocam grandes distorções da estrutura do DNA seria realizado pela via do reparo de ICLs.

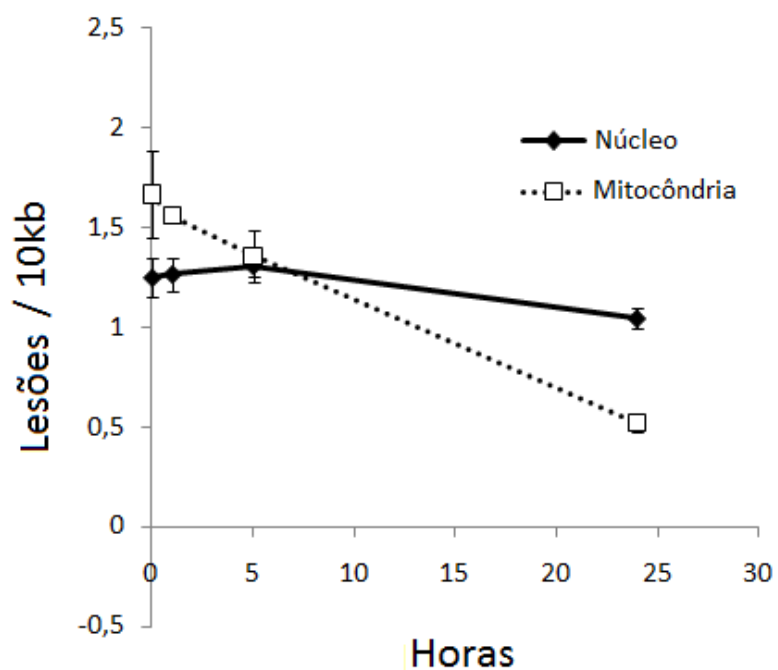


Figura 39 – **Reparo de lesões causadas por UV.** Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial, após tratamento com 1500 J/m^2 de radiação UV. As células foram irradiadas com a dose indicada acima e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média.

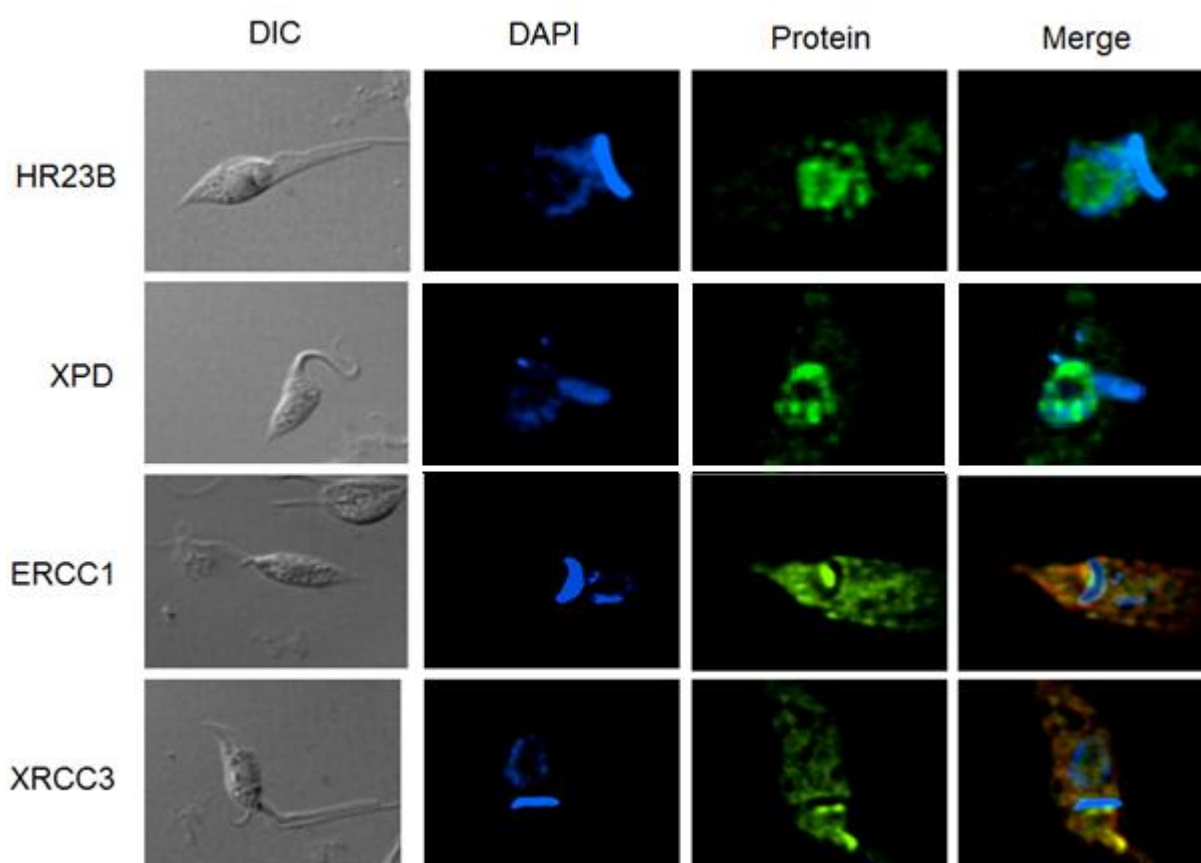


Figura 40 – Localização subcelular de proteínas do NER e do reparo de ICLs. As proteínas HR23B, XPD, ERCC1 e XRCC3, foram clonadas em fusão com GFP. As células foram coradas com DAPI para marcação do DNA. As células transfectadas com ERCC1 e XRCC3 foram incubadas adicionalmente com um marcador de citoplasma (anti-HSP70). As imagens foram visualizadas em um microscópio Olympus IBX-81.

5. Discussão

Nos últimos anos, várias DNA polimerases pertencentes à via de síntese translesão vêm sendo descritas em diferentes organismos. Estas enzimas especializadas aparentam ter um importante papel na evolução e na adaptação de organismos a ambientes hostis, uma vez que elas são capazes de causar mutações, de replicar DNA contendo lesões e ainda de atuar no reparo do DNA (Prakash et al., 2005). Na primeira parte deste trabalho, nós estudamos uma das cópias da DNA polimerase κ do *T. cruzi* (TcPol κ mitocondrial), um organismo que possui características evolutivas únicas e que está sujeito a estresses genotóxicos durante o seu ciclo de vida. Estudamos também o reparo de DNA deste parasito frente a diferentes tipos de lesões. Com isso, buscamos aumentar os conhecimentos a cerca da biologia do *T. cruzi*, os quais despertam grande interesse do ponto de vista evolutivo e epidemiológico.

Baseados em análises *in silico*, nós mostramos que a TcPol κ mitocondrial é uma integrante da subfamília DinB das DNA polimerases da família Y e sua seqüência apresenta características controversas. Apesar de o *T. cruzi* ser um eucarioto, as seqüências das duas cópias de TcPol κ possuem alguns aspectos mais relacionados aos seus ortólogos em procariotos e arquea. Assim como a Pol IV de *E. coli* e a Dpo4 de *S. solfataricus* (Lone et al., 2007), TcPol κ não apresenta a extensão C-terminal. Em ortólogos de eucariotos, esta porção contém um ou dois motivos de ligação a zinco C₂HC, os quais estão envolvidos em interações proteína-DNA (Gerlach et al., 1999) e proteína-proteína (Ogi et al., 2005). A ausência de motivos C₂HC na TcPol κ mitocondrial poderia implicar em uma dependência de outros parceiros protéicos para seu acoplamento ao DNA. Entretanto, os ensaios de polimerização *in vitro* mostraram que a TcPol κ mitocondrial possui uma capacidade intrínseca de ligação ao DNA. Isto pode ser explicado pela presença de estruturas hélice-grampo-hélice nos motivos IV e V, as quais são descritas como domínios de ligação ao DNA (Johnson, et al., 1999).

A análise filogenética dos ortólogos de TcPol κ está de acordo com a história evolutiva dos tripanosomatídeos. Portanto as diferenças com relação à região C-terminal – quando comparada aos outros correspondentes eucarióticos – estão relacionadas ao fato de os tripanosomatídeos terem divergido muito cedo durante sua história evolutiva.

Diferentemente de outros ortólogos de Polκ, a seqüência da TcPolκ mitocondrial possui dois sinais putativos de endereçamento celular – para a mitocôndria e para o núcleo. Como nesta tese pretendíamos inicialmente estudar apenas uma das cópias do gene *TcPOLK*, decidimos determinar a localização desta proteína através de expressão em fusão com GFP, uma vez que por imunofluorescência poderia ocorrer uma detecção indesejada da outra cópia do gene. A estratégia de localização por fusão com GFP também se mostrou adequada devido ao fato de este gene ser expresso em níveis extremamente baixos. De fato, trabalhos anteriores de caracterização da Polκ de humano também utilizaram a estratégia de localização por fusão com GFP, uma vez que o ortólogo de humano também é expresso em níveis que possivelmente não seriam detectáveis por imunofluorescência (Bergoglio et al., 2002; Ogi et al., 2005). Além disso, a estratégia de localização por GFP tem se mostrado fidedigna. Trabalhos anteriores mostram que a fusão de GFP à região C-terminal de uma proteína de interesse não altera sua localização celular (Lo et al., 1998). Através de microscopia confocal, verificamos que a cópia de TcPolκ estudada nesta tese é endereçada para a mitocôndria e sua localização é restrita ao cinetoplasto, concentrando-se principalmente nos sítios antipodais.

Dentre todas as particularidades encontradas no *T. cruzi*, talvez a mais distinta seja o seu DNA mitocondrial. Diferentemente de outros organismos eucariotos, o DNA mitocondrial dos tripanosomatídeos está organizado em uma estrutura extremamente complexa, a qual requer a participação de um grande número de enzimas para completar todas as etapas de sua replicação (Liu, et al., 2005). Algumas enzimas que em outros eucariotos se encontram localizadas no núcleo, nos tripanosomatídeos apresentam localização mitocondrial. A mitocôndria de mamíferos, por exemplo, possui apenas uma DNA polimerase – Polγ (Hudson & Chinnery, 2006) – ao passo que em tripanosomatídeos já foi verificada a presença de pelo menos seis – Polβ, Polβ-PAK, Pol IA, Pol IB, Pol IC e Pol ID (Klingbeil et al., 2002; Liu et al., 2005; Lopes et al., 2008; Saxowsky et al., 2003). Cada uma destas DNA polimerases possui um papel específico na duplicação do kDNA. De fato, estudos em *T. brucei* mostram que a inibição de um destes genes compromete a duplicação do cinetoplasto (Klingbeil, Shawn A Motyka, & Paul T Englund, 2002).

Embora a TcPolκ mitocondrial também possua um sinal putativo de endereçamento nuclear, nós não conseguimos detectar nenhuma presença desta proteína no núcleo, mesmo quando examinamos uma versão truncada contendo apenas o sinal nuclear. Entretanto, conseguimos verificar que a outra cópia de TcPolκ apresenta localização nuclear.

Em *T. brucei*, o número de cópias do gene *POLK* é superior ao encontrado em *T. cruzi*. Seu genoma apresenta dez cópias do gene *POLK*, sendo que análises *in silico* das seqüências indicam que seis cópias possuiriam uma possível localização mitocondrial (dados não mostrados). Ainda não se sabe a razão para a presença de tantas cópias de *POLK* no genoma do *T. brucei*. Caso a proteína codificada por este gene esteja realmente envolvida em processos de recombinação, uma possível explicação para a multiplicidade de cópias de *POLK* em *T. brucei* poderia estar relacionada à forma com a qual este parasito evade ao sistema imune do hospedeiro. Os processos de variação antigênica com os quais o *T. brucei* evita o ataque imunológico ocorrem através da troca de proteínas de superfície (Passos-Silva et al., 2010). Este mecanismo é regulado pela recombinação homóloga, permitindo que cada hora um gene de proteína de superfície seja inserido no sítio de expressão. Essa inserção ocorre pela geração de DSBs na região contendo o gene, seguida da inserção no sítio de expressão por recombinação, o que permite que em um determinado momento apenas uma proteína de superfície é expressa na membrana externa do parasito. À medida que o sistema imunológico do hospedeiro apresenta uma resposta a essa proteína, o parasito troca a proteína que está sendo expressa (Passos-Silva et al., 2010). Dessa forma, o alto número de genes de *POLK* em *T. brucei* poderia estar relacionado à necessidade de uma maior expressão desse gene, bem como também a uma maior necessidade de variações do gene de *POLK* para atuar em situações distintas.

Em humano e em camundongo, o gene *POLK* está presente no genoma em apenas uma cópia. Entretanto, cerca de dez isoformas protéicas são produzidas por processamento alternativo do transcrito (Guo et al., 2005). Assim como as diferentes cópias de *TcPOLK*, estas diferentes isoformas compartilham a mesma região catalítica, diferindo entre si quanto às regiões N e C-terminal. Alguns trabalhos propõem que estas formas alternativas poderiam estar interagindo com diferentes

parceiros protéicos em vias bioquímicas distintas, mas ainda não existe nenhum dado experimental demonstrando este evento.

Após verificar que TcPolκ-2 é uma proteína mitocondrial, decidimos investigar quais poderiam ser suas funções bioquímicas no cinetoplasto. Para isto, examinamos sua atividade enzimática *in vitro*. Trabalhos anteriores mostram que a fusão de proteínas à extremidade N-terminal da Polκ de humano não compromete sua atividade de DNA polimerase (Gerlach et al., 2001; Zhang et al., 2000). Como a organização dos domínios N-terminais da TcPolκ mitocondrial é bastante similar à da Polκ de humano, resolvemos expressar a TcPolκ mitocondrial em fusão N-terminal com MBP e purificá-la por cromatografia de afinidade, uma vez que esta metodologia já estava padronizada em nosso laboratório. Nossos resultados indicaram que o produto do gene *TcPOLK-2* é de fato uma DNA polimerase. Em um ensaio de polimerização de DNA, TcPolκ mitocondrial foi capaz de estender completamente um iniciador-molde.

Visando analisar o papel biológico de TcPolκ-2, nós obtivemos uma cultura de parasitos superexpressando esta DNA polimerase. Através de análises por *Southern blot*, foi possível confirmar a integração do vetor pROCK-Polκ-NEO no genoma do parasito. De fato, é possível verificar que a banda correspondente ao gene exógeno apresenta um sinal mais intenso que o de *TcPOLK-2* endógeno, sugerindo que o vetor pode ter integrado em mais de uma cópia do gene codificador de β-tubulina. Ao analisar os níveis de RNA mensageiro em culturas selvagens e transfectadas, não foi possível detectar a expressão de *TcPOLK-2* endógeno, apesar de ter sido comprovada a superexpressão do gene em parasitos transfectados. Para investigar se a expressão deste gene poderia ser detectada em outras fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, foi feita análise por *Northern blot* utilizando RNA das formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Também neste experimento não foi detectada a expressão de *TcPOLK-2* (dados não mostrados). A baixa expressão basal de *TcPOLK-2* levanta duas possibilidades: (i) baixas quantidades de TcPolκ mitocondrial são suficientes para sua função biológica; (ii) o gene *TcPOLK-2* é induzido em situações específicas (por exemplo, em resposta a estresses genotóxicos). Como uma das perspectivas deste trabalho, pretendemos futuramente examinar a

expressão deste gene após tratamento com agentes genotóxicos, bem como através de metodologias mais sensíveis, como *RT/Real Time-PCR*.

Verificamos que a superexpressão de *TcPOLK-2* aumenta a sobrevivência de *T. cruzi* a H_2O_2 . A H_2O_2 é uma molécula relativamente inerte, mas pode gerar radicais hidroxila que danificam o DNA (Friedberg, 1995). A lesão mais comum causada por estes radicais é a base modificada 8-oxoG, a qual gera mutações e bloqueia parcialmente a replicação do DNA (Gedik et al., 2002). Assim como outros ortólogos descritos, a *TcPolκ* mitocondrial demonstrou a capacidade de polimerizar através desta lesão em experimentos *in vitro*. A presença de *TcPolκ-2* na mitocôndria pode estar associada a um papel desta enzima na manutenção do kDNA. Uma vez que os tripanosomatídeos possuem apenas uma mitocôndria, uma eficiente duplicação do kDNA é crucial para a divisão da célula. Assim, o bloqueio de forquilha de replicação causado por lesões de 8-oxoG poderia ser letal para o *T. cruzi*. A atividade de síntese translesão poderia permitir que a replicação do kDNA progredisse mesmo na presença de lesões causadas por estresse oxidativo.

Um outro trabalho realizado em nosso laboratório que descreve a existência de duas cópias de Polb em *T. cruzi* (*TcPolβ* e *TcPolβ-PAK*) mostrou que a *Polβ-PAK* de *T. cruzi* – ao contrário da *TcPolβ* – também é capaz de replicar DNA contendo 8-oxoG (Lopes et al., 2008). Ainda não se sabe qual seria a explicação para a existência, na mitocôndria de tripanosomatídeos, de duas DNA polimerases capazes de replicar através do mesmo tipo de lesão. Entretanto, é possível levantar hipóteses baseadas na localização destas duas proteínas. Enquanto a *TcPolβ-PAK* está localizada principalmente no centro do “disco” do cinetoplasto (Lopes et al., 2008; Saxowsky et al., 2003), a *TcPolκ* mitocondrial possui sua localização mais concentrada nos sítios antipodais, onde também se localiza a *TcPolβ* (Lopes et al., 2008). As etapas de divisão do kDNA que ocorrem nos sítios antipodais são diferentes das que ocorrem no disco, além de ocorrerem em momentos diferentes da duplicação do kDNA (Liu et al., 2005). Provavelmente, as atuações das DNA polimerases *TcPolβ-PAK* e da *TcPolκ* mitocondrial diferem entre si quanto às proteínas com as quais elas interagem e quanto ao momento em que elas são recrutadas.

A síntese translesão é um processo que necessita ser bem controlado, uma vez que as DNA polimerases que a realizam possuem baixa fidelidade e são capazes

de gerar mutações quando replicam DNA não danificado. No núcleo de eucariotos, este processo é orquestrado pelo PCNA, o qual faz o recrutamento das diferentes DNA polimerases replicativas e de translesão (Maga & Hubscher, 2003). Ainda não sabemos como é feito o recrutamento das DNA polimerases na síntese translesão do kDNA. Os genomas de tripanosomatídeos possuem os genes que codificam as subunidades do PCNA, mas não apresentam nenhum correspondente putativo que poderia ser endereçado à mitocôndria. Ao analisar a seqüência da TcPolκ mitocondrial, nós não identificamos nenhum motivo conservado de ligação ao PCNA. Porém, verificamos a presença de dois resíduos adjacentes de fenilalanina na extremidade C-terminal da DNA polimerase. Nos ortólogos de Polκ em humano e camundongo, estes dois resíduos de fenilalanina são indispensáveis para o acoplamento da DNA polimerase ao PCNA (Ogi et al., 2005). Estudos futuros serão necessários para esclarecer como ocorre o recrutamento das DNA polimerases na mitocôndria do *T. cruzi*.

Como mostrado anteriormente por Takeda e colaboradores (1986) e Regis-da-Silva e colaboradores (2006), o *T. cruzi* é capaz de sobreviver quando exposto a altas doses de radiação gama. Este tipo de radiação induz quebras duplas no DNA, as quais neste parasito acreditam-se estarem sendo reparadas principalmente por recombinação homóloga, uma vez que o *T. cruzi* não possui enzimas chaves do NHEJ (El-Sayed et al., 2005). A resposta do *T. cruzi* frente à radiação gama é similar à observada em *Deinococcus radiodurans*, sendo caracterizada por três estágios: (i) interrupção do crescimento da cultura e indução de genes do reparo por recombinação; (ii) aumento das taxas de reparo de DNA; (iii) inibição das proteínas do reparo por recombinação. Nós verificamos que parasitos superexpressando TcPOLK apresentaram maior recuperação do crescimento após a irradiação, quando comparados a parasitos selvagens. De fato, esta resposta observada nos parasitos transfectados foi similar à observada em parasitos superexpressando a proteína Rad51, a qual possui um papel crucial na recombinação homóloga (Regis-da-Silva et al., 2006).

O reparo por recombinação homóloga consiste no processamento da região da quebra dupla, gerando uma extremidade de fita simples de DNA. Em seguida, esta extremidade invade uma dupla fita homóloga de DNA. Finalmente, ocorre a replicação do DNA, utilizando a fita invasora como o iniciador e fita homóloga como o molde

(McIlwraith et al., 2005). Utilizando um iniciador-molde que mimetiza a última etapa do reparo por recombinação homóloga, nós verificamos que a TcPol κ mitocondrial é capaz de realizar síntese de DNA em um intermediário da recombinação. Somado à maior tolerância à radiação gama observada em parasitos superexpressando a TcPol κ mitocondrial, este resultado sugere que esta DNA polimerase poderia estar envolvida na recombinação homóloga.

Por muito tempo se pensou que o DNA mitocondrial de organismos eucariotos não era reparado, desde que foi verificado que não há remoção de dímeros de pirimidina do mtDNA de células de mamíferos (Clayton et al., 1974). Mas há alguns anos vários trabalhos mostraram que esta afirmação estava incorreta (revisado em Bohr & Anson, 1999; Gredilla et al., 2010). Eventos mitocondriais de reparo por excisão de base (BER) e de reparo de erros de pareamento vêm sendo descritos (Mason et al., 2003; Stuart et al., 2005). Indícios de recombinação homóloga mitocondrial também têm sido reportados por diferentes grupos (revisado em Liu & Demple, 2010).

Visando investigar melhor os mecanismos de reparo de DNA mitocondrial e aumentar nossos conhecimentos a respeito do reparo de DNA em *T. cruzi*, decidimos quantificar o aparecimento e a subsequente remoção de lesões nos genomas nuclear e mitocondrial desse parasito. Para isto, padronizamos a técnica de qPCR para o estudo em *T. cruzi*.

O ensaio de qPCR se baseia no princípio de que se quantidades iguais de DNA extraídas de amostras diferentes são amplificadas quantitativamente utilizando as mesmas condições e os mesmo reagentes, a amostra de DNA que possuir mais lesões irá amplificar menos do que a amostra que não foi submetida a tratamento (Santos et al., 2006). A técnica de qPCR é realizada amplificando longos fragmentos – geralmente entre 10 e 20 kb – utilizando uma quantidade de ciclos que permita que a reação termine antes de chegar na fase estacionária da amplificação. Dessa forma, com a reação de qPCR terminando durante a fase logarítmica da curva de amplificação, a presença de pequenas quantidades de lesões no DNA molde fará com que ocorra uma redução na quantidade de produto amplificado (Santos et al., 2006).

Neste estudo, os ensaios de qPCR foram realizados amplificando fragmentos de aproximadamente 10 kb, tanto do genoma nuclear quanto do genoma mitocondrial.

A escolha da região nuclear a ser amplificada foi arbitrária, apenas evitando que os iniciadores não se anelassem a algum gene que pudesse estar presente em múltiplas cópias, a fim de evitar que a amplificação fosse inespecífica. O genoma do *T. cruzi* não apresenta regiões intergênicas muito extensas, além de ser transcrito de forma policistrônica (Clayton, 2002). Sendo assim, decidimos não realizar nenhuma comparação do nível de reparo de DNA entre regiões codificadoras e não-codificadoras.

A técnica de qPCR permite que o experimento seja realizado utilizando pequenas quantidades de DNA extraído, tornando possível analisar os níveis de reparo tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial, da mesma amostra extraída. E uma vez que as amplificações geradas são bastante específicas, não é necessário nenhum procedimento adicional para a separação dos genomas nuclear e mitocondrial (Santos et al., 2006).

O genoma mitocondrial do *T. cruzi* é composto por milhares de cópias de minicírculos e por algumas dúzias de maxicírculos (Liu et al., 2005). Apesar de os minicírculos representarem a maior parte do genoma mitocondrial, o comprimento de cada um dos anéis de minicírculos é pequeno – por volta de 1,4 kb – o que impossibilita fazer uma medição precisa dos danos presentes nessas moléculas. Dessa forma, todas as medições de reparo de DNA mitocondrial feitas nesta tese foram realizadas usando os maxicírculos como DNA molde. Uma vez que os maxicírculos possuem uma seqüência de cerca 22 kb e são moléculas correspondentes ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos (Liu et al., 2005), julgamos que a análise do seu reparo produziria resultados que poderiam ser comparados aos resultados obtidos em outros organismos.

A correta análise dos resultados gerados pelo ensaio de qPCR deve levar em conta as variações que podem ocorrer quanto à quantidade de DNA mitocondrial total. O DNA total de células de mamíferos é composto por aproximadamente 99% de DNA nuclear e 1% de DNA mitocondrial. Além disso, uma célula de mamífero pode conter de centenas a milhares de mitocôndrias. Dessa forma, se um tratamento genotóxico leva à redução do número de mitocôndrias em cada célula – mitofagia – ocorrerá uma intensa redução dos níveis de amplificação do DNA mitocondrial (Santos et al., 2006). Essa redução da amplificação ocorrerá não apenas pelo surgimento de lesões, mas

também como consequência da redução do DNA mitocondrial total. Isso ocorre porque a variação na concentração relativa do DNA mitocondrial não é detectável durante a dosagem, já que o DNA mitocondrial de células de mamíferos representa apenas cerca de 1% do DNA total. Visando evitar esse viés na análise dos resultados, é necessário normalizar o número de cópias do DNA mitocondrial através da amplificação de um fragmento pequeno, que deve possuir menos de 300 pb. O princípio por trás dessa normalização é que a amplificação desse fragmento pequeno reflete apenas a amplificação do DNA não tratado, devido à baixa probabilidade de uma lesão aparecer em um segmento de DNA tão pequeno.

O *T. cruzi* é um organismo que possui apenas uma mitocôndria (Wanderley de Souza, 2002). Entretanto, como essa organela contém várias cópias de maxicírculos, nós também realizamos esta normalização a fim de evitar um viés resultante da variação do número de cópias dessas moléculas. Como o DNA mitocondrial total – incluindo maxicírculos e minicírculos – representam cerca de 30% do DNA total do *T. cruzi* (Wanderley de Souza, 2002), nós também utilizamos um controle amplificando um segmento curto do DNA nuclear, já que alterações severas na quantidade de DNA mitocondrial também afetariam a concentração relativa do DNA nuclear.

Realizamos então ensaios de qPCR, a fim de examinar o comportamento do *T. cruzi* após o tratamento com diferentes tipos de agentes genotóxicos. O primeiro agente genotóxico que nós avaliamos foi o MMS. De acordo com os resultados obtidos aqui, a exposição do *T. cruzi* ao MMS leva ao aparecimento de lesões nos genomas nuclear e mitocondrial, ambos em quantidades similares. Entretanto, o reparo no DNA mitocondrial demonstrou ser mais eficiente que o reparo no DNA nuclear. De fato, observamos um leve aumento no número de lesões após 5 horas do tratamento. Isso sugere que possivelmente os genomas do nuclear e mitocondrial são reparados por mecanismos diferentes. Uma vez que o MMS é uma substância que interage majoritariamente apenas com o DNA (Beranek, 1990), descartamos a possibilidade de este aumento ser consequência de efeitos secundários do MMS no metabolismo celular deste parasito.

O resultado obtido com o tratamento com MMS revelou que o *T. cruzi* possui mecanismos de reparo de DNA na mitocôndria. De fato, a mitocôndria do *T. cruzi* aparenta ter um papel importante na biologia do parasito. Como citado anteriormente,

diferentemente dos outros eucariotos, o *T. cruzi* possui apenas uma única mitocôndria e a manutenção de seu mtDNA é crucial para a vida do parasito (Liu et al., 2005). Várias proteínas que em outros organismos se localizam no núcleo, no *T. cruzi* apresentam localização mitocondrial. Além das já citadas TcPol β e TcPol β -PAK (Lopes et al., 2008) e TcPol κ , resultados obtidos em nosso laboratório revelaram que uma pequena quantidade de TcOGG1 também é direcionada para esta organela (Kunrath-Lima, 2010). Ainda não sabemos ao certo as proteínas envolvidas no reparo mitocondrial das lesões induzidas por MMS. Nossos resultados obtidos com parasitos superexpressando TcPol κ mitocondrial revelaram que o aumento da expressão desta DNA polimerase não alterou o comportamento do *T. cruzi* frente a esta droga. De fato, diversas curvas de sobrevivência foram feitas em nosso laboratório, utilizando parasitos superexpressando diferentes genes do reparo de DNA. Assim como visto com a TcPol κ mitocondrial, nenhum dos superexpressores apresentou aumento na sobrevivência ao MMS. Uma possível explicação para isto seria o fato de que o MMS poderia estar causando lesões que levariam a uma parada do ciclo celular, durante a qual o parasito repararia o DNA. Esta parada seria similar à observada após a exposição à radiação gama. Dessa forma, ao fazermos curvas de sobrevivência contando os parasitos apenas 48 horas após o tratamento, não estaríamos dando o tempo necessário aos parasitos para que estes reparem o DNA e retomem o crescimento celular. Experimentos futuros serão necessários para verificar se a superexpressão de genes de reparo de DNA levam a uma melhor recuperação da curva de crescimento do *T. cruzi*, após o tratamento com MMS.

Fizemos o ensaio de qPCR utilizando tratamento com H₂O₂, e este gerou resultados surpreendentes. Como visto por Santos e colaboradores (2003), a exposição de células de humanos à H₂O₂ leva a um aparecimento relativamente alto de lesões no DNA mitocondrial – 3,48 lesões por 10 kb – ao passo que nenhuma lesão ocorre no DNA nuclear. Esse resultado é bem contrastante com os resultados obtidos durante a execução desta tese, já que após o tratamento com H₂O₂ nós observamos um maior número de lesões no núcleo e um baixo número de lesões no DNA mitocondrial. Em humanos, a ausência de lesões no núcleo é explicada pela baixa disponibilidade de átomos de ferro e cobre nessa organela, o que faz com que a reação de Fenton não ocorra e, por consequência, não produza as espécies de oxigênio altamente reativas com o DNA (Santos et al., 2003).

Ainda não sabemos por que ocorre um alto surgimento de lesões nucleares após o tratamento com H_2O_2 no *T. cruzi*, mas supomos que a explicação para tal evento também esteja relacionada à disponibilidade de átomos de ferro e cobre nesta organela do parasito. Em adição a isto, as enzimas do *T. cruzi* responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) se encontram no citoplasma, nos glicosomas e na mitocôndria. Entre estas é possível citar as superóxido dismutases, as peroxidases dependentes de trypanotiona, a peroxidase dependente de glutathiona-espermidina, a triparredoxina peroxidase, entre outras (Irigoín et al., 2008). O fato de várias dessas enzimas responsáveis pela redução de ROS estarem na mitocôndria e nenhuma dessas se encontrarem no núcleo poderia explicar a discrepância do número de lesões entre as duas organelas, no tempo zero após o tratamento.

Apesar da baixa incidência de lesões induzidas por H_2O_2 no mtDNA, constatamos que o reparo dessas lesões é pouco eficiente. Inicialmente ocorre uma pequena redução do número de lesões, mas após 24 horas esse número torna a aumentar.

Resultados produzidos em nosso laboratório sugerem que as lesões mitocondriais geradas por H_2O_2 podem ser reparadas por proteínas pertencentes ao BER. Esses estudos mostraram indícios do envolvimento de TcOGG1 (Furtado et al., dados não publicados) e de TcPol β (Schamber-Reis et al., dados não publicados) no reparo de lesões oxidativas no mtDNA. Paralelamente, também existem indícios de que essas lesões podem ser reparadas por recombinação homóloga no *T. cruzi*. Experimentos realizados em nosso laboratório utilizando parasitos superexpressando Rad51 mostraram que essa recombinase atua no reparo de lesões geradas por H_2O_2 (Passos-Silva, 2010). Mecanismos de BER mitocondrial têm sido reportados na literatura científica ao longo dos últimos anos. Aparentemente esta é a principal via que atua no reparo de DNA mitocondrial. Estudos recentes mostraram a identificação de integrantes desta via, como glicosilases (mtOGG1 e mtUNG), DNA ligase (mtLigase III) e DNA polimerase (Pol γ) (Souza-Pinto et al., 2008).

Diferentemente dos outros agentes genotóxicos testados nesta tese, a H_2O_2 interage com outras moléculas além do DNA (Friedberg, 1995). Essa propriedade da H_2O_2 levanta duas hipóteses – as quais poderiam estar acontecendo

simultaneamente – que poderiam explicar o reparo ineficiente de lesões induzidas por H_2O_2 . A primeira hipótese se deve ao fato de que as ROS geradas pela H_2O_2 também reagem com bases livres (Setoyama et al., 2011). Dessa forma, é provável que após a excisão das bases oxidadas no mtDNA, ocorra a inserção de outras bases que foram oxidadas enquanto estavam no citoplasma e na matriz mitocondrial. A segunda hipótese é relacionada à capacidade das ROS de reagir com lipídeos e proteínas, ou seja, com os componentes da membrana mitocondrial. A oxidação das proteínas e lipídeos da membrana mitocondrial pode levar à perda do potencial de membrana, a qual é prejudicial à célula por danificar a importação de proteínas para a mitocôndria. Isso faria com que ocorresse uma diminuição das proteínas responsáveis pelo reparo do DNA nessa organela. Por outro lado, a oxidação de proteínas da cadeia respiratória – juntamente com a perda de potencial de membrana – pode danificar o funcionamento correto da respiração celular, aumentando a produção secundária de ROS (Santos et al., 2003).

Resolvemos testar a segunda hipótese, e para isso nós repetimos o ensaio expondo o *T. cruzi* a um tratamento mais longo com H_2O_2 , além de também examinarmos a atividade mitocondrial após o tratamento com esse agente genotóxico através da quantificação do consumo basal de oxigênio. Como descrito por Santos e colaboradores (2003), tratamentos mais longos com H_2O_2 levam a uma maior perda de potencial de membrana, e conseqüentemente, a uma maior produção secundária de ROS na mitocôndria. Nossos resultados mostraram que, de forma semelhante ao observado em células humanas, o tratamento com H_2O_2 resulta em um comprometimento da atividade mitocondrial do *T. cruzi*.

A hipótese que leva em conta a incorporação de bases oxidadas foi testada paralelamente por outro trabalho do nosso grupo de pesquisa (Furtado et al., dados não publicados). Neste estudo, foi analisado o reparo de lesões induzidas por H_2O_2 , utilizando parasitos que superexpressam a proteína MutT de *E. coli*. Esta proteína tem a capacidade de remover guaninas oxidadas do *pool* de nucleotídeos. Ao hidrolisar moléculas de 8oxo-dGTP – convertendo-as a 8oxo-dGMP – a MutT evita que guaninas oxidadas sejam incorporadas ao DNA (Setoyama et al., 2011). Como observado neste estudo, a superexpressão de MutT reduz o nível basal de lesões no mtDNA do *T. cruzi*. Entretanto, o perfil do reparo de lesões induzidas por H_2O_2 é bem semelhante ao observado em parasitos selvagens, uma vez que nos parasitos

superexpressando MutT também ocorre a persistência de lesões no mtDNA (Furtado et al., dados não publicados). Este fato reforça a importância da presença de DNA polimerases de síntese tranlesão no cinetoplasto do parasito. Dessa forma, os papéis de TcPol κ -2 (verificados nesta tese de doutorado) e de TcPol β -PAK na síntese através de bases oxidadas provavelmente são cruciais para a sobrevivência do *T. cruzi*.

Realizamos o ensaio de qPCR com parasitos tratados com cisplatina. Assim como o tratamento com MMS, o tratamento com cisplatina gerou quantidades similares de lesões tanto no nDNA quanto no mtDNA. Isso indica que apesar de os maxicírculos estarem inseridos em uma densa rede de anéis de DNA – composta em sua maioria por minicírculos e proteínas de sustentação – estes estão susceptíveis a sofrerem ataques de agentes genotóxicos. A quantificação da remoção das lesões causadas por cisplatina gerou resultados extremamente surpreendentes. De forma inesperada, o *T. cruzi* foi capaz de reparar todas as lesões induzidas por cisplatina em um espaço muito curto de tempo. Além disso, as lesões mitocondriais foram reparadas na mesma proporção que as lesões nucleares.

O reparo mitocondrial de cisplatina foi reportado em 1992 pelo grupo de pesquisa liderado por Vilhelm Bohr, quando estes verificaram o reparo mitocondrial de *crosslinks* inter-fita gerados por cisplatina em células CHO (do inglês *Chinese hamster ovary cells*) (LeDoux et al., 1992). No mesmo trabalho, foi verificado que as lesões do tipo intra-fita não eram reparadas. Cinco anos depois, pesquisadores verificaram que células CHO são incapazes de reparar adutos de cisplatina no mtDNA (Olivero et al., 1997). Paralelamente, estudos mostraram que uma endonuclease mitocondrial é capaz de reconhecer e clivar adutos de cisplatina (Ikeda & Ozaki, 1997).

Recentemente foi relatada a presença das proteínas CSA e CSB – as quais pertencem à via do NER – na mitocôndria de células humanas (Stevnsner et al., 2002). De fato, portadores das síndromes da síndrome de Cockayne – a qual é resultado de mutações em CSA ou CSB – apresentam alguns sintomas ligados à instabilidade do DNA mitocondrial, como envelhecimento precoce (Nance & Berry, 1992). Entretanto, essa localização mitocondrial dessas proteínas está aparentemente ligada a um mecanismo de BER no mtDNA. Resultados mostram que, mediante estresse oxidativo, CSA e CSB formam complexos com a OGG1 e a SSBP1

mitocondriais, atuando na prevenção a mutações no mtDNA e apoptose (Kamenisch et al., 2010).

Visando investigar melhor se poderia haver um mecanismo de NER mitocondrial em *T. cruzi*, nós realizamos o ensaio de qPCR tratando o parasito com outro agente genotóxico que produz lesões removidas por esta via de reparo. Para isto, submetemos o *T. cruzi* à radiação UV e examinamos a remoção das lesões no DNA ao longo do tempo. As principais lesões geradas pela radiação UV são os dímeros de pirimidina – sobretudo os de timina – e os fotoprodutos (6-4). Esses dois tipos de lesões podem ser reparados pelo NER, além de poderem ser reparados por recombinação homóloga, reparo de ICLs ou por fotoreativação por meio de fotoliasas (de Gruijl et al., 2001). Como o *T. cruzi* não codifica nenhuma enzima com atividade de fotoliase (El-Sayed et al., 2005; Passos-Silva et al., 2010), nossas atenções foram voltadas para as demais vias de reparo citadas acima.

Os resultados obtidos após o tratamento com UV foram contrastantes com os resultados gerados pelo ensaio com cisplatina. As lesões induzidas por cisplatina foram reparadas tanto no núcleo quanto na mitocôndria, ao passo que as lesões induzidas por UV foram reparadas apenas no mtDNA. E mesmo essas lesões mitocondriais induzidas por cisplatina ou por UV apresentaram uma cinética de reparo bem distintas entre si. Este resultado sugere que o mecanismo de remoção das lesões causadas por cisplatina é diferente do mecanismo que remove lesões causadas por UV.

Assim como visto para o reparo mitocondrial de lesões induzidas por cisplatina, não existem relatos consistentes na literatura científica a respeito de reparo mitocondrial de lesões induzidas por UV. Este fato nos levou a investigar quais mecanismos poderiam estar atuando neste reparo mitocondrial de lesões que provocam distorções na molécula do DNA. Para isto resolvemos examinar a localização celular de algumas proteínas que atuam no NER e no reparo de ICLs. Escolhemos quatro proteínas de interesse, sendo que duas destas atuam exclusivamente no NER – XPD e HR23B – e duas atuam no NER e também no reparo de ICLs através de processos de recombinação homóloga – XRCC3 e ERCC1.

Verificamos que as duas proteínas que são exclusivas do NER apresentaram uma forte localização nuclear. Os focos de localização se concentraram em regiões

do núcleo onde o genoma não está condensado. Isto sugere que estas proteínas devem se posicionar próximas a regiões contendo DNA não condensado, o que provavelmente aumentaria a eficiência do reparo em regiões que estão sendo ativamente transcritas. O fato de estas duas proteínas estarem fortemente localizadas no núcleo sugere que o NER não seria a via de reparo decisiva para o reparo das lesões induzidas por cisplatina e UV, uma vez que apenas uma fraca fluorescência foi visualizada fora do núcleo. Como os experimentos de localização foram feitos através da expressão transiente das proteínas de interesse em fusão com GFP, é provável que essa fluorescência visualizada fora do núcleo seja consequência de uma superexpressão da proteína de fusão, e que não reflita suas verdadeiras localizações.

A localização das duas proteínas que atuam no NER e no reparo de ICLs apresentou resultados distintos. Ambas as proteínas apresentaram uma localização difusa no corpo do parasito, porém, com fortes focos de localização na região adjacente ao cinetoplasto, denominada zona cinetoflagelar (KFZ). Esta região é conhecida por abrigar os eventos de replicação do DNA mitocondrial do *T. cruzi*, e é onde ocorrem alguns processos de reparo de DNA durante a própria replicação. A localização de ERCC1 e XRCC3 na mitocôndria do *T. cruzi* reforça a possibilidade de recombinação mitocondrial neste parasito, e sugere que as lesões induzidas por cisplatina e UV sejam reparadas por processos que se utilizam da recombinação homóloga, como o próprio mecanismo do reparo de ICLs.

Como citado anteriormente nesta tese, uma possível recombinação homóloga na mitocôndria não seria exclusividade do *T. cruzi*. Durante a década de 1990, foi observado indícios de recombinação mitocondrial em células de mamíferos (Thyagarajan et al., 1996). Em adição a isto, estudos feitos com *Arabidopsis thaliana* verificaram que algumas proteínas homólogas à recombinase RecA são endereçadas para a mitocôndria (Khazi et al., 2003). Recentemente, foi constatado que as proteínas da recombinação Rad51, Rad51C e XRCC3 também são endereçadas à mitocôndria de células humanas (Sage et al., 2010). Em situações normais, estas proteínas estão difusas no citoplasma, mas os níveis mitocondriais dessas proteínas aumentam após estresse genotóxico, além de ocorrer a interação de Rad51 com o mtDNA. Neste estudo, a deleção de cada uma destas três proteínas levou a uma redução no número de cópias do DNA mitocondrial além de ter suprimido o aumento do número de cópias de mtDNA induzido por estresse oxidativo (Sage et al., 2010).

Os nossos resultados com o estudo da TcPolκ mitocondrial, descritos aqui nesta tese, sugeriram a possibilidade da existência de recombinação mitocondrial em *T. cruzi*. Estudos futuros serão feitos em nosso laboratório a fim de investigar melhor a existência de recombinação mitocondrial em *T. cruzi* e o seu reparo de lesões induzidas por cisplatina e UV. Pretendemos analisar a localização celular das demais proteínas envolvidas no NER e na recombinação.

Os processos de reparo de DNA aparentam ser cruciais para o sucesso parasitário do *T. cruzi*. Durante seu ciclo de vida, esse parasito depara-se com eventos que levam ao aparecimento de lesões em seu DNA. Durante a resposta imunológica à infecção no vetor vertebrado, ocorre a produção de diversos agentes que oxidam a molécula de DNA (Bogdan & Röllinghoff, 1999). Durante a dessecação dentro do vetor invertebrado, ocorrem quebras duplas no DNA do *T. cruzi*, as quais precisam ser reparadas prontamente. O maior entendimento das vias de tolerância a danos no DNA pode levar a uma melhor compreensão da biologia do *T. cruzi*, bem como à elaboração de novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas.

6. Referências

- Aboussekhra, a, Chanet, R., Adjiri, A., & Fabre, F. (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. *Molecular and Cellular Biology*, 12(7), 3224-34.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., et al. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry*, 276(22), 18665-72.
- Arczewska, K. D., & Kuśmierk, J. T. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 2. Role of bacterial mutator gene homologues in human disease. Overview of nucleotide pool sanitization and mismatch repair systems. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 435-57.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., et al. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D457-62.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, Felipe, et al. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2034-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Bavoux, C., Hoffmann, J. S., & Cazaux, C. (2005). Adaptation to DNA damage and stimulation of genetic instability: the double-edged sword mammalian DNA polymerase kappa. *Biochimie*, 87(7), 637-46.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, 231(1), 11-30.
- Bergoglio, V., Bavoux, C., Verbiest, V., Hoffmann, J. S., & Cazaux, C. (2002). Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 23), 4413-8.
- Bogdan, C., & Röllinghoff, M. (1999). How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, 15(1), 22-8.
- Bohr, V. A., & Anson, R. M. (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(4), 391-8.
- Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., & Woodgate, R. (2001). *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta. *Nucleic Acids Research*, 29(22), 4607-16.
- Boyce, R. P., & Howard-Flanders, P. (1964). Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K1-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 293-300.

- Braithwaite, D. K., & Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, *21*(4), 787-802.
- Brameier, M., Krings, A., & MacCallum, R. M. (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*, *23*(9), 1159-60.
- Brenneman, M. A., Wagener, B. M., Miller, C. A., Allen, C., & Nickoloff, J. A. (2002). XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Molecular Cell*, *10*(2), 387-95.
- Chagas, C. (1909). Nova Tripanosomíaze Humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *1*, 159-218.
- Claros, M. G., & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, *241*(3), 779-86.
- Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal*, *21*(8), 1881-1888.
- Clayton, D. A., Doda, J. N., & Friedberg, E. C. (1974). The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(7), 2777-81.
- Coin, F., Oksenysh, V., & Egly, J. M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Molecular cell*, *26*(2), 245-56.
- Cokol, M., Nair, R., & Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO reports*, *1*(5), 411-5.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, *16*(22), 10881-90.
- Costa, R. M., Chiganças, V., Galhardo, R. S., Carvalho, H., & Menck, C. F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, *85*(11), 1083-99.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(Suppl 1), 113-22.
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, *115*, 5-13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008.
- Coura, J. R., & Castro, S. L. de. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *97*(1), 3-24.
- DaRocha, Wanderson D, Silva, R. A., Bartholomeu, Daniella C, Pires, S. F., Freitas, Jorge M, Macedo, Andrea M, et al. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitology Research*, *92*(2), 113-20.

- Docampo, R., Souza, W. de, Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 251-61.
- Dulbecco, R. (1949). Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage with visible light. *Nature*, 163, 949-50.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-15.
- Fijalkowska, I. J., Dunn, R. L., & Schaaper, R. M. (1997). Genetic requirements and mutational specificity of the *Escherichia coli* SOS mutator activity. *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7435-45.
- Fischhaber, Paula L, Gerlach, Valerie L, Feaver, William J, Hatahet, Z., Wallace, S. S., & Friedberg, Errol C. (2002). Human DNA polymerase kappa bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37604-11.
- Friedberg, E. C. (2008, January). A brief history of the DNA repair field. *Cell research*, 18(1), 3-7.
- Friedberg, Errol C. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Fárez-Vidal, M. E., Gallego, C., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2001). Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 29(7), 1549-55.
- Gedik, C. M., Boyle, S. P., Wood, S. G., Vaughan, N. J., & Collins, A. R. (2002). Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*, 23(9), 1441-6.
- Gerencser, A. A., Neilson, A., Choi, S. W., Edman, U., Yadava, N., Oh, R. J., et al. (2009). Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Analytical Chemistry*, 81(16), 6868-78.
- Gerlach, V L, Aravind, L., Gotway, G., Schultz, R. A., Koonin, E. V., & Friedberg, E C. (1999). Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11922-7.
- Gerlach, V L, Feaver, W J, Fischhaber, P L, & Friedberg, E C. (2001). Purification and characterization of pol kappa, a DNA polymerase encoded by the human DINB1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 92-8.
- Goodgal, S. H., Rupert, C. S., & Herriot, R., In: & McElroy, W., & Glass, B. Eds. (1957). *The chemical basis of heredity*. Baltimore, MD: John Hopkins Press.

- Gredilla, R., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2010). Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. *Experimental Gerontology*, 45(7-8), 478-88. Elsevier Inc.
- Grujil, F. R., Van Kranen, H. J., & Mullenders, L. H. (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 19-27.
- Guhl, F, Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Yockteng, R., Cárdenas-Arroyo, F., Fornaciari, G, et al. (1999). Isolation of Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *American journal of physical anthropology*, 108(4), 401-7.
- Guminski, A. D., Harnett, P. R., & DeFazio, A. (2002). Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. *The Lancet Oncology*, 3(5), 312-8.
- Guo, C., Gao, T., Confer, N., Velasco-Miguel, S., & Friedberg, Errol C. (2005). Multiple PolK (POLK) transcripts in mammalian testis. *DNA Repair*, 4(3), 397-402.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J., et al. (2006). The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *The EMBO Journal*, 25(20), 4921-32.
- Hasty, P. (2008). Is NHEJ a tumor suppressor or an aging suppressor? *Cell Cycle*, (May), 1139-1145.
- Heyer, W., Ehmsen, K. T., & Solinger, J. A. (2003). Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends in Biochemical Sciences*, 28(10), 548-557.
- Hill, R. A. (1958). Radiation-sensitive mutant of Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30, 636-37.
- Hinz, J. M. (2010). Review Article Role of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(July), 582-603.
- Hoare, C. A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph* (p. 750 pp). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Hollaender, A., & Curtis, J. T. (1935). Effect of sublethal doses of monochromatic ultraviolet radiation on bacteria in liquid suspension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 33, 61-62.
- Howard-Flanders, P., Boyce, R. P., Simson, E., & Theriot, L. (1962). A genetic locus in E. coli K12 that controls the reactivation of UV-photoproducts associated with thymine in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 2109-2115.
- Hudson, G., & Chinnery, P. F. (2006). Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Human Molecular Genetics*, 15(2), R244-52.

- Ikeda, S., & Ozaki, K. (1997). Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(2), 291-4.
- Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohé, L., & Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(6), 733-42.
- Johnson, R E, Prakash, S, & Prakash, L. (2000). The human DINB1 gene encodes the DNA polymerase Poltheta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3838-43.
- Johnson, R. E., Prakash, S., & Prakash, L. (1999). Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, Pol. *Science*, 283(5404), 1001-1004.
- Kamenisch, Y., Foustari, M., Knoch, J., Thaler, A.-K. von, Fehrenbacher, B., Kato, H., et al. (2010). Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 379-90.
- Kelner, A. (1949). Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35(2), 73-9.
- Khazi, F. R., Edmondson, A. C., & Nielsen, B. L. (2003). An Arabidopsis homologue of bacterial RecA that complements an *E. coli* recA deletion is targeted to plant mitochondria. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4), 454-63.
- Klingbeil, M. M., Motyka, Shawn A, & Englund, Paul T. (2002). Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Cell*, 10(1), 175-186.
- Kobayashi, S., Valentine, M. R., Pham, Phuong, O'Donnell, M., & Goodman, Myron F. (2002). Fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase IV. Preferential generation of small deletion mutations by dNTP-stabilized misalignment. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34198-207.
- Krogh, B. O., & Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annual Review of Genetics*, 38, 233-71.
- Kropf, S. P., & Sá, M. R. (2009). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, ciências, saúde--Manguinhos*, 16 Suppl 1(December 2008), 13-34.
- Krwawicz, J., Arczewska, K. D., Speina, E., Maciejewska, A., & Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 413-34.
- Kunrath-Lima, M. (2010). *Caracterização funcional da 8-oxoguanina DNA glicosilase de Trypanosoma cruzi*.

- LeDoux, S. P., Wilson, G. L., Beecham, E. J., Stevnsner, T., Wassermann, K., & Bohr, V. A. (1992). Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, *13*(11), 1967-73.
- Lehmann, A. R., Kirk-Bell, S., Arlett, C. F., Paterson, M. C., Lohman, P. H., Weerd-Kastelein, E. a de, et al. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(1), 219-23.
- Li, X., & Heyer, W. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, *18*(1), 99-113.
- Lindahl, T, Karran, P., & Wood, R D. (1997). DNA excision repair pathways. *Current Opinion in Genetics & Development*, *7*(2), 158-69.
- Lindahl, Tomas. (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(9), 3649-53.
- Lindahl, Tomas. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, *362*(6422), 709-15.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C., & Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, *21*(8), 363-9.
- Liu, P., & Demple, B. (2010). DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *51*(5), 417-26.
- Liu, Yilun, Masson, J.-Y., Shah, R., O'Regan, P., & West, Stephen C. (2004). RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*, *303*(5655), 243-6.
- Llorca, O. (2007). Electron microscopy reconstructions of DNA repair complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, *17*(2), 215-20.
- Lo, W., Rodgers, W., & Hughes, T. (1998). Making genes green: creating green fluorescent protein (GFP) fusions with blunt-end PCR products. *BioTechniques*, *25*(1), 94-6, 98.
- Lone, S., Townson, S. A., Uljon, S. N., Johnson, R. E., Brahma, A., Nair, D. T., et al. (2007). Human DNA polymerase kappa encircles DNA: implications for mismatch extension and lesion bypass. *Molecular Cell*, *25*(4), 601-14.
- Lopes, D. O., Regis-da-Silva, C. G., Machado-Silva, A., Macedo, A. M., Franco, G. R., Hoffmann, J. S., et al. (2007). Analysis of DNA polymerase activity in vitro using non-radioactive primer extension assay in an automated DNA sequencer. *Genetics and Molecular Research*, *6*(2), 250-5.
- Lopes, D. O., Schamber-Reis, B. L. F., Regis-da-Silva, C. G., Rajão, M. A., Darocha, W. D., Macedo, A. M., et al. (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*, *7*(11), 1882-92.

- Maddukuri, L., Dudzińska, D., & Tudek, B. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 4. The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mammalian cells. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 469-82.
- Maga, G., & Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), 3051-60.
- Manke, I. A., Lowery, D. M., Nguyen, A., & Yaffe, M. B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5645), 636-9.
- Mason, P. A., Matheson, E. C., Hall, A. G., & Lightowers, R. N. (2003). Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 1052-8.
- Masson, J. Y., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Benson, F. E., & West, S. C. (2001). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8440-6.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., et al. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, 399(6737), 700-4.
- McIlwraith, M. J., McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Yilun, Fanning, E., Woodgate, Roger, et al. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular cell*, 20(5), 783-92.
- Melin, A. M., Perromat, A., & Délérís, G. (2001). Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to gamma-irradiation: a novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(2), 265-74.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L. H. F., & Foustieri, M. I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molecular Cell*, 27(2), 311-23.
- Moura, M. B., Schamber-reis, B. L. F., Gomes, D., Silva, P., Rajão, M. A., Macedo, A. M., et al. (2009). Cloning and Characterization of DNA Polymerase Eta from *Trypanosoma cruzi*: Roles for Translesion Bypass of Oxidative Damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(5), 375-86.
- Mu, D., Hsu, D. S., & Sancar, A. (1996). Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8285-94.
- Muniandy, P., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S., & Seidman, M. M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(1), 23-49.
- Nance, M. A., & Berry, S. A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *American Journal of Medical Genetics*, 42(1), 68-84.

- Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, Magda, Drunen, E. V., Maas, Alex, Theil, A. F., et al. (2004). The Structure-Specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 5776-5787.
- Nojima, K., Hohegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., et al. (2005). Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Research*, 65(24), 11704-11.
- Nouspikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 994-1009.
- Nowosielska, A. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 483-94.
- O-Wang, J., Kawamura, K., Tada, Y., Ohmori, H., Kimura, H., Sakiyama, S., et al. (2001). DNA polymerase kappa, implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. *Cancer Research*, 61(14), 5366-9.
- Ogi, T., Mimura, J., Hikida, M., Fujimoto, H., Fujii-Kuriyama, Y., & Ohmori, H. (2001). Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(11), 943-53.
- Ogi, T., & Lehmann, A. R. (2006). The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nature Cell Biology*, 8(6), 640-2.
- Ogi, Tomoo, Kannouche, P., & Lehmann, Alan R. (2005). Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. *Journal of cell science*, 118(Pt 1), 129-36.
- Ogi, Tomoo, Shinkai, Y., Tanaka, K., & Ohmori, Haruo. (2002). Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15548-53.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., et al. (2001). Letter to the editor: Clarification on USDA-Animal and Plant Health Inspection Service estimates: A comment on. *Molecular Cell*, 8(1), 7-8.
- Olinski, R., Siomek, A., Rozalski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Guz, J., et al. (2007). Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochimica Polonica*, 54(1), 11-26.
- Olivero, O. A., Chang, P. K., Lopez-Larraz, D. M., Semino-Mora, M. C., & Poirier, M. C. (1997). Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutation Research*, 391(1-2), 79-86.

- O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., & Wood, R. D. (1994). XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, *371*(6496), 432-5.
- Passos-Silva, D. G. (2010). *Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA*.
- Passos-Silva, D. G., Rajão, M. A., Nascimento de Aguiar, P. H., Vieira-da-Rocha, J. P., Machado, C. R., & Furtado, C. (2010). Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *Journal of Nucleic Acids*, *2010*, 840768.
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell*, *1*(7), 969-79.
- Popanda, O., & Thielmann, H. W. (1992). The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1129*(2), 155-60.
- Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 317-53.
- Pérez, J., Gallego, C., Bernier-Villamor, V., Camacho, A., González-Pacanowska, D., & Ruiz-Pérez, L. M. (1999). Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *27*(3), 771-7.
- Pérez-Molina, J. A., Pérez-Ayala, A., Moreno, S., Fernández-González, M. C., Zamora, J., & López-Velez, R. (2009). Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(6), 1139-47.
- Qian, W., & Van Houten, B. (2010). Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods*, *51*(4), 452-7. Elsevier Inc.
- Rasmussen, R. E., & Painter, R. B. (1964). Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells. *Nature*, *203*, 1360-2.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, *375*(9723), 1388-1402. Elsevier Ltd.
- Regis-da-Silva, C. G., Freitas, J. M., Passos-Silva, D. G., Furtado, C., Augusto-Pinto, L., Pereira, M. T., et al. (2006). Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *149*(2), 191-200.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., & Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *66*(6), 981-93.

- Sage, J. M., Gildemeister, O. S., & Knight, K. L. (2010). Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 18984-90.
- Santos, J. H., Meyer, J. N., Mandavilli, B. S., & Van Houten, B. (2006). Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. *Methods in Molecular Biology*, 314, 183-199.
- Santos, Janine Hertzog, Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C., & Van Houten, Bennett. (2003). Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1728-34.
- Saxowsky, T. T., Choudhary, G., Klingbeil, M. M., & Englund, Paul T. (2003). Trypanosoma brucei has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49095-101.
- Setlow, R. B., & Carrier, W. L. (1964). The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 226-31.
- Setoyama, D., Ito, R., Takagi, Y., & Sekiguchi, M. (2011). Molecular actions of Escherichia coli MutT for control of spontaneous mutagenesis. *Mutation research*, 707(1-2), 9-14. Elsevier B.V.
- Shapiro, T. A. (1993). Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), 7809-13.
- Shivji, K. K., Kenny, M. K., & Wood, R. D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69(2), 367-74.
- Silvian, L. F., Toth, E. a, Pham, P, Goodman, M F, & Ellenberger, T. (2001). Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from Sulfolobus solfataricus. *Nature Structural Biology*, 8(11), 984-9.
- Simpson, L., Aphasizhev, R., Gao, G., & Kang, X. (2004). Mitochondrial proteins and complexes in Leishmania and Trypanosoma involved in U-insertion / deletion RNA editing. *RNA*, 10(2), 159-170.
- Singh, D. K., Ahn, B., & Bohr, V. A. (2009). Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. *Biogerontology*, 10(3), 235-252.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., & Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4(6), 1581-90.
- Souza, Wanderley de. (2002). Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 269-85.
- Souza-Pinto, N. C. de, Wilson, D. M., Stevnsner, T. V., & Bohr, V. A. (2008). Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair*, 7(7), 1098-109.

- Stevnsner, T., Nyaga, S., Souza-Pinto, N. C. de, Van der Horst, G. T. J., Gorgels, T., Hogue, B. A., et al. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene*, *21*(57), 8675-82.
- Stuart, J. A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N C, & Bohr, V A. (2005). Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Research*, *33*(12), 3722-32.
- Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., Van Der Spek, P. J., Eker, A. P., et al. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular cell*, *2*(2), 223-32.
- Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*, *265*(5176), 1241-3.
- Sá, M. R. (2005). The history of tropical medicine in Brazil: the discovery of Trypanosoma cruzi by Carlos Chagas and the German School of Protozoology. *Parasitologia*, *47*(3-4), 309-17.
- Takeda, G. K., Campos, R., Kieffer, J., Moreira, A. A., Amato Neto, V., Castilho, V. L., et al. (1986). Effect of gamma rays on blood forms of Trypanosoma cruzi. Experimental study in mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *28*(1), 15-8.
- Tang, J., & Chu, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair*, *1*(8), 601-616.
- Thyagarajan, B., Padua, R. A., & Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(44), 27536-43. Retrieved April 1, 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910339>.
- Tijsterman, M., Pril, R. de, Tasserón-de Jong, J. G., & Brouwer, J. (1999). RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast. *Molecular and cellular biology*, *19*(1), 934-40.
- Tornaletti, S. (2009). DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(6), 1010-20.
- Trimmer, E., & Essigmann, J. (1999). Cisplatin. *Essays in Biochemistry*, *34*, 191-211.
- Trincao, J., Johnson, Robert E, Wolfle, W. T., Escalante, C. R., Prakash, Satya, Prakash, Louise, et al. (2004). Dpo4 is hindered in extending a G.T mismatch by a reverse wobble. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(5), 457-62.
- Tudek, B., Swoboda, M., Kowalczyk, P., & Oliński, R. (2006). Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *57 Suppl 7*, 33-49.

- Velasco-Miguel, S., Richardson, J. A., Gerlach, Valerie L, Lai, W. C., Gao, T., Russell, L. D., et al. (2003). Constitutive and regulated expression of the mouse Dinb (Polkappa) gene encoding DNA polymerase kappa. *DNA Repair*, 2(1), 91-106.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S. R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P., et al. (1999). The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular Cell*, 4(2), 281-6.
- Wang, X. I. N., Peterson, C. A., Zheng, H., Nairn, R. S., Legerski, R. J., & Li, L. E. I. (2001). Involvement of Nucleotide Excision Repair in a Recombination- Independent and Error-Prone Pathway of DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 713-720.
- Washington, M. T., Johnson, Robert E, Prakash, Louise, & Prakash, Satya. (2002). Human DINB1-encoded DNA polymerase kappa is a promiscuous extender of mispaired primer termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 1910-4.
- Wofle, W. T., Washington, M. T., Prakash, Louise, & Prakash, Satya. (2003). Human DNA polymerase kappa uses template – primer misalignment as a novel means for extending mispaired termini and for generating single-base deletions. *Genes & Development*, 17(17), 2191-9.
- Wyman, Claire, Ristic, D., & Kanaar, Roland. (2004). Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA repair*, 3(8-9), 827-33.
- Yokoyama, H., Sarai, N., Kagawa, W., Enomoto, R., Shibata, T., Kurumizaka, H., et al. (2004). Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex. *Nucleic Acids Research*, 32(8), 2556-65.
- Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Wang, M., Rechkoblit, O., Taylor, J. S., et al. (2000). Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa in vitro. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4138-46.
- Zhou, B. L., Pata, J. D., & Steitz, T. A. (2001). Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Molecular Cell*, 8(2), 427-37.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., et al. (2009). A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-4.