

**Bruno Luiz Fonseca Schamber Reis**

**DNA polimerase beta:**  
uma proteína envolvida na  
replicação e reparo  
do DNA mitocondrial em  
*Trypanosoma cruzi*

**Orientação: Carlos Renato Machado**

**Co-orientação: Santuza Maria Ribeiro Teixeira**

**Março de 2010**

**Bruno Luiz Fonseca Schamber Reis**

**DNA polimerase beta:**  
uma proteína envolvida na  
replicação e reparo  
do DNA mitocondrial em  
*Trypanosoma cruzi*

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

**Orientação: Carlos Renato Machado**

**Co-orientação: Santuza Maria Ribeiro Teixeira**

**Março de 2010**



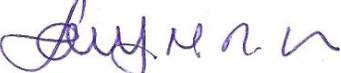
**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNO LUIZ FONSECA SCHAMBER REIS.** Aos dezenove dias do mês de março de 2010 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “DNA polimerase beta: uma enzima envolvida na replicação e reparo do DNA mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Carlos Frederico Martins Menck da Universidade de São Paulo, aprovado; Dr. Júlio Scharfstein da Universidade Federal do Rio de Janeiro, aprovado; Dra. Luciana de Oliveira Andrade da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Carlos Renato Machado, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de março de 2010.

  
Dr. Carlos Frederico Martins Menck – USP

  
Dr. Júlio Scharfstein – IBCCF – UFRJ

  
Dra. Luciana de Oliveira Andrade – UFMG

  
Dr. Dawidson Assis Gomes – UFMG

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

  
Dr. Carlos Renato Machado – orientador – UFMG

  
Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão  
Coordenador “pro tempore” do Curso  
de Pós Graduação em  
Bioquímica - Imunologia  
ICB - UFMG

## ***Agradecimentos***

Agradecer é tão importante que vem antes de toda a tese, refletindo o caráter humano da pesquisa científica que só é possível pela vontade e coragem de inúmeras pessoas. Agradeço ao meu orientador Nem pela confiança e pelos desafios e oportunidades que colocou diante de mim durante estes quatro anos, e também por toda a paciência, disponibilidade e compreensão. Obrigado Nem! Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Santuza pela co-orientação e pela disponibilidade pessoal e profissional nas pesquisas com a polimerase beta, além de ter cedido gentilmente as instalações de seu laboratório para muitos experimentos. Também agradeço aos professores Sérgio Pena, Andréa Macedo e Glória Franco pelas críticas e sugestões ao projeto, dadas especialmente nas reuniões de laboratório, que era quando eu ficava mais nervoso. À Neuza Antunes que terá sempre minha admiração por todo seu profissionalismo e amor pelo Laboratório de Genética Bioquímica, além de ter se tornado uma grande amiga e muitas vezes confidente. Ao Prof. Carlos Rosa por ter cedido o ALF (que foi só um pouquinho teimoso...) e à Kátia Barroso pela ajuda na montagem daqueles géis gigantes. Aos professores Sérgio Schenkman (UNIFESP), Maria Cristina Motta (UFRJ) e a todos seus maravilhosos alunos pela colaboração científica impecável e pelo enorme interesse em meu projeto, refletido na receptividade calorosa que tive em seus laboratórios. Agradeço às minhas queridas amigas e colaboradoras Sheila Nardelli e Priscila Campos pela ajuda impecável, paciência e por terem bravamente me aguentado nos últimos anos com os experimentos *in situ*. A todos os componentes e ex-componentes do grupo de reparo de DNA (Carlos Gustavo, Débora, Alice, Michelle, Dani GPS, Carol, Matheus, João Pedro, Pedro, Selma, Davi, Joana, Marianna e Paula) que praticamente foram meus *salvadores* no laboratório e aos quais sou grato pela amizade, confiança e pela companhia em todos os congressos sensacionais que participamos. A todos os alunos do LGB (são mais de 30, e vêm subindo...) que mantêm a engrenagem da pesquisa em funcionamento e que me proporcionaram momentos de segurança, companheirismo, boas risadas, dúvidas, incertezas, e acima de tudo coragem para seguir em frente. À turma de Bases, em especial à Eriquinha, Léo, Luis, Paty, Naty, Taty e Andreza pelo carinho, pelas festas e por todos os *Bares e Bois* da vida. Aos amigos e professores do Departamento de Bioquímica que prontamente me ajudaram quando necessitei e que confiaram na minha capacidade. Em especial agradeço a compreensão titânica de todos meus amigos pela ausência constante, quase fantasmagórica, que a atividade muitas vezes exige, e em caráter especialíssimo a toda minha família que foi obrigada a conviver com um aspirante a doutor muitas vezes ranzinza e nervoso, mas que recebeu uma dose de amor cavalariço que foi absolutamente essencial durante toda esta caminhada. Muito obrigado e dedico esta conquista a todos que caminharam comigo nesta jornada.

# Sumário

Lista de figuras.....	V
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	VII
Resumo .....	IX
Abstract.....	X
1-Introdução .....	1
1.1- <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas.....	1
1.2 - Ultraestrutura celular de <i>T. cruzi</i> .....	4
1.3 - Características ultraestruturais do cinetoplasto .....	6
1.3.1 - Replicação do kDNA .....	7
1.4 – Mecanismos de defesa antioxidante em <i>T. cruzi</i> .....	11
1.5 – Danos causados ao DNA mitocondrial pelo estresse oxidativo .....	13
1.6 – Mecanismos de reparo de DNA.....	15
1.7 – O papel da DNA polimerase beta no reparo de DNA em eucariotos .....	20
1.8 – Estudos envolvendo polimerase beta em tripanossomatídeos .....	23
2 – Objetivos.....	31
Objetivos específicos .....	31
3 - Material e Métodos.....	32
3.1 - Bactérias e parasitos utilizados .....	32
3.1.1 - Bactérias .....	32

3.1.2 - Parasitos .....	32
3.2 - Manipulação de DNA in vitro .....	33
3.2.1 - Iniciadores e oligonucleotídeos.....	33
3.2.2 - Obtenção de DNA e amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	33
3.2.3 – Eletroforese em gel de agarose .....	35
3.2.4 – Purificação de DNA imobilizado em agarose.....	35
3.2.5 – Clonagens.....	35
3.2.6 – Transformação de bactérias eletrocompetentes .....	38
3.2.7 – PCR de colônia .....	39
3.2.8 – Minipreparação e maxipreparação de DNA plasmidiano .....	39
3.3 – Expressão e Purificação de pol $\beta$ mutante .....	40
3.3.1 - Expressão em <i>E. coli</i> da proteína recombinante.....	40
3.3.2 – Purificação da proteína.....	41
3.4 – Ensaio <i>in vitro</i> .....	41
3.4.1 - Ensaio de polimerização in vitro na presença de 8oxoG e mal pareamento .....	41
3.4.2 - Ensaio de liase .....	42
3.5 - Geração de parasitos superexpressando a polimerase $\beta$ de <i>T. cruzi</i> .....	43
3.5.1 - Transfecção de parasitos.....	43
3.5.2 - Seleção de clones transfectantes em meio sólido .....	44

3.6 – Northern Blot.....	45
3.6.1 - Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i> .....	45
3.6.2 - Transferência para membrana.....	45
3.6.3 - Marcação e purificação de sonda radioativa.....	46
3.6.4 – Hibridação.....	46
3.7 - RT-PCR semi-quantitativa.....	47
3.8 - Imunolocalização.....	47
3.9 – Microscopia eletrônica de transmissão.....	48
3.10 - Curvas de sobrevivência utilizando agentes genotóxicos.....	49
3.10.1 - Condições experimentais de estabelecimento dos tratamentos e contagem dos parasitos.....	49
3.10.2 - Curva de sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio e metoxiamina.....	50
3.10.3 - Curva de sobrevivência na presença de MMS.....	50
3.10.4 - Curva de sobrevivência na presença de AZT.....	51
3.10.5 - Curva de sobrevivência na presença de benzonidazol.....	51
3.11 - Quantificação de 8oxoG no cinetoplasto.....	51
4 - Resultados.....	53
4.1 - Ensaio de extensão de primer para pol $\beta$ mutante F395Y na presença de 8oxoG e mal-pareamento.....	53
4.2 - Ensaio de atividade de liase para pol $\beta$ e pol $\beta$ PAK.....	57

4.3 - Geração de <i>T. cruzi</i> superexpressando a pol $\beta$ .....	60
4.4 - Curva de sobrevivência na presença de AZT .....	66
4.5 - Localização celular da pol $\beta$ de <i>T. cruzi</i> em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas.....	68
4.6 – Curva de sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio .....	72
4.7 - Curva de sobrevivência na presença de metoxiamina e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	72
4.8 - Ensaio de reparação de 8oxoG no cinetoplasto de <i>T. cruzi</i> superexpressando a polimerase beta .....	77
4.9 - Curva de sobrevivência de células em fase estacionária de crescimento na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	79
4.10 - Localização sub-celular da pol $\beta$ em epimastigotas tratados com peróxido de hidrogênio.....	79
4.11 - Localização da pol $\beta$ durante o ciclo celular de epimastigotas.....	81
4.12 - Localização sub-celular da pol $\beta$ em tripomastigotas tratados com peróxido de hidrogênio.....	83
4.13 - Curva de sobrevivência na presença de metilmetanosulfonato.....	85
4.14 - Curva de sobrevivência na presença de benzonidazol .....	87
5 - Discussão .....	91
Referências Bibliográficas.....	109
Anexo I.....	121
Anexo II.....	124

## Lista de figuras

<b>FIGURA 1</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	3
<b>FIGURA 2</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE VIDA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	5
<b>FIGURA 3</b> - MODELO DE REPLICAÇÃO DO kDNA BASEADO EM ESTUDOS REALIZADOS EM <i>C. FASCICULATA</i> E <i>T. BRUCEI</i> .....	8
<b>FIGURA 4</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES (BER).....	21
<b>FIGURA 5</b> - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PREDITAS DE AMINOÁCIDOS DAS DNA POLIMERASES POL $\beta$ E POL $\beta$ PAK DE <i>T. CRUZI</i> E <i>T. BRUCEI</i> E DA POL $\beta$ DE <i>R. NOVERGICUS</i> .....	26
<b>FIGURA 6</b> - ANÁLISE DAS ATIVIDADES DE POLIMERIZAÇÃO DA POL $\beta$ E POL $\beta$ PAK EM DIFERENTES CONDIÇÕES .....	28
<b>FIGURA 7</b> - SÍNTESE DE DNA EM UM OLIGONUCLEOTÍDEO CONTENDO 8OXOG .....	29
<b>FIGURA 8</b> - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA POLBETA DE <i>T. CRUZI</i> COM A MUTAÇÃO F395Y .....	55
<b>FIGURA 9</b> - ENSAIO DE EXTENSÃO DE INICIADOR IN VITRO PARA A POL $\beta$ MUT NA PRESENÇA DE 8OXOG .....	56
<b>FIGURA 10</b> - ENSAIO DE EXTENSÃO DE INICIADOR IN VITRO PARA POL $\beta$ MUT NA PRESENÇA DE MAL-PAREAMENTO DO TIPO ADENINA:CITOSINA.....	58
<b>FIGURA 11</b> - ENSAIO DE LIASE PARA A POL $\beta$ E POL $\beta$ PAK DE <i>T. CRUZI</i> .....	61
<b>FIGURA 12</b> - ENSAIO DE <i>NORTHERN BLOT</i> .....	62
<b>FIGURA 13</b> - RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA PARA O MRNA DE POL $\beta$ NOS CLONES SUPEREXPRESSORES E CONTROLE DE <i>T. CRUZI</i> .....	64
<b>FIGURA 14</b> - CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS CONTROLE E SUPEREXPRESSORA DE POL $\beta$ .....	65
<b>FIGURA 15</b> - ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO CINETOPLASTO DE <i>T. CRUZI</i> SUPEREXPRESSANDO A POL $\beta$ .....	67
<b>FIGURA 16</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ AO AZT .....	69
<b>FIGURA 17</b> - IMUNOLocalização DA POL $\beta$ EM EPIMASTIGOTAS, AMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> .....	71
<b>FIGURA 18</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	73
<b>FIGURA 19</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO À METOXIAMINA .....	75
<b>FIGURA 20</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E METOXIAMINA.....	76

<b>FIGURA 21</b> - ANÁLISE DO ACÚMULO DE 8OXOG NO CINETOPLASTO E NO NÚCLEO DE EPIMASTIGOTAS SUPEREXPRESSANDO POL $\beta$ .....	78
<b>FIGURA 22</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	80
<b>FIGURA 23</b> - IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POL $\beta$ EM EPIMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO COM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	82
<b>FIGURA 24</b> - LOCALIZAÇÃO DA POL $\beta$ DURANTE DIFERENTES ESTÁGIOS DO CICLO CELULAR DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ....	84
<b>FIGURA 25</b> - IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POL $\beta$ EM TRIPOMASTIGOTAS EXTRACELULARES APÓS TRATAMENTO COM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	86
<b>FIGURA 26</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO À METILMETANOSULFONATO .....	89
<b>FIGURA 27</b> - SENSIBILIDADE DAS CULTURAS DE PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSORES DE POL $\beta$ EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO AO BENZONIDAZOL .....	90

## ***Lista de Siglas e Abreviaturas***

1meA	1-metiladenina
3meC	3-metilcitosina
8oxoG	7,8-diidro-8-oxoguanina
AP	sítioapurínico/apirimidínico
APE	AP endonuclease
AZT	azido desoxitimidina
BER	<i>base excision repair</i> (reparo por excisão de bases)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DO	densidade óptica
dRP	desoxirribose fosfato
DSB	<i>double-strand break</i> (quebra em fita dupla)
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
gRNA	RNA guia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HR	<i>homologous recombination</i> (recombinação homóloga)
IPTG	isopropiltiogalactosidade
kDa	quilodáltons
kDNA	<i>kinetoplast</i> (cinetoplasto)
KFZ	<i>kinetoflagelar zone</i> (zona cinetoflagelar)
LIT	<i>liver infusion tryptose</i>
LP-BER	<i>long patch-BER</i> (via longa do BER)
MBP	<i>maltose binding protein</i> (proteína ligadora de maltose)
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanina-DNA metiltransferase
MMR	<i>mismatch repair</i> (reparo de mal-pareamentos)
MMS	metilmetanosulfonato
MX	metoxiamina
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NER	<i>nucleotide excision repair</i> (reparo por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (união de extremidades não homólogas)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
polβ	DNA polimerase beta
polβPAK	DNA polimerase beta PAK
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS	sódio dodecil sulfato
SOD	superóxido dismutase
SP-BER	<i>short patch-BER</i> (via curta do BER)
SSB	<i>single-strand break</i> (quebra em fita simples)

T(SH) <sub>2</sub>	ditiol tripanotiona [bis(glutationil)espermidina]
TE	Tris-EDTA
TR	tripanotiona reductase
Trx	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina reductase
TXNPx	triparredoxinas peroxidase
UV	ultravioleta

## Resumo

Durante seu ciclo de vida, o protozoário *Trypanosoma cruzi* causador da Doença de Chagas deve lidar com a ação deletéria de espécies reativas de oxigênio (ROS) no DNA, principalmente com 7,8-diidro-8-oxoguanina (8oxoG). Caso não seja reparada, a 8oxoG pode levar a transições durante a divisão celular. Em mamíferos, a DNA polimerase beta ( $pol\beta$ ) está estritamente envolvida no reparo por excisão de bases (BER), que pode reparar danos oxidativos. Contudo, sua função ainda é pouco conhecida em *T. cruzi*. Ensaios de localização da  $pol\beta$  por imunofluorescência revelaram uma localização nos sítios antipodais do DNA mitocondrial (kDNA) das formas epimastigota e amastigota replicativas. Contudo a polimerase se mostrou dispersa na matriz mitocondrial de formas tripomastigotas não-replicativas, sugerindo sua participação na replicação do kDNA. Adicionalmente, verificamos uma localização estrita da  $pol\beta$  nos sítios antipodais do kDNA somente durante as fases G1/S e início da fase G2 de epimastigotas. Clones superexpressando a  $pol\beta$  mostraram maior resistência à  $H_2O_2$  e benzonidazol quando comparado a células controle. A resistência a  $H_2O_2$  é perdida após tratar as células com metoxiamina, que é um inibidor seletivo da via do BER. Verificamos também um nível reduzido de 8oxoG no cinetoplasto dos clones superexpressores de  $pol\beta$  em relação ao controle. Curiosamente, um possível foco de reparo de DNA envolvendo a  $pol\beta$  foi identificado nas imediações do kDNA de epimastigotas após tratamento com  $H_2O_2$ , localizado provavelmente na região cinetoflagelar. Em conjunto, os dados experimentais obtidos sugerem que a  $pol\beta$  está participando de processos de replicação e reparo de danos oxidativos no DNA mitocondrial de *T. cruzi*.

## ***Abstract***

During its life cycle, the causative agent of Chagas Disease *Trypanosoma cruzi* must deal with the deleterious action of reactive oxygen species (ROS) on DNA, mainly 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxoG). If unrepaired, 8oxoG can lead to transversions during cell division. In mammals, DNA polymerase beta ( $\text{pol}\beta$ ) is strictly involved in base excision repair (BER) of oxidative damage. However its biological function in *T. cruzi* is still uncertain. Immunofluorescent analysis revealed that  $\text{pol}\beta$  is localized on antipodal sites of kinetoplast (kDNA) of replicative epimastigotes and amastigotes forms. Nevertheless, the polymerase was seen dispersed in non-replicative trypomastigote forms inside the mitochondrion matrix, suggesting its participation in kDNA replication. In addition, we verify that  $\text{pol}\beta$  is strictly localized in kDNA antipodal sites between G1/S and early G2 phase of replicative epimastigotes. Clones overexpressing  $\text{pol}\beta$  presented increased survival after treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and benznidazol compared to control. However this resistance is lost after treating cells with methoxiamine, a potent BER inhibitor. We also verified that the overexpressing clones showed a reduced level of detected 8oxoG in kinetoplast when compared to control. Curiously, a possible DNA repair focus of  $\text{pol}\beta$  was identified in the vicinity of kinetoplast of epimastigotes wild type CL Brener cells after  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment. We believe that this focus is a DNA repair focus probably mounted in kinetoflagellar zone after oxidative damage to kDNA. Taken together the experimental data obtained suggest participation of  $\text{pol}\beta$  in DNA replication and repair of oxidative damages in kDNA of *T. cruzi*.

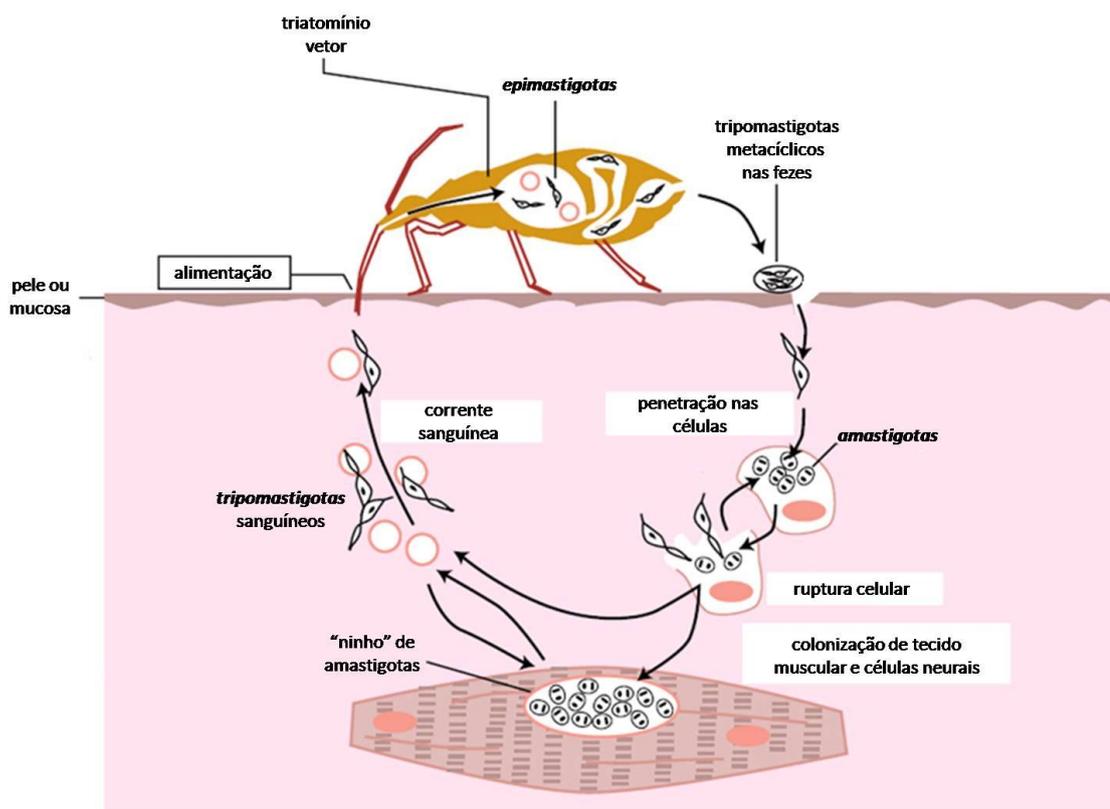
# ***1-Introdução***

## **1.1- *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o causador da Doença de Chagas, uma zoonose assim designada por ter sido primeiramente descrita em 1909 no Brasil por Carlos Chagas que elucidou o ciclo completo da doença, identificou os insetos transmissores do parasito e os mamíferos que funcionam como reservatórios da doença (Chagas 1909). Também conhecida como tripanossomíase americana, ocorre em 18 países sendo que a estimativa de indivíduos infectados oscila por volta de 10-18 milhões de casos da doença (PAHO 2010). Levantamentos indicam a ocorrência de 21.000 mortes e 300.000 novas infecções anualmente, e aproximadamente 120 milhões de pessoas (cerca de 25% da população da América do Sul) estão sob risco de contrair a doença (PAHO 2010). O parasito *T. cruzi* pertence à Ordem Kinetoplastida, inserida na Família Trypanosomatidae, da qual fazem parte parasitos de importância médica e veterinária como *Trypanosoma brucei*, causador da Doença do Sono na África, e diferentes espécies do gênero *Leishmania* que são agentes etiológicos das leishmanioses reconhecidas ao redor do mundo (Teixeira et al. 2006). Também faz parte desta ordem o parasito monoxênico *Crithidia fasciculata*, o qual, apesar de não ser patogênico ao homem, é bastante utilizado como modelo de estudos de vários aspectos da biologia dos tripanossomatídeos.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é caracterizado por transmissão vetorial e sucessão de formas adaptadas a diferentes microambientes (Brenner 1973). Ocorre alternância entre formas adaptadas para infecção e formas especializadas para transmissão

(Figura 1). Formas denominadas *epimastigotas* extracelulares se multiplicam na porção média do intestino do triatomíneo vetor, mas se diferenciam em *tripomastigotas* metacíclicos não-replicativos no intestino posterior, de onde são excretados juntamente com as fezes o que caracteriza o modo convencional de transmissão do *T. cruzi* para os humanos. Tripomastigotas infectantes podem atravessar mucosas e membranas do hospedeiro mamífero e invadir diversos tipos celulares por endocitose, formando um vacúolo parasitóforo. Dentro das células ocorre diferenciação para a forma *amastigota*, que é capaz de romper o vacúolo parasitóforo e se multiplicar no citoplasma da célula infectada. Através de estímulos não conhecidos, ocorre diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que rompem a membrana celular e atingem o espaço intercelular. Esta forma do parasito é capaz de infectar outras células ou ser re-transmitida para insetos vetores no momento do repasto sangüíneo, reiniciando-se assim o ciclo de vida (Souza 2008). Até o momento, as estratégias de combate à doença estão limitadas à prevenção (eliminação do inseto vetor do ciclo doméstico e controle da transmissão por transfusão sangüínea) e tratamento medicamentoso de casos agudos e transmissão congênita. Também pode ocorrer transmissão por vias alternativas, como transfusão de sangue e ingestão de alimentos contaminados. A doença se caracteriza por uma curta fase assintomática seguida de uma fase crônica composta por manifestações clínicas variáveis envolvendo sintomas cardíacos, digestivos ou neurológicos (Lages-Silva et al. 2006). Ainda não existe vacina contra a doença, embora pesquisas apontem um elevado progresso nesta área (Sanchez-Burgos et al. 2007).



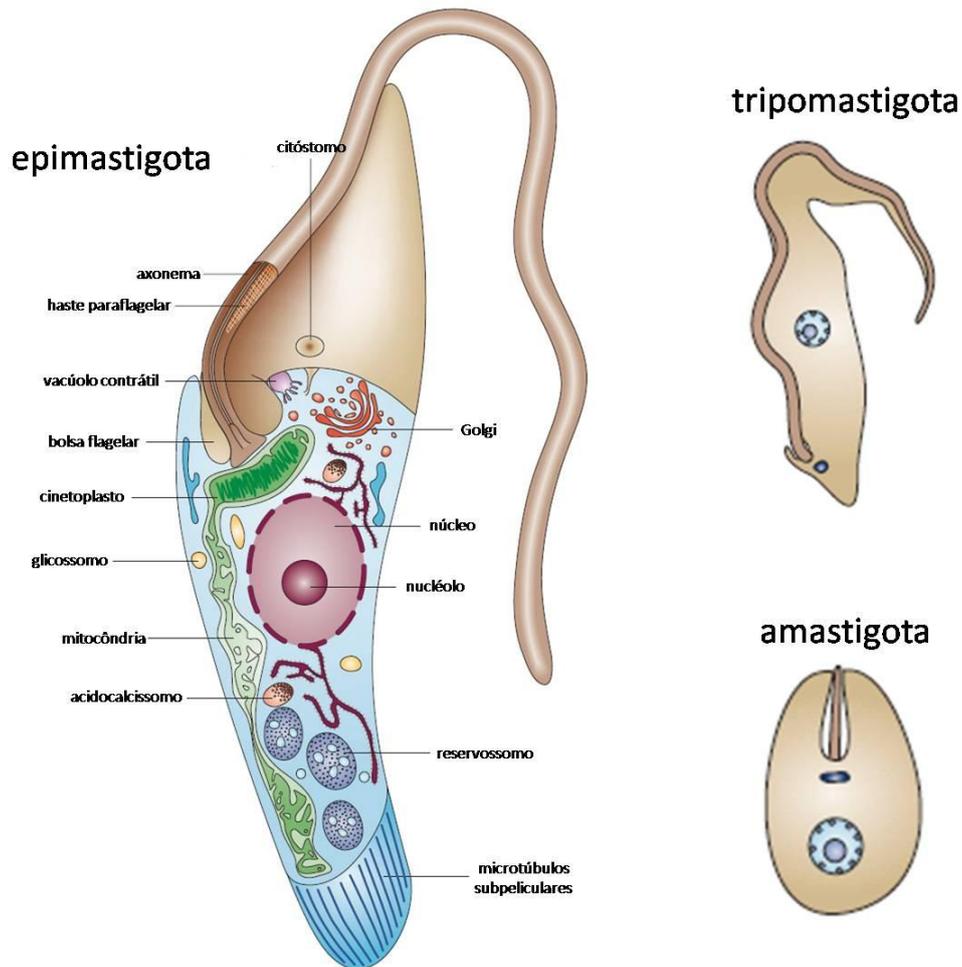
**Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***

Durante a alimentação, hemípteros da família *Reduviidae* defecam na pele de seus hospedeiros e tripomastigotas metacíclicos presentes em suas fezes caem na circulação sanguínea quando o hospedeiro se coça e também por mucosas. As formas tripomastigotas penetram nas células e se transformam em amastigotas que podem se replicar no interior das células infectadas. Alguns amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que rompem a membrana celular e podem infectar outras células ou cair novamente na corrente sanguínea para acesso a outros tecidos, geralmente tecido muscular ou nervoso. Novos hemípteros são infectados após se alimentarem de sangue contendo tripomastigotas. No intestino médio do inseto ocorre metaciclogênese de tripomastigotas para epimastigotas, com posterior diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos infectivos no reto, fechando o ciclo. Figura adaptada de (Macedo et al. 2004).

Ocorre extensa diversidade genética intraespecífica representada na estrutura populacional clonal de *T. cruzi* que é composta por uma variedade expressiva de linhagens que conferem características clínicas igualmente variáveis dependentes tanto do hospedeiro quanto da cepa infectante (Macedo et al. 2004). Estas linhagens vêm sendo distribuídas em grupos de acordo com classificação baseada em marcadores biológicos e moleculares como isoenzimas, genotipagem do gene da subunidade 24S $\alpha$  do RNA ribossômico e polimorfismos de sequência de mini-éxons e microssatélites (de Freitas et al. 2006), sendo que recentemente foi proposta uma classificação consensual onde as cepas de *T. cruzi* puderam ser classificadas em seis grupos principais (Zingales et al. 2009). O estabelecimento de uma nomenclatura unificada para os grupos de *T. cruzi* se justifica considerando que cepas de um mesmo grupo tendem a exibir propriedades biomédicas afins, como virulência e resistência a drogas e distribuição geográfica (Tibayrenc 1998).

## 1.2 - Ultraestrutura celular de *T. cruzi*

Devido à facilidade de se estabelecer culturas axênicas *in vitro*, a grande maioria dos estudos realizados com o *T. cruzi* se baseou na forma epimastigota a qual foi utilizada como células-modelo em investigações ultraestruturais e bioquímicas (de Souza 2009) (Figura 2). Algumas peculiaridades morfológicas existentes nos membros da ordem kinetoplastida podem ser destacadas, como a presença de único *flagelo* que emerge de uma região denominada *bolsa flagelar* e a presença de uma organela denominada glicossomo. Uma mitocôndria única e altamente ramificada contém um genoma organizado em uma estrutura eletrondensa denominada *kinetoplasto* (do inglês *kinetoplast*, kDNA) que está localizada na matriz mitocondrial e orientada



**Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

Desenhos esquemáticos representando as três formas celulares principais encontradas no ciclo de vida do parasito, que são definidas pela forma da célula, presença e aderência do flagelo e posição do kDNA e do núcleo. (A) A forma epimastigota é encontrada no intestino médio do barbeiro e possui cinetoplasto anterior ao núcleo (pois considera-se que o flagelo se posiciona à *frente* do parasito). As estruturas e organelas principais estão indicadas. (B) Formas tripomastigotas não-replicativas possuem cinetoplasto e inserção do flagelo em região posterior ao núcleo. (C) A forma amastigota replicativa encontrada no interior das células infectadas no hospedeiro vertebrado é arredondada e possui flagelo vestigial. Figura adaptada de (Docampo et al. 2005).

de modo perpendicular ao eixo do flagelo (de Souza 2009). O kDNA está sempre próximo do corpúsculo basal, conectado a ele através de estruturas filamentosas. Em decorrência desta conexão, a posição do kDNA determina o posicionamento dos corpúsculos basais e conseqüentemente a origem do flagelo. O *núcleo* é típico e composto por uma membrana porosa que permanece intacta durante a divisão celular, envolvendo uma cromatina condensada dispersa pelo nucleoplasma. O kDNA é considerado uma estrutura típica da Ordem Kinetoplastida e seu posicionamento celular em relação ao núcleo é variável entre as formas epimastigota, amastigota e tripomastigota (Brener 1973). Epimastigotas, flagelados, possuem corpo celular alongado e kDNA posicionado anteriormente ao núcleo, enquanto que as formas tripomastigotas são ainda mais alongados e apresentam kDNA localizado posteriormente ao núcleo, além de apresentar um flagelo que se insere ainda mais posteriormente e percorre todo o corpo celular (Figura 2). Em contrapartida, as formas amastigotas podem mostrar forma arredondada ou ovalada e presença de um flagelo vestigial (de Souza 2009).

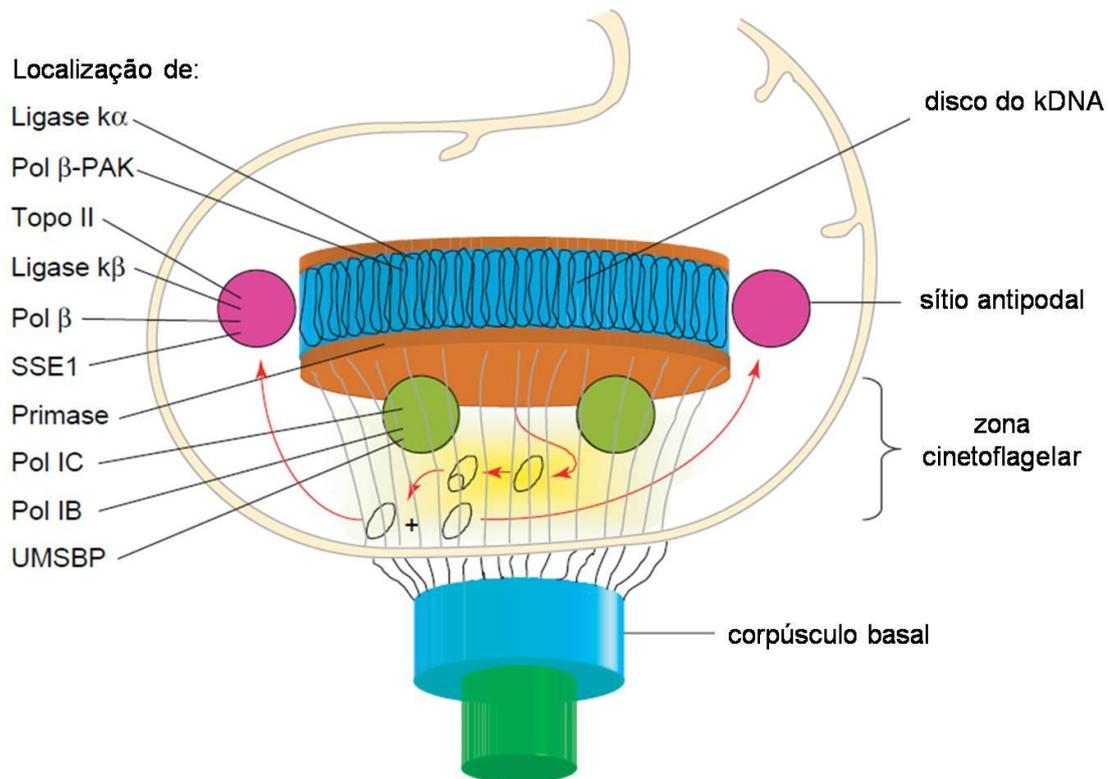
### **1.3 - Características ultraestruturais do cinetoplasto**

Aproximadamente 30% do material genético de *T. cruzi* está contido no cinetoplasto (kDNA), uma estrutura com forma, organização e localização celular que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito (Souza 2008). A organização molecular do cinetoplasto consiste de uma rede concatenada de algumas dúzias de *maxicírculos* (20-40kb) que são funcionalmente e estruturalmente análogos ao DNA mitocondrial de mamíferos e carregam sequências para rRNAs e proteínas hidrofóbicas envolvidas principalmente na cadeia respiratória mitocondrial (de Souza

2009). O sequenciamento completo dos maxicírculos das cepas CL Brener e Esmeraldo de *T. cruzi* mostrou conservação de sintenia quando comparado ao maxicírculo de *T. brucei*, embora polimorfismos de base única nas regiões codificantes dos dois genomas tenham sido raros, dando lugar a uma maior variabilidade para polimorfismos do tipo inserções/deleções (Westenberger et al. 2006). Adicionalmente, verificou-se presença de sequências repetitivas cepa-específicas em regiões não-codificantes e heterogeneidade na população de maxicírculos para cada uma das cepas analisadas, com exceção de uma região pouco variável que acredita-se ser a origem de replicação (Westenberger et al. 2006). Ao kDNA também estão associados milhares de *minicírculos* (0,25-2,5Kb) que carregam sequências para *RNAs guias* (gRNAs). Estes gRNAs modificam os transcritos dos maxicírculos inserindo ou deletando sequências de uridilato através de um processo conhecido com *edição de RNA* (El-Sayed et al. 2005). Investigações moleculares realizadas em *Trypanosoma equiperdum* demonstram que, mesmo intimamente interconectadas, existe uma independência na organização da rede de maxicírculos em relação à de minicírculos, já que ocorre liberação seletiva da rede de minicírculos após digestão enzimática (Shapiro 1993). Todo o material genético do cinetoplasto está compactado e associado a proteínas de caráter básico semelhantes a histonas H1 (De Souza and Cavalcanti 2008).

### **1.3.1 - Replicação do kDNA**

A replicação dos minicírculos ocorre próxima a fase S nuclear e consiste na duplicação do material antes de sua distribuição para as células filhas na mitose. Ocorre montagem de um complexo composto por múltiplas proteínas participantes do processo de replicação (Figura 3), e os minicírculos são liberados da rede pela topoisomerase II e replicados individualmente na *zona cinetoflagelar* (KFZ, do inglês



**Figura 3 - Modelo de replicação do kDNA baseado em estudos realizados em *C. fasciculata* e *T. brucei***

O disco do kDNA é cercado por proteínas replicativas. Minicírculos são liberados da rede para a zona cinetoflagelar, de onde iniciam replicação em forma de estruturas  $\theta$  onde provavelmente ocorre envolvimento de UMSBP, primase, polimerases IB e IC. Os minicírculos filhotes migram para os sítios antipodais do cinetoplasto ainda ocorrem outros estágios da replicação, como remoção do primer por SSE1, preenchimento do *gap* pela pol $\beta$  e selagem do nick pela ligase  $k\beta$ . Os minicírculos, ainda com pelo menos um nick ou *gap*, são ligados à rede pela ação da Topoisomerase II, sendo que a pol $\beta$ PAK provavelmente está envolvida no reparo de *gaps* antes do término da replicação. Figura adaptada de (Liu et al. 2005).

*kinetoflagelar zone*) (Liu et al. 2005). O início da replicação unidirecional dos minicírculos envolve reconhecimento de uma sequência conservada universal (*universal minicircle sequence, UMS*) pela interação de diversas proteínas incluindo a proteína ligadora de UMS (*UMS binding protein, UMSBP*), uma DNA primase e duas polimerases pertencentes à família A, POLIB e POLIC (Bruhn et al. Aceito para publicação). Após a replicação, os *gaps* que surgem nos minicírculos em decorrência da extensão e junção de fragmentos de Okasaki são processados por uma endonuclease estrutural específica (SSE1) e as extremidades ligadas por uma DNA ligase (Hines et al. 2001; Downey et al. 2005). Acredita-se que os *gaps* funcionem como uma marca para replicação única por geração, garantindo um controle do número exato de círculos a ser segregado para as células filhas (Liu et al. 2005). O kDNA também apresenta motilidade durante o processo de replicação. Enquanto que em *C. fasciculata* há rotação do disco em relação aos sítios antipodais com posterior distribuição do material replicado para uma região em forma de anel posicionado na periferia do disco, o processo em *T. brucei* é caracterizado pelo acúmulo da progênie de minicírculos nas extremidades opostas do kDNA, sugerindo oscilação do kDNA ao invés de rotação (Liu and Englund 2007). Pouco se sabe sobre a replicação dos maxicírculos. Contudo, sabe-se que ocorre duplicação unidirecional do material genético com formação de estruturas  $\theta$  como no caso dos minicírculos, mas sem liberação dos maxicírculos da rede a qual pertencem (Carpenter and Englund 1995). Em *T. brucei*, o controle da replicação e do número de maxicírculos é feito principalmente pela helicase PIF2, uma das seis helicases semelhantes à PIF presentes na mitocôndria do parasito (Liu et al. 2009).

O processo de replicação do kDNA conta com um passo envolvendo selagem dos *gaps* gerados após duplicação do material genético dos minicírculos pela maquinaria de replicação e reparo. Foi proposto um modelo envolvendo tanto a DNA polimerase beta ( $pol\beta$ ) quanto a DNA polimerase beta-PAK ( $pol\beta$ PAK) no processo de duplicação do kDNA em tripanosomatídeos (Saxowsky et al. 2003). Acredita-se que a  $pol\beta$  preencha a maioria dos *gaps* e que esta atividade esteja concentrada em *foci* discretos posicionados nos chamados *sítios antipodais* do cinetoplasto. Após a migração destes minicírculos para a zona central do cinetoplasto a  $pol\beta$ PAK se encarregaria de reparar *gaps* remanescentes (Torri and Englund 1995) que teriam suas extremidades ligadas por uma DNA ligase (Downey et al. 2005).

Considerando que estes dados provêm de estudos que envolveram *Chritidia fasciculata* e *Trypanosoma brucei* como organismos modelo, pouca informação foi adquirida nesta área através de abordagens semelhantes em *T. cruzi*. A topologia única da rede de círculos do kDNA induz a uma reflexão profunda acerca das vantagens e consequências funcionais de tal organização na sobrevivência do parasito durante seu ciclo de vida e infecção, e quais seriam os mecanismos de replicação e reparo envolvidos neste processo. O fato da mitocôndria de *T. cruzi* desempenhar papel ímpar em sua biologia e sobrevivência justifica a realização de caracterizações e investigações bioquímicas envolvendo os componentes das vias de reparo de DNA que atuam nessa organela. A prevenção contra o aparecimento de lesões de natureza oxidativa no DNA é de extrema importância durante a infecção por *T. cruzi*, já que fontes oxidativas endógenas e exógenas devem levar a um impedimento da replicação do DNA mitocondrial (Wei and Lee 2002).

#### 1.4 – Mecanismos de defesa antioxidante em *T. cruzi*

Parasitas como *Leishmania infantum* e *T. cruzi* são aeróbios e dependem de oxigênio molecular como aceptor de elétrons em processos oxidativos para obtenção de energia. Normalmente o oxigênio molecular é reduzido a duas moléculas de água por dois elétrons, mas pode ocorrer uma redução parcial anômala pela adição de 1, 2 ou 3 elétrons, o que leva a formação de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila, respectivamente (Turrens 2004). Embora o radical superóxido não seja muito reativo em comparação com outras moléculas, ele é precursor de peroxinitrito através de reação com óxido nítrico. Além disso, os radicais superóxido são precursores de  $H_2O_2$ , e na presença de metais de transição estas duas espécies são responsáveis pela formação de *radicais hidroxila* (Kohen and Nyska 2002). Os radicais hidroxila são oxidantes fortes de ação inespecífica que danificam praticamente todo tipo de estrutura biológica, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. O chamado *estresse oxidativo* é caracterizado por um desequilíbrio no metabolismo oxidativo celular com manutenção de um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula, considerado uma ameaça para qualquer forma de vida (Kohen and Nyska 2002).

Em geral, duas enzimas denominadas *superóxido dismutase* (SOD) e *catalase* estão na “linha de frente” da defesa antioxidante em metazoários (Huang and Manton 2004). A enzima SOD, capaz de converter ânions superóxido em  $H_2O_2$ , existe tanto na forma associada a cobre (CuSOD) e zinco (ZnSOD) no citoplasma e a manganês na mitocôndria (MnSOD). Já a catalase converte o  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água. Contudo, essa via de oxidação reversa não é completamente efetiva, o que induz a

geração de danos cumulativos na célula, o que em última análise é considerado causa de envelhecimento celular que leva a diminuição das funções metabólicas até culminar em morte.

Espécies parasitas como *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania ssp.*, além de lidarem com a eliminação de metabólitos tóxicos endógenos, enfrentam uma forte carga oxidativa empregada como defesa pelo sistema imune de seus hospedeiros (Muller et al. 2003). Por exemplo, a atividade inata antimicrobiana realizada por neutrófilos e outros fagócitos é baseada na produção de superóxidos reativos pela ativação de oxidases do tipo NADPH. Contudo, estes organismos possuem sistemas redutores e de desintoxicação que têm papel primordial na sobrevivência destes parasitos. As sequências dos genomas destes três tripanossomatídeos revelaram a ausência de genes para catalase, glutatona redutase e tiorredoxinas redutase que em conjunto mantêm a homeostase redução-oxorredução (redox) clássica (El-Sayed et al. 2005). Contudo, esses organismos possuem enzimas que compõem um sistema único semelhante ao da glutatona e que se baseia num metabolismo redox sustentado por *ditiol tripanotiona* [bis(glutationil)espermidina], ou T(SH)<sub>2</sub>, associado a *tripanotiona redutase* (TR) que mantém T(SH)<sub>2</sub> na forma reduzida (Krauth-Siegel and Comini 2008). Além disso, a proteína *tiorredoxina* (Trx) funciona como um mensageiro redox celular e é mantida em estado reduzido pela flavoenzima *tiorredoxina redutase* (TrxR), reforçando a importância do sistema envolvendo tripanotiona nestes organismos. Além disso, ocorre sanitização de hidroperóxidos por triparredoxinas peroxidases (TXNPx) (Hofmann et al. 2002). Em *T. cruzi*, a transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos infectivos, por exemplo, é acompanhada da expressão e

tradução de algumas destas enzimas. Contudo, embora haja uma abundância de enzimas antioxidantes, os tripanossomatídeos são extremamente vulneráveis ao estresse oxidativo, provavelmente pela pronunciada deficiência de suas peroxidases quando comparadas com as enzimas de mamíferos (Flohe et al. 2002). De fato, todas as formas encontradas no ciclo de *T. cruzi* são capazes de metabolizar  $H_2O_2$  apenas em baixas doses (Carnieri et al. 1993).

### 1.5 – Danos causados ao DNA mitocondrial pelo estresse oxidativo

A cadeia respiratória mitocondrial constitui uma das fontes primárias de ROS em mamíferos. Nela ocorre transporte de elétrons provindos da oxidação do NADH através de três complexos (I, III e IV) finalizando com redução do oxigênio (Turrens 2004). Adicionalmente pode ocorrer entrada de elétrons na cadeia pelo complexo II (succinato desidrogenase). Todavia, o sistema não é totalmente eficiente e ocorre *vazamento* de elétrons da cadeia transportadora de elétrons para a matriz mitocondrial, levando a reações aleatórias de oxidação com subsequente formação de ROS (Huang and Manton 2004), sendo que os complexos I e III são reconhecidos como locais principais de escape de elétrons. Considerando que a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é responsável pela grande maioria da produção de ROS intracelular em mamíferos, espera-se que a própria mitocôndria seja o principal alvo para danos oxidativos. Esta associação também poderia ser estendida para outros organismos que também possuem esta organela, como os tripanossomatídeos. A *teoria do envelhecimento mitocondrial* propõe que, com o passar do tempo, um acúmulo de danos oxidativos à mitocôndria causaria um envelhecimento da organela e liberação gradativa de mais ROS para os compartimentos mitocondrial, citossólico e nuclear (Van

Remmen and Richardson 2001), levando a uma redução na produção de energia e a um comprometimento celular geral. Em mamíferos, o DNA mitocondrial é altamente susceptível a oxidação, pois está em íntimo contato com a membrana mitocondrial interna (onde as espécies reativas são geradas) e não é compactado por histonas como no caso do DNA nuclear, o que protegeria o material genético do contato com as ROS (Van Remmen and Richardson 2001). Em mamíferos, o dano oxidativo ao DNA mitocondrial é mais amplo, rápido e persistente comparado ao DNA nuclear (Yakes and Van Houten 1997) e ocorre numa frequência aproximadamente 20 vezes maior do que no DNA nuclear (Richter et al. 1988).

O estresse oxidativo ao qual o DNA mitocondrial está submetido causa primariamente danos em bases nitrogenadas e no arcabouço açúcar-fosfato; adicionalmente ocorrem quebras de fita simples (do inglês *single strand breaks*, SSB) e de fita dupla (do inglês *double strand breaks*, DSB) (Slupphaug et al. 2003). As DSBs são geralmente letais se não reparadas por um mecanismo específico de reparo de DNA, enquanto que bases danificadas podem ser mutagênicas, citotóxicas ou ambas. Mais de 20 tipos diferentes de lesões oxidativas em bases nitrogenadas foram identificadas, sendo consideradas como de maior ocorrência a 7,8-diidro-8-oxoguanina (comumente chamada *8oxoG*), timina glicol, formamidopirimidinas e sítios apurínicos/apirimidínicos (*sítios AP*). De todas estas, a *8oxoG* está presente em grande quantidade e possui alto potencial pré-mutagênico. A formação de *8oxoG* envolve um primeiro passo de reação de um radical hidroxila altamente reativo com o carbono na posição 8 de uma guanina com formação de um aduto C8-OH. Em seguida ocorre perda de um elétron e um próton, gerando a *8oxoG*. O aduto C8-OH também poderia ser reduzido pela adição de

um elétron e um próton, o que geraria 7-hidro-8-hidroxi-guanina que seria convertida a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FaPy), o segundo maior produto de oxidação da guanina. A forma tautomérica predominante da 8oxoG possui um grupamento carbonila no carbono 8 e tem o nitrogênio 7 protonado, o que favorece uma conformação *syn* que facilita um mal-pareamento do tipo Hoogsteen com uma adenina, enquanto que a preferência é *anti* quando pareado corretamente com uma citosina (Krahn et al. 2003). A quantidade de DNA oxidado no genoma é massiva, sendo que as taxas estimadas da relação 8oxoG/guanina, medida em diversos tipos celulares, variaram de 0,5 até  $4,24 \times 10^{-6}$  (Gedik and Collins 2005). Também foi possível verificar que, em humanos, a proporção de mutações no mtDNA pôde ser diretamente correlacionada com a quantidade de 8oxoG detectada (Lu et al. 1999). A manutenção tanto do genoma mitocondrial e nuclear é realizada por diversas vias de reparo de DNA já bem caracterizadas em mamíferos, bactérias e leveduras, mas ainda pouco conhecidas em outros organismos unicelulares como os membros da ordem kinetoplastida.

## 1.6 – Mecanismos de reparo de DNA

Tanto o DNA nuclear quanto o mitocondrial são continuamente modificado por fatores endógenos (gerados pelo próprio metabolismo da célula) e exógenos. A funcionalidade do genoma e a transmissão da informação genética dependem de uma elevada fidelidade na replicação do DNA e na máxima recuperação da informação perdida na sequência em decorrência do dano. Para tanto, os organismos desenvolveram uma série de vias de reparação de DNA especializadas em reconhecer

diversos tipos de lesões. Segue abaixo um panorama geral de todas as vias de reparo e os tipos de lesões específicas que são reconhecidas por elas.

As células contam com um sistema de *reversão direta* de lesões alquilantes e metilantes. Um exemplo é a lesão O<sup>6</sup>-alquilguanina decorrente da transferência de grupamentos metil ou etil para guaninas. A reversão desta lesão é mediada pela enzima O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) em mamíferos, que transfere o grupamento alquil para uma cisteína presente em seu sítio ativo. Outro exemplo envolve a dioxigenase AlkB de *E. coli*, envolvida na reversão de 1-metiladenina (1meA) e 3-metilcitosina (3meC) para adenina e citosina, respectivamente (Hakem 2008).

A exposição celular à radiação ionizante leva a indução de grande número de SSBs na fita de DNA, que também podem surgir em decorrência de parada da forquilha de replicação. As DSBs também surgem diretamente pela radiação ou pela evolução de quebras simples e são consideradas letais se não forem reparadas (Neijenhuis et al. 2009). Em bactérias e leveduras, as DSBs são preferencialmente reparadas por *recombinação homóloga* (do inglês *homologous recombination*, HR), processo que tem a participação fundamental da proteína Rad51 que medeia o pareamento e a troca de filamentos entre moléculas de DNA homólogas (Conway et al. 2002). Em mamíferos, mais de 90% das DSBs são reparadas pela via de *junção de extremidades não-homólogas* (do inglês *non-homologous end-joining*, NHEJ) (Sonoda et al. 2006; Kanaar et al. 2008). Embora não haja indícios de genes homólogos para a via do NHEJ tanto em *T. brucei* quanto em *T. cruzi* (El-Sayed et al. 2005; Burton et al. 2007), estudos mostraram uma HR funcional em *T. cruzi* e envolvimento da via na resistência à radiação ionizante (Regis-da-Silva et al. 2006). Adicionalmente, a via de reparo de mal-

pareamentos (do inglês *mismatch repair*, MMR) está envolvida no reparo de pequenas inserções, deleções e bases mal-pareadas que ocorrem espontaneamente durante a replicação do DNA, sendo que uma falha neste sistema resulta em instabilidade de microssatélites (Jiricny 2006). Estudos baseados na caracterização do gene MSH2 demonstraram a existência do MMR em *T. cruzi* e *T. brucei* (Augusto-Pinto et al. 2001). Algumas evidências indicam que ocorrem variações na eficiência do MMR entre cepas pertencentes a linhagens filogenéticas distintas em *T. cruzi* (Augusto-Pinto et al. 2003; Bell et al. 2004), o que poderia estar correlacionado com variações na variabilidade genética entre os diversos grupos de parasitos (Machado et al. 2006). Além disso, o estudo do gene *msh2* em *T. cruzi* e em *T. brucei* revelou o envolvimento dessa proteína chave da via do MMR também na resposta a danos de natureza oxidativa (Machado-Silva et al. 2008).

As vias de *reparo de excisão de nucleotídeos* (do inglês *nucleotide excision repair*, NER) (Leibeling et al. 2006) e *reparo por excisão de bases* (do inglês *base excision repair*, BER) contam com um mecanismo geral comum que envolve o reconhecimento da lesão, excisão da base lesionada ou de trecho do oligonucleotídeo que a flanqueia e reconstituição do filamento utilizando a informação contida na fita não-lesionada, o que geralmente é feito por DNA polimerases dependente de molde. Enquanto o NER é responsável por reparar lesões causadas por radiação ultravioleta, mutágenos e drogas que transferem adutos para o DNA (Leibeling et al. 2006), o BER está envolvido na correção de danos causados à bases únicas no DNA, sítios abásicos e SSBs geradas pela ação de espécies reativas de oxigênio, agentes alquilantes e radiação ionizante (Wood et al. 2001).

O BER também é considerado a principal via de remoção de bases inapropriadas e reparo de diversos tipos de lesões de origem endógena ou induzidas pelas ROS, especialmente danos oxidativos como 8oxoG (Pascucci et al. 2002; Izumi et al. 2003; Hegde et al. 2008). O processo do BER pode ser reconstituído *in vitro* (Dianov and Lindahl 1994; Kubota et al. 1996; Nicholl et al. 1997; Visnes et al. 2008) e inicia-se com o reconhecimento e excisão da base lesionada por glicosilases que podem ser *monofuncionais* ou *bifuncionais* (Figura 4). Glicosilases monofuncionais excisam a base danificada do DNA, deixando um sítio AP (apurínico/apirimidínico) que é reconhecido por uma AP endonuclease (APE) que cliva a ligação N-glicosídica presente no arcabouço ribose-fosfato a 5' do sítio abásico levando a formação de um grupamento 5'-desoxirribose-fosfato (dRP). Glicosilases bifuncionais possuem uma atividade de liase associada que cliva o arcabouço de DNA a 3' do sítio AP seguida da remoção da base. Neste caso a atividade de diesterase 3' da APE é necessária na excisão do grupamento 3'-dRP antes da síntese de DNA. Glicosilases monofuncionais humanas como UNG, TDG e SMUG1 estão envolvidas na remoção de uracila, timina e uracilas modificadas por hidroxilação e metilação, respectivamente (Zharkov and Grollman 2005). Já as glicosilases Tag e AlkA, também monofuncionais, possuem especificidade para bases purínicas alquiladas, enquanto que MutY (MYH em humanos) remove adenina pareada a guanina e 8oxoG (Slupska et al. 1999). Glicosilases bifuncionais bacterianas como Nth e Nei são específicas para pirimidinas modificadas por ROS e possuem contrapartes identificadas em humanos com a mesma atividade (Zharkov and Grollman 2005). Já a glicosilase bifuncional Fpg bacteriana (OGG1 em humanos) excisa 8oxoG do DNA (Smart et al. 2006). Todas as glicosilases iniciam o reparo de todos os substratos do BER (com exceção de sítios AP) (Zharkov and Grollman 2005). O projeto

genoma de *T. cruzi* permitiu a identificação de genes ortólogos para as glicosilases OGG1, MutY e UDG, que a princípio estariam desempenhando as mesmas funções das glicosilases humanas. Contudo já se sabe que a UDG é a única glicosilase de reparo de uracilas em *T. cruzi* e que atua exclusivamente no BER de via curta nestes organismos (Pena-Diaz et al. 2004). Ainda não se sabe se estas glicosilases atuam especificamente num BER nuclear ou mitocondrial já que a localização celular das mesmas ainda não foi determinada.

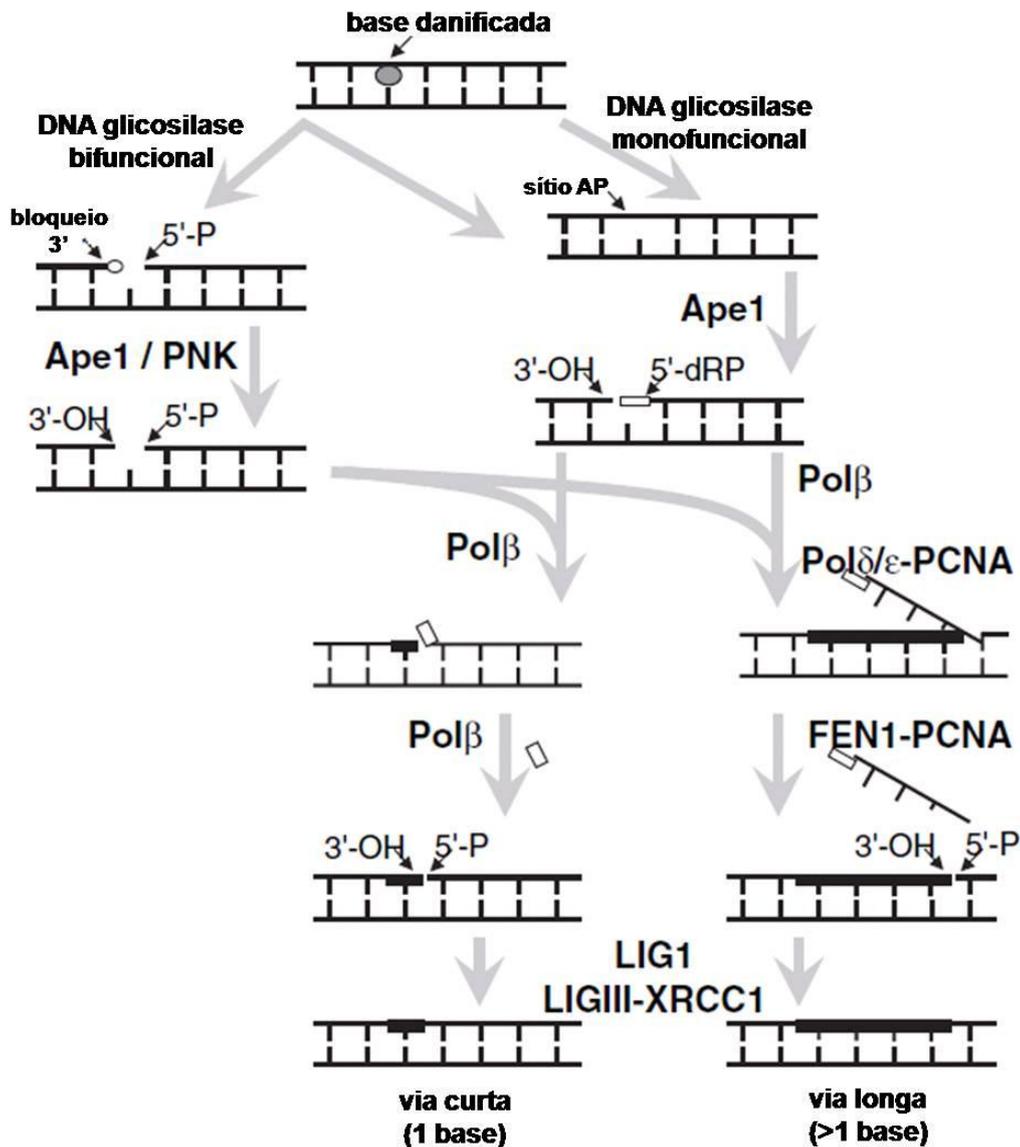
Após remoção da base danificada por glicosilases e da ação da AP endonuclease, a DNA polimerase beta ( $pol\beta$ ), que é uma polimerase dependente de molde e que pertence a família X das DNA polimerases (Hubscher et al. 2002), executa um papel dual que envolve a remoção do grupamento dRP caracterizando sua ação de *liase* e inserção de uma base através de seu subdomínio de nucleotidil transferase que possui conformação conservada e envolve coordenação de dois íons metálicos em seu sítio ativo (Steitz 1998). Considera-se que a  $pol\beta$  é a principal efetora da etapa de liase no BER (Sobol et al. 2000; Allinson et al. 2001). A etapa final do BER envolve a formação de uma ligação fosfodiéster entre a hidroxila 3' da fração ose da base correta que foi inserida e a hidroxila 5' da ose a jusante por uma DNA ligase. A via de reparo acima descrita envolvendo reparo de uma única base é conhecida como *via de reparo curta* (do inglês *short-patch BER*, SP-BER). Embora ainda não se conheça a causa, algumas vezes ocorre atuação da *via de reparo longa* (do inglês *long-patch BER*, LP-BER) onde há síntese de DNA pela  $pol\beta$  (Asagoshi et al. 2009) ou pelas polimerases replicativas  $pol\epsilon$  ou  $pol\delta$ , sendo que a montagem da maquinaria é coordenada por PCNA (Biade et al. 1998; Fortini et al. 1998; Stucki et al. 1998; Fortini and Dogliotti 2007). A síntese de

DNA se estende por um trecho de duas a seis bases com deslocamento da fita e clivagem do filamento deslocado por uma *flap* endonuclease (FEN1) (Figura 4), passo este que precede a etapa final de ligação por uma DNA ligase. Nesta etapa é essencial a presença da proteína XRCC1 que se acredita interceder na montagem do arcabouço da maquinaria de reparo por interagir tanto com a DNA ligase quando com a pol $\beta$ , PARP-1 (envolvida na sinalização de danos ao DNA)(Dantzer et al. 2000) e APE1 (Dianova et al. 2004).

As vias de reparo do DNA nuclear são muito melhor compreendidas em humanos do que as vias mitocondriais. Embora várias proteínas de reparo no núcleo já tenham sido identificadas e estudadas *in vitro* (incluindo àquelas participantes do SP-BER e LP-BER), o reparo de DNA mitocondrial foi muito menos investigado. Embora todas as vias descritas anteriormente atuem no núcleo, evidências sugerem atuação na mitocôndria somente das vias de NHEJ e BER, especificamente o SP-BER (Bohr et al. 2002) embora evidências indiquem presença também das vias MMR e HR (de Souza-Pinto et al. 2008).

### **1.7 – O papel da DNA polimerase beta no reparo de DNA em eucariotos**

Como citado anteriormente, a pol $\beta$  está envolvida nas etapas de liase e polimerase do BER e pertence à família X das DNA polimerases. Baseado em homologia de sequências e similaridades estruturais, as DNA polimerases foram agrupadas em cinco famílias diferentes: A, B, C, X e Y (Hubscher et al. 2002). Enquanto a pol $\gamma$  mitocondrial



**Figura 4 - Representação esquemática da via de reparo por excisão de bases (BER)**

A via inicia-se pelo reconhecimento da base danificada tanto por glicosilases monofuncionais que clivam a ligação N-glicosídica que liga a base à desoxirribose; glicosilases bifuncionais possuem uma atividade de liase associada e podem clivar o sítio AP gerando uma terminação 3' bloqueada pelo produto da liase que pode ser removida pela endonuclease APE1. O sítio AP gerado pelas glicosilases monofuncionais também podem sofrer ação de APE1 levando a formação de uma extremidade 3'OH e 5'desoxirribose-fostato (dRP). Na via curta do BER, onde há reparo de uma única base, a polβ é responsável pela remoção do dRP (liase) e inserção da base correta de acordo com a informação contida no outro filamento de DNA. Na via longa, ocorre deslocamento de um filamento de 2 a 6 bases pelas polimerases replicativas δ e ε que dependem de PCNA, e excisão do filamento por uma flap endonuclease (FEN1). A fase final de ambas as vias envolve ligação da quebra por ligases. Ainda não se sabe quais fatores determinam a escolha da via curta ou longa. Figura adaptada de (Sung and Demple 2006).

faz parte da família A, as polimerases replicativas eucarióticas (pol $\alpha$ , pol $\delta$ , pol $\epsilon$  e pol $\zeta$ ) pertencem à família B. Os membros da família Y (pol $\kappa$ , pol $\eta$ , pol $\iota$  e Rev1) exibem sítios ativos de polimerização mais abertos e maior flexibilidade de domínios de ligação ao DNA, o que permite a acomodação e *bypass* de vários tipos de lesões no DNA, principalmente dímeros de pirimidinas induzidos por luz UV e fotoprodutos (6-4) levando a uma baixa fidelidade na incorporação de nucleotídeos ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) (Yang and Woodgate 2007) (Prakash et al. 2005). Em contrapartida, a família X, representada pelas polimerases pol $\beta$ , pol $\lambda$ , pol $\mu$  e TdT, são DNA polimerases distributivas (isto é, envolvidas na síntese de segmentos muito curtos de DNA) e estão envolvidas no reparo de lesões no DNA (Uchiyama et al. 2009). Embora todas as polimerases conhecidas apresentem sequências de aminoácidos muito diferentes, elas compartilham uma conformação tridimensional que se assemelha à mão direita humana composta de três domínios distintos denominados *palm* (palma), *thumb* (dedão) e *fingers* (dedos), sendo que o domínio da palma é o mais conservado entre os três e abriga resíduos de ácido aspártico altamente conservados que compõem a tríade catalítica do sítio ativo de polimerização (Hubscher et al. 2002).

A atividade da pol $\beta$  é essencial para progressão do BER, principalmente da via curta (Prasad et al. 1998). A estrutura cristalográfica da enzima de rato e humana revelaram um monômero de massa aproximada de 39kDa (Sawaya et al. 1994; Pelletier et al. 1996) composto por um domínio de 8 kDa responsável pela atividade de *liase* e outro de 31 kDa que abriga o sítio catalítico de polimerização (Kumar et al. 1990a; Kumar et al. 1990b; Prasad et al. 2005). A caracterização *in vitro* da pol $\beta$  de mamíferos mostrou que a mesma é mutagenica por apresentar erro de substituição de

base numa taxa calculada entre 0.3 e 2.8 bases erroneamente incorporadas a cada  $10^4$  bases inseridas (Matsuda et al. 2003), valor considerado alto quando comparado às mesmas taxas das DNA polimerases replicativas pol $\epsilon$  (entre  $2 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-7}$ ) (Shcherbakova et al. 2003) e pol $\delta$  (menor que  $1.3 \times 10^{-5}$ ) (Fortune et al. 2005). Este valor poderia ser explicado pela ausência de atividade revisora exonucleásica 3'-5' da pol $\beta$  (Singhal and Wilson 1993). Também foi verificado que a pol $\beta$  é capaz de incorporar AZT-trifosfato (AZT-TP) e didesoxicitidina (ddCTP) no DNA levando a terminação da elongação do DNA (Parker et al. 1991; Copeland et al. 1992). Um estado de haploinsuficiência para o gene da pol $\beta$  em camundongos com redução de 50% na expressão da proteína leva ao aparecimento de tumores de origem linfóide e adenocarcinomas (Cabelof et al. 2006), enquanto que mutações no gene da polimerase beta estão altamente associadas à ocorrência de diversos tipos de câncer (Dalal et al. 2005; Sliwinski et al. 2007; Dalal et al. 2008; Simonelli et al. 2009) considerando que 30% de todos os tumores já estudados apresentam variantes de pol $\beta$ , sendo que quase a metade destas variantes são por alteração de um único aminoácido (Starcevic et al. 2004).

## 1.8 – Estudos envolvendo polimerase beta em tripanossomatídeos

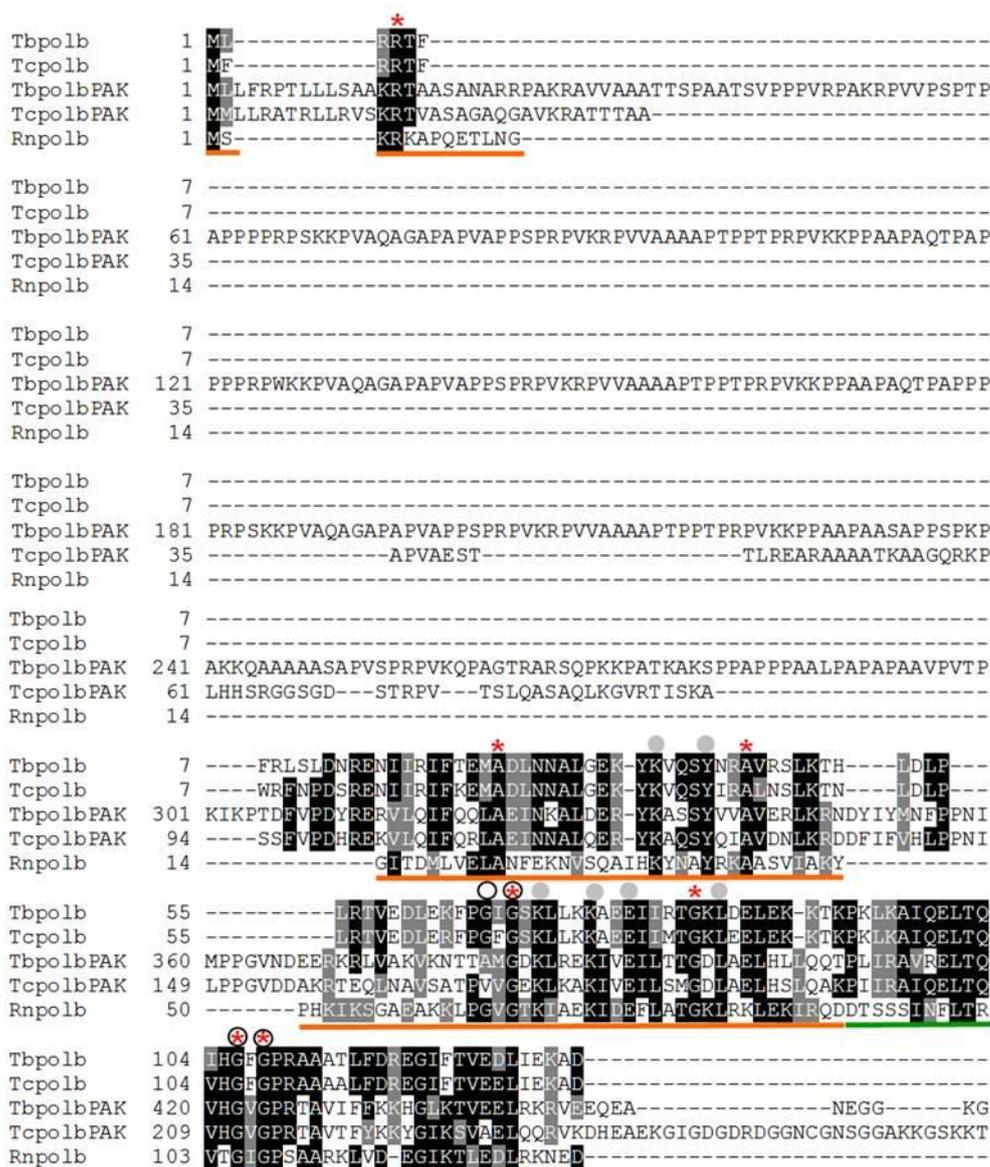
Alguns trabalhos buscaram caracterizar a pol $\beta$  em alguns membros da ordem kinetoplastida. Em *C. fasciculata*, essa proteína, que se apresenta localizada exclusivamente na mitocôndria, possui uma atividade de liase deficiente na liberação do grupamento dRP (Torri and Englund 1995; Saxowsky et al. 2002). Curiosamente, a pol $\beta$  de *L. infantum* foi localizada no núcleo e níveis protéicos da polimerase em extratos de células em fase estacionária de crescimento mostram-se elevados (Taladriz

et al. 2001). Já em *T. brucei*, buscas por homologia no banco de dados do genoma evidenciaram a existência de pol $\beta$  (Klingbeil et al. 2002; Saxowsky et al. 2003) apresentando 70% de identidade na sequência primária de aminoácidos com a pol $\beta$  de *C. fasciculata*. A pol $\beta$  de *T. brucei* foi localizada nos sítios antipodais do cinetoplasto. Outra polimerase beta, denominada *polimerase beta-PAK* (pol $\beta$ PAK), possui uma extensão C-terminal curta e uma porção N-terminal longa rica em alaninas, lisinas e prolinas (daí a denominação PAK). Essa polimerase foi imunolocalizada também no cinetoplasto de *T. brucei*. Tanto a pol $\beta$  quanto a pol $\beta$ PAK possuem atividade de nucleotidil transferase e de liase; porém têm atividade diferencialmente modulada *in vitro* por KCl, MgCl<sub>2</sub> e pH, além de se localizarem em regiões distintas do kDNA (Saxowsky et al. 2003).

O genoma de *T. cruzi* também codifica duas DNA polimerases betas, pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK. As sequências previstas de aminoácidos dos dois alelos da cepa híbrida CL Brener para cada uma das polimerases estão depositadas no banco de dados do GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) sob os nomes sistemáticos Tc00.1047053507063.90 e Tc00.1047053503955.20 para pol $\beta$  e Tc00.1047053503953.59, e Tc00.1047053507063.100 para pol $\beta$ PAK (El-Sayed et al. 2005). O alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das duas proteínas, juntamente com as sequências das DNA polimerases beta de *T. brucei* e a pol $\beta$  de rato, mostrou a conservação dos 27 resíduos invariantes encontrados em DNA polimerases da família X (Sawaya et al. 1994). Isto inclui a tríade de aspartatos que participam na coordenação de íons metálicos durante o processo de polimerização (D190/D192/D256, de acordo com a sequência da pol $\beta$  de rato), além de outros resíduos envolvidos na ligação ao

DNA, contato com dNTPs e na atividade de liase (Figura 5). Foi mostrado que ocorre produção do mRNA e da enzima pol $\beta$  tanto em epimastigotas quanto tripomastigotas não-replicativos, sugerindo que esta enzima deva possuir um função adicional àquela previamente descrita envolvendo replicação do kDNA em formas replicativas (Venegas et al. 2009). Experimentos *in vitro* realizados pela aluna Débora de Oliveira Lopes durante seu doutoramento avaliaram algumas propriedades bioquímicas da pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi*. As atividades de nucleotidil transferase de ambas as proteínas recombinantes são diferencialmente moduladas por NaCl, sendo que a pol $\beta$ PAK é mais sensível a altas concentrações de sal (Figura 6-A). Contrariamente, a pol $\beta$ PAK recombinante de *T. brucei* é estimulada *in vitro* por altas concentrações de KCl e MgCl<sub>2</sub> (Saxowsky et al. 2003). Também foi verificado que a temperatura ótima de polimerização da pol $\beta$  de *T. cruzi* é de 37°C, enquanto que a da pol $\beta$ PAK é de 42°C. Outra diferença entre as duas polimerases se refere à interferência do pH na capacidade de polimerização. Foi verificado que a pol $\beta$ PAK de *T. cruzi* tolera uma variação maior no pH do que a pol $\beta$  (Figura 6-B e 6-C, respectivamente), dado que é bastante similar àquela constatado para as mesmas proteínas de *T. brucei* (Saxowsky et al. 2003). Adicionalmente, a aluna Débora de Oliveira Lopes também mostrou através de ensaios de extensão de primer fluorescente *in vitro* que somente a pol $\beta$ PAK foi capaz de sintetizar DNA na presença de 8oxoG e mal-pareamento adenina:citosina em substratos sintéticos (Figura 7), evidenciando um possível papel de síntese translesão para esta polimerase .

Os dados experimentais provindos dos estudos das DNA polimerases pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de tripanossomatídeos, principalmente em *T. cruzi* e *T. brucei*, sugerem a

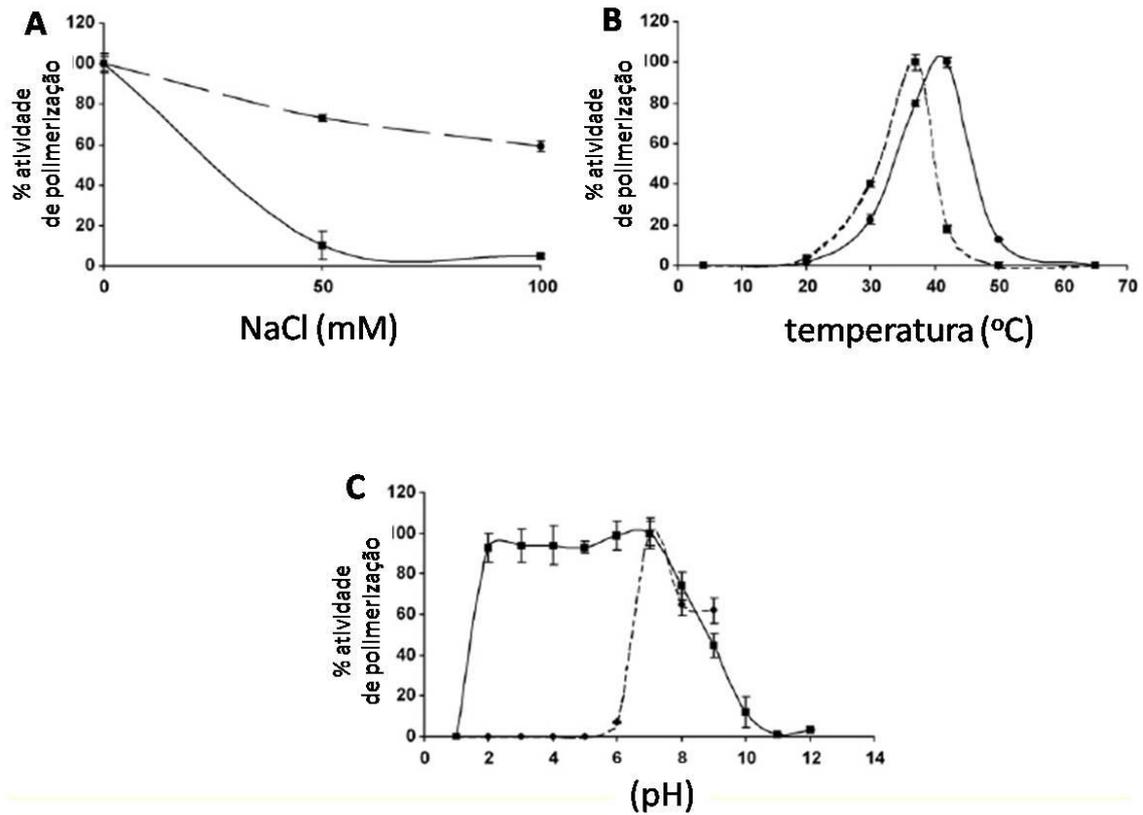


**Figura 5 - Alinhamento das seqüências previstas de aminoácidos das DNA polimerases pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi* e *T. brucei* e da pol $\beta$  de *R. novygericus***

Dados estruturais da pol $\beta$  de rato foram utilizados como referência na comparação com as polimerases dos parasitos na identificação de resíduos chave e delimitação de domínios funcionais. Os números indicam a posição relativa dos resíduos em relação à porção N-terminal. As linhas coloridas indicam a extensão linear dos quatro domínios descritos para a polimerase de rato: 8-kDa (1-87, linha alaranjada), *dedos* (88-151, linha verde), *palma* (152-262, linha azul claro) e *dedão* (263-335, linha azul escuro). Resíduos idênticos estão marcados em preto, enquanto que substituições conservativas estão marcadas em cinza de acordo com o agrupamento funcional dos aminoácidos a seguir (utilizando simbologia de única letra): GASTCP; KHR; DE; MVIL; HFYW. Os 27 resíduos invariantes da família X das DNA polimerases (Steitz 1998) estão indicados por asteriscos vermelhos acima das posições alinhadas. Os símbolos posicionados acima de resíduos específicos indicam envolvimento na ligação ao DNA (círculos), ligantes de dNTP e metais (círculos pontilhados), envolvimento na interação entre os domínios de *palma* e *dedão* (triângulos invertidos) e na atividade de liase (círculos cinza).

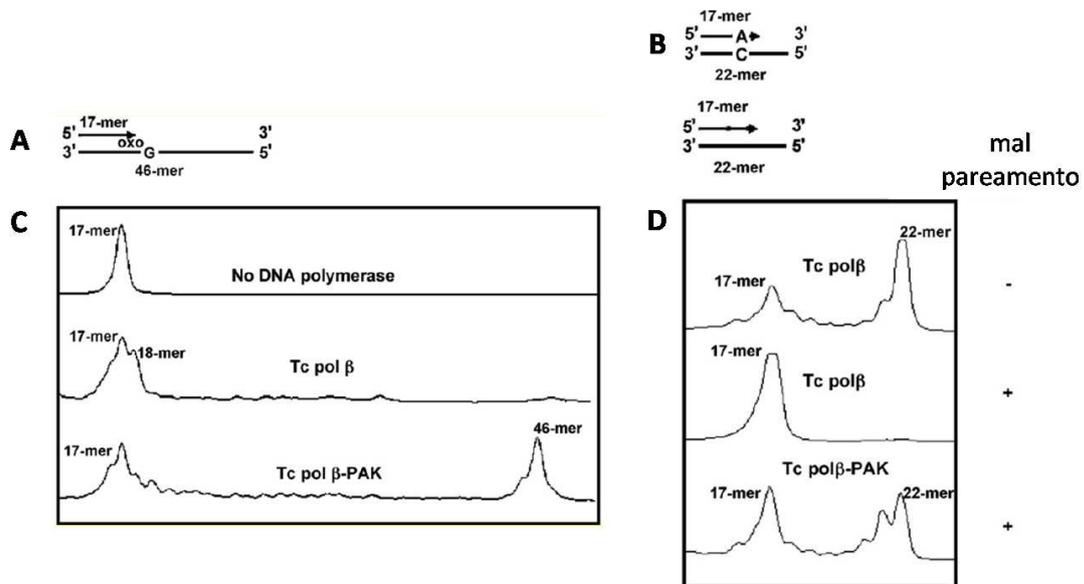
Tbpolb	133	-----QTQLTEQQRVGVRYFHDINEKIPMHESILHENFLRECALRRLGSDYEIQICGS	*
Tcpolb	133	-----RIQLTDQQRVGVKYFHDINEKIPMHESVLHENFLRESVQARLTSDYELIQVCGS	
TbpolbPAK	459	SSGDKS-ALKLTEAQRILGLKYSDITQRI PHAEVRLHEAFLRLRLRKYLGKSYELAICGS	
TcpolbPAK	269	SAGDEDPVLHLTEAQRILGLKYHRDIMQRI PYEEVRLHEAFLRLRLRKYLGKGYEL SICGS	
Rnpolb	131	-----KLNHHQRIGLKYFDFEKRIPREEMIOMQDIVLNEVKK-LDPEYIATVCGS	
Tbpolb	186	YRRRHFFSGDIDATLAR-SINAPPLDAF-----VTTTGVLTILV	
Tcpolb	186	YRRRHFFSGDIDATLAR-TISAPPLDCP-----VTNTGVLTGLV	
TbpolbPAK	518	YRRRLATSGDIDVLTIR-KIVADEGATPQGASEETSREKDGSLKVEKQ-LEPQEVLAAFV	
TcpolbPAK	329	YRRRQPTSGDIDVLTIR-KM---NGKGF--AIRRTKSKKGGHHSDEQVLAPQEVLAAFV	
Rnpolb	181	ERRGAESSGDMDVLLTHPNFTSESSKQP-----KLLHRVV	
Tbpolb	224	EYLQEQRYLEATMALGPLKVMGMRLLPRTTGGAT---KTYKARRVDIRLIETKSVPTAL	
Tcpolb	224	EYLQERNYLEATMAQGPKVMGMRLLPRTTNGTT---KHYKARRVDIRLIEARSVPTAL	
TbpolbPAK	576	SALKKERYLEATLAQGATKFMGVSRLKSYKNAGTANPRMY PARRLDIRFVEPECFPAAL	
TcpolbPAK	383	EALKRERYLEATLAQGATKFMGVSRLRSYNYNAGATSFKLY PARRLDIRFVEPECFPAAL	
Rnpolb	216	EQLQKVRITDTLSKGETKFMGVCQLPSENDE-----NEYHRRIDIRLIPKIQYYCGV	
Tbpolb	281	LYFTGSKNFNVMRQAATSKGYLLNEYGLFKVGTG-----	
Tcpolb	281	LYFTGSKNFNVMRQAATSKGYLLNEYGLFKLGSP-----	
TbpolbPAK	636	LYFTGSKNFNVMRAEAIKFNFILNEYGLFNDAAT-----GNEPTSSSETGG	
TcpolbPAK	443	LYFTGSKNFNVMRAEAIKQNFVLLNEYGLFNDAATVAAAAEDNAV D GSSSCSSGSSGG	
Rnpolb	270	LYFTGSDIFNKMRHAHALKGFITNEYTIRELIGVT-----	
Tbpolb	316	-----DEVRVLCERVRARKAAELSKSQVKQEDPY-SSSSVTE	
Tcpolb	316	-----EEVKALQERVRANKIACTKNSPTDA----ASDPTVE	
TbpolbPAK	683	RV-----AGDGADKGAIRGRWSAEAFQKLVRAQYYSKSPAFVGTIE---DAVDDEK	
TcpolbPAK	503	NSKNKPNNNNSNNGGGGNTARGRWNAEAFQKLVRAQYYSKSPAFVGDGDDGHGEEDDGE	
Rnpolb	305	-----	
Tbpolb	352	EGADPF-----VSSISGNSAKMETLGMTKELEFAKRVHVTCEKDVFDVLGMPEY	
Tcpolb	348	EGVLPV-----VSVISGSAKMETLGLTKELEVRVHVTCEKDVFDVLGMPE	
TbpolbPAK	732	DGEAAVGKNAK----GSSATSRKQKQQQAKELAALWREVEFARRVKVHEREIFAAALGMAY	
TcpolbPAK	563	DGALGAGEDTRSCKHGKRVSAARQKQQQ-QELAALWREVESRRVKVHERDIFDALGMTY	
Rnpolb	305	-----GVAQEPLPVDSEQDIFDIQWRY	
Tbpolb	400	AKPENRDP-----	
Tcpolb	396	AKPENRDP-----	
TbpolbPAK	788	VHPEKRDVGTKTEGNVVGADKKRRSK	
TcpolbPAK	622	VQPEQREM-----	
Rnpolb	328	REPKDRSE-----	

Figura 5 - continuação



**Figura 6 - Análise das atividades de polimerização da polβ e polβPAK em diferentes condições**

As proteínas recombinantes polβ (●) e polβPAK (■) (1μg por reação) foram incubadas com 50mM de um substrato (anelamento de um iniciador marcado com fluoresceína em sua extremidade 5' anelado a um oligonucleotídeo de tamanho definido) e tampão contendo diferentes concentrações de (A) NaCl, (B) temperatura e (C) pH. Os dados representam a média±desvio padrão de três experimentos independentes.



**Figura 7 - Síntese de DNA em um oligonucleotídeo contendo 8oxoG**

**A**, Representação esquemática do oligonucleotídeo contendo a lesão anelado ao primer M13. **B**, Representação do substrato sintético contendo um mal-pareamento adenina:citosina e do substrato sem a lesão. **C** e **D**, Padrão de picos obtidos em um sequenciador automático para os ensaios de extensão de primer na presença de 8oxoG e mal-pareamento, respectivamente. As proteínas recombinantes polβ e polβPAK de *T. cruzi* foram incubadas separadamente com 50nM de cada uma das construções em condições ótimas de polimerização a 37°C durante 30 min.

presença de um BER mitocondrial dependente da participação das duas enzimas. Todavia, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas com o intuito de melhor entender a participação e o envolvimento destas polimerases nos processos de replicação do cinetoplasto e de reparo do genoma mitocondrial, considerando que o kDNA é uma estrutura morfológicamente complexa e que sua integridade é certamente vital para o parasito durante seu ciclo de vida e no momento da infecção. Desta maneira, novas abordagens *in vivo* e *in vitro* são necessárias no fornecimento de evidências bioquímicas funcionais. Estes dados irão consolidar melhor o modelo teórico que tenta explicar a participação da pol $\beta$  e da pol $\beta$ PAK na manutenção do DNA mitocondrial de *T. cruzi*.

## 2 – Objetivos

Caracterizar a DNA polimerase beta ( $pol\beta$ ) de *Trypanosoma cruzi* e investigar o seu envolvimento no Reparo por Excisão de Bases e a resposta ao estresse oxidativo na manutenção do DNA mitocondrial do parasito.

### Objetivos específicos

1. Verificar atividade de *liase* para a  $pol\beta$  e  $pol\beta$  PAK *in vitro*;
2. Verificar se uma mutação de fenilalanina para tirosina no resíduo 395 da  $pol\beta$  confere capacidade de síntese de DNA *in vitro* na presença de 8oxoG e mal-pareamento;
3. Avaliar a resposta em parasitos selvagens e linhagens transfectadas de *T. cruzi* superexpressando a  $pol\beta$  aos tratamentos com AZT, benzonidazol e tratamento com agentes genotóxicos geradores e não-geradores de estresse oxidativo;
4. Comparar o acúmulo de 8oxoG no cinetoplasto dos clones superexpressores em relação à células controle;
5. Verificar a localização subcelular da  $pol\beta$  nas formas epimastigotas, amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*;
6. Verificar a localização subcelular da  $pol\beta$  em epimastigotas e tripomastigotas submetidos a estresse oxidativo e ao longo do ciclo celular de epimastigotas;

## **3 - Material e Métodos**

### **3.1 - Bactérias e parasitos utilizados**

#### **3.1.1 - Bactérias**

Utilizamos bactérias da espécie *Escherichia coli* eletrocompetentes pertencentes às cepas DH5 $\alpha$  (supE44 lacU169 ( $\phi$ 80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1) (Hanahan 1983) e BL21 (genótipo lambda DE3 lysogen, F-, ompT, rB-, mB-) (Stratagene). As bactérias foram crescidas em meio de cultura 2xYT (1,6 % de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7.4) à 37°C ou 30°C, na presença ou na ausência de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina.

#### **3.1.2 - Parasitos**

Parasitos do clone CL Brener de *Trypanosoma cruzi* foram cedidos pelo Dr. Égler Chiari, do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Formas epimastigotas foram mantidas em fase exponencial de crescimento ( $5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  parasitos/mL) por passagens regulares em meio LIT (liver infusion tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina (Invitrogen) a 28°C (Camargo 1964). As formas tripomastigotas de cultura de células foram obtidas do sobrenadante de células LLCMK<sub>2</sub> infectadas e mantidas em meio Eagle modificado por Dulbeco-DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Para obtenção de amastigotas, células LLCMK<sub>2</sub> foram crescidas nas mesmas condições acima em lamínulas, sendo posteriormente infectadas com tripomastigotas. As lamínulas foram lavadas após 3 dias para retirada

das formas tripomastigotas, e os amastigotas presentes no interior das células infectadas foram utilizados diretamente nos experimentos de imunolocalização.

## **3.2 - Manipulação de DNA in vitro**

### **3.2.1 - Iniciadores e oligonucleotídeos**

A relação completa dos iniciadores utilizados neste trabalho está organizada no **Quadro I**. A síntese dos mesmos foi realizada pela empresa Alpha DNA (Montreal, Canadá). A ressuspensão dos precipitados liofilizados foi feita em uma quantidade calculada de água deionizada de modo a chegarmos a uma concentração de 200  $\mu\text{M}$ . Após diluição procedemos com estocagem adequada dos tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 - Obtenção de DNA e amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

O DNA genômico total do clone CL Brener foi cedido por Carlos Gustavo Régis da Silva e Helder Magno Silva Valadares, ex-alunos de doutorado do Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

Cada PCR, realizada num volume final de 15  $\mu\text{L}$ , consistiu de tampão da reação 1B 10X (100mM Tris-HCl pH [8,8], 15 mM  $\text{MgCl}_2$  e 750 mM KCl), 25  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0,7 $\mu\text{M}$  de cada iniciador e 0,15 $\mu\text{L}$  correspondendo a 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoentria). As reações foram conduzidas em termocicladores automáticos programados do seguinte modo:

Passo 1 - desnaturação inicial de 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 3 min;

Passo 2 - 35 ciclos compostos por desnaturação de 94  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, anelamento a 55 $^{\circ}\text{C}$  durante 1 min e extensão a 72  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min.

Quadro 1 - Descrição dos iniciadores e oligonucleotídeos utilizados

Primer	Sequência ( sentido 5' - 3' )	Amplificação	Especificidade
5betaEcoRI	<u>GAA TTC</u> ATG TTT CGT CGC ACA	forward	clonagem pMAL
5betaXbaI	<u>ICT AGA</u> ATG TTT CGT CGC ACA	forward	clonagem em pTREX e pROCK
3betaXbaI	<u>ICT AGA</u> TTA GGG GTC GCG GTT	reverse	clonagem em pTREX
Polbetatyr	<u>ICT AGA</u> TTA GGG GTC GCG GTT TTC CGG CTT CGC ATA CCG CAT	reverse	clonagem pMAL
Adpt_pbEcoRI	AAT TCG GCC AAA AAG GCC	oligonucleotídeo	clonagem pROCK
Adpt_pbXhoI	TCG AGG CCT TTT TGG CCG	oligonucleotídeo	clonagem pROCK
pb3'EcoRI	<u>GAA TTC</u> GGG GTC GCG GTT TTC CGG	reverse	clonagem pROCK
pb3'EcoSTP	<u>GAA TTC</u> TTA GGG GTC GCG GTT TTC	reverse	clonagem em pTREX
dRPpbliaze1	CTG CAG CTG ATG GCG UGT ACG GAT CCC CGG GTA C*	oligonucleotídeo	ensaio de liase
dRPpbliaze2	GTA CCC GGG GAT CCG TAC GGC GCA TCA GCT GCA G	oligonucleotídeo	ensaio de liase
SintM138HG	CAA AAG GGT CAG TGC TGG XAC TGG GTG TCG AAG CTC TCT AGC ATG A*	oligonucleotídeo	ensaio de oxoguanina
M13-40	CAG CAC TGA CCC TTT TG	forward	ensaio de oxoguanina
MM2A	*CTT TTC CCA GTC ACG AC	oligonucleotídeo	ensaio de mal-pareamento
pT	CAA AAG GGT CAG TGC CGT TTT TTT TTT TT	oligonucleotídeo	ensaio de mal-pareamento
SLfw	ACA GTT TCT GTA CTA TAT TG	forward	RT-PCR semi-quantitativa
polbetaRT	GAG GTT CGT CTT GAG GCT AT	reverse	RT-PCR semi-quantitativa

Passo 3 – 72°C por 10 minutos (extensão final)

Passo 4 – 4°C até armazenagem a -18°C em congelador

### **3.2.3 – Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos finais de PCR contendo os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% dissolvida em tampão TAE (Tris-acetato 90 mM; EDTA 2 mM) e contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Após ser submetido a uma voltagem de 80 V por aproximadamente 50 minutos, os fragmentos individualizados foram identificados pela incidência de luz UV emitida por transluminador.

### **3.2.4 – Purificação de DNA imobilizado em agarose**

Ácidos nucleicos imobilizados em agarose sólida foram recuperados para processos posteriores utilizando o kit *Wizard PCR Cleanup System* (Promega). De modo resumido, este sistema envolve dissolução do fragmento de agarose em tampão específico a 65°C. A solução obtida é aplicada numa coluna que possui uma membrana de sílica que tem afinidade por DNA. Após breve incubação do sistema em temperatura ambiente, força-se a passagem desta solução pela membrana através de centrifugação e, após duas lavagens, o DNA pode ser eluído aplicando-se na membrana água deionizada ou tampão TE (pH 8.0). O DNA presente na solução eluída foi quantificado no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific).

### **3.2.5 – Clonagens**

#### **3.2.5.1 – Banco de dados**

A sequência de bases nitrogenadas referente ao gene da DNA polimerase beta de *T. cruzi*, localizado no cromossomo 21, foi recuperada do banco de dados do GeneDB

([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) sendo que o alelo escolhido está depositado sob o nome sistemático Tc00.1047053507063.90. A sequência obtida foi utilizada para desenho de iniciadores específicos para amplificação de todo o gene, com adição de sítios reconhecidos por enzimas de restrição específicas em suas extremidades 5' (ver Quadro I).

### **3.2.5.2 – Clonagem da *polβ* no plasmídio pGEM**

Todos os amplicons utilizados em subclonagens subsequentes foram inicialmente clonados nos vetores pGEM-T ou pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) de acordo com a adequação dos sítios de restrição. Este vetor possui duas timinas protuberantes, uma em cada extremidade 3', que se pareiam inespecificamente com adeninas também protuberantes que são incorporadas pela *Taq* polimerase durante a reação de PCR, o que aumenta a eficiência de ligação direta dos produtos de PCR ao vetor. A liberação de fragmentos do plasmídio pGEM foi realizada com enzimas de restrição específicas que liberou fragmentos com pontas adesivas ou coesivas orientadas a serem clonadas em outros vetores.

### **3.2.5.3 – Construção da *polβ* com mutação pontual no vetor pMAL**

Utilizou-se a estratégia de mutação sítio-dirigida para clonagem de uma proteína recombinante portadora de mutação trocando uma fenilalanina para tirosina no códon 395 no gene da *polβ* de *T. cruzi*. Amplicons de *polβ* portando a mutação F395Y foram gerados por PCR utilizando os primers *5betaEcoRI* e *Polbetatyr* (Quadro I), sendo que este último é portador da mutação a ser incorporada na porção C-terminal da proteína. Após clonagem em pGEM realizamos uma digestão dupla *overnight* com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* em tampão apropriado. O material digerido foi aplicado em

gel de agarose 0,8% e os fragmentos de interesse foram purificados de acordo com o processo descrito no item 3.2.4. Estes fragmentos foram clonados em fase no plasmídeo pMAL-g2 (New England Biolabs) abaixo do cassete do gene *malE* que codifica a proteína ligadora de maltose (MBP, do inglês *maltose binding protein*), gerando a construção denominada pMALMBPpol $\beta$ mut.

#### **3.2.5.4 – Clonagem da pol $\beta$ no vetor pROCK**

Para geração e isolamento de clones de *T. cruzi* superexpressando pol $\beta$ , foi necessário a amplificação por PCR do alelo selvagem previamente descrito a partir de DNA genômico da cepa CL Brener. Para tanto, utilizamos os primers 5betaXbaI (*forward*) e pb3'EcoRI (*reverse*) que carregam sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição XbaI e EcoRI, respectivamente, nas suas extremidades 5' (Quadro I). Os amplicons obtidos foram clonados em pGEM. Uma digestão dupla integral com as mesmas enzimas liberou fragmentos carregando extremidades adesivas apropriadas que foram subclonados no plasmídeo pROCKNeo (DaRocha et al. 2004)(ANEXO I), gerando o plasmídeo pROCKpol $\beta$ Neo. Foi necessário utilizar um adaptador com ponta adesiva para EcoRI a 5' e outra para XhoI a 3' através do anelamento parcial dos oligos Adpt\_pbEcoRI e Adpt\_pbXhoI (Quadro I). Esta estratégia se tornou viável admitindo que o amplicon para o gene da Tcpol $\beta$  possui sítio interno para restrição com a enzima XhoI, o que impossibilitaria a retirada do cassete completo do plasmídeo pGEM caso tivéssemos inserido um sítio de XhoI no primer *reverse* no momento da clonagem do gene em pGEM.

### ***3.2.5.5 - Clonagem no plasmídio pTREX em fusão com a proteína verde fluorescente***

Amplicons referentes ao gene completo da pol $\beta$  de *T. cruzi* da cepa CL-Brener foi obtido lançando mão dos primers 5betaXbaI e pb3'EcoSTP (QUADRO I) através de protocolo de PCR já descrito. O produto obtido foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% utilizando o kit *Wizard PCR Clean-up System* (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados no aparelho Nanodrop e clonados no plasmídio pGEM T-easy Vector (Promega, EUA), seguindo orientações do manual. A construção foi posteriormente digerida com as enzimas *XbaI* e *EcoRI* liberando um fragmento orientado a ser subclonado a montante do cassete de GFP presente no vetor de expressão pTREXGFP modificado (Vazquez and Levin 1999)(ANEXO I). Realizamos uma maxipreparação para produção do vetor a ser utilizado na transfecção de acordo com protocolo descrito no item 3.2.7. A transfecção de formas epimastigotas da cepa CL Brener com a construção ocorreu de modo descrito no item 3.5.1. Após 24 horas, 100  $\mu$ L cultura transectada de parasitos foi lavada e fixada em lâmina de vidro durante 15 minutos. Em seguida a lâmina foi montada com Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame) e levadas para visualização em microscópio de fluorescência.

### **3.2.6 - Transformação de bactérias eletrocompetentes**

Células eletrocompetentes foram utilizadas para transformação com os plasmídios. A produção de eletrocompetentes envolve crescimento das células num intervalo de leitura de densidade óptica (DO) ajustado para um comprimento de onda de 600 nanômetros entre 0,6 e 0,8. Após centrifugação a 7500g durante 10 minutos, as células são lavadas 3 vezes com 200mL de água deionizada estéril a 4°C. Novamente, as

células foram centrifugadas nas mesmas condições e lavadas com 50mL de uma solução de glicerol a 10%, seguido de solubilização final do pellet em 1,4mL de solução de glicerol a 10%, alíquotagem das células e armazenamento em ultrafreezer.

Dois microlitros de DNA proveniente das construções plasmídicas, na concentração de 1ng/ $\mu$ L, foram adicionados a 50  $\mu$ L de bactérias DH5 $\alpha$  ou BL21 eletrocompetentes previamente armazenadas a -80°C e descongeladas no gelo na hora do uso (Ausubel et al. 2007). Após incubação em gelo por 5 minutos e submissão a pulso elétrico de 2,5kV (eletroporador MicroPulser Bio Rad), adicionou-se 200  $\mu$ L de meio 2xYT às células transformadas que foram então incubadas durante 45 minutos a 37°C sob agitação com frequência de rotação de 180 RPM. Em seguida, 10 e 100 $\mu$ L das células transformadas foram plaqueados em meio 2xYT adicionado de 1,5% de ágar p/v suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 16 horas em estufa a 37°C.

### **3.2.7 – PCR de colônia**

A triagem de colônias bacterianas contendo o gene clonado foi realizada por PCR em volume de 15 $\mu$ L, mantendo-se as concentrações finais dos reagentes como no protocolo previamente descrito no item 3.2.1. Pequena quantidade da colônia bacteriana era obtida tocando a mesma com uma ponteira de plástico estéril e introduzindo-a no tubo da reação. A presença de amplicons de tamanho esperado em gel de agarose 0,8% indicava a presença do inserto.

### **3.2.8 – Minipreparação e maxipreparação de DNA plasmídico**

A extração de DNA plasmídico foi realizada tanto em pequena escala para manipulações de clonagem de DNA (minipreparações) quanto em escalas maiores que

rendem uma quantidade maior de DNA a ser utilizada em experimentos de transfecção de parasitos (maxipreparações). Em ambos os casos, utilizamos dois kits comerciais que se baseiam em lise celular alcalina e purificação do DNA na solução de lise em coluna de afinidade. Para maxipreparações, 3 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. Para extração do plasmídeo prosseguimos com a resuspensão do *pellet* utilizando o kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Já no caso das maxipreparações, cerca de 500 mL de meio líquido bacteriano crescido *overnight* foi centrifugado, o sobrenadante retirado e o processo de extração em larga escala seguiu as recomendações do fabricante do kit *Wizard Maxiprep* da mesma empresa.

### **3.3 – Expressão e Purificação de polβ mutante**

#### **3.3.1 - Expressão em *E. coli* da proteína recombinante**

Bactérias transformadas com o plasmídeo pMALMBPpolβmut foram crescidas em 10mL de meio 2xYT *overnight*. No dia posterior, o conteúdo deste pré-inóculo foi adicionado a 500mL de meio 2xYT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina para uma OD<sub>600</sub> 0,1 e incubado a 30°C / 180 RPM. A indução da expressão da proteína recombinante se deu pela adição de 0,6mM de IPTG quando a leitura de OD<sub>600</sub> atingiu a faixa de 0,4-0,6. A cultura foi incubada nas mesmas condições e o monitoramento da expressão se deu pela retirada de alíquotas a cada 1 hora durante 4 horas. Cada alíquota de cultura bacteriana foi centrifugada, o pellet resuspenso em tampão de proteína 2X que foram resolvidas em gel de SDS-PAGE 8% desnaturante.

### 3.3.2 – Purificação da proteína

Após as 4 horas de indução, o volume remanescente da cultura (um pouco menos que 500 mL) foi centrifugado a 4000 g durante 10 minutos. O *pellet* bacteriano resultante foi resuspendido em 25mL de tampão de coluna (Tris HCl 20 mM pH7.4, NaCl 200 mM e EDTA 1 mM) e recebeu lisozima na concentração final de 2,5mg/mL. O resuspendido foi congelado a -80°C *overnight*. No dia seguinte as células passaram por três ciclos de choque térmico 37°C/-80°C e foram subsequentemente sonicadas em amplitude de 30% por 3 ciclos de 45 segundos em gelo (15 segundos *on*, 5 segundos *off*). O produto da sonicação foi centrifugado a 9000g durante 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante recolhido contendo a proteína de interesse foi diluído cinco vezes em tampão de coluna (Tris HCL 20mM pH 7.4, NaCl 200 mM e EDTA 1mM). Seguiu-se protocolo do fabricante para a purificação da Tcpolβ-MBP em coluna de amilose (New England Biolabs). As 10 frações obtidas na purificação foram resolvidas em gel de SDS-PAGE 8% e as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford 1976).

### 3.4 – Ensaio *in vitro*

#### 3.4.1 - Ensaio de polimerização *in vitro* na presença de 8oxoG e mal pareamento

As condições ótimas de polimerização *in vitro* das proteínas de *T. cruzi* recombinantes polβ e polβPAK foram otimizadas anteriormente (Lopes et al. 2008), sendo que as mesmas condições foram utilizadas para o ensaio com a proteína mutante. Como substrato do ensaio de polimerização na presença de 8-oxoG, o *primer* M13-40 foi anelado ao oligonucleotídeo SintM138HG que contém 8oxoG, ambos listados no Quadro I. Para o ensaio de extensão de primer na presença de mal-

pareamento, o *primer* M13 foi anelado a um oligonucleotídeo de 22 bases de extensão, posicionando um mal-pareamento A-C na primeira base da extremidade 3' do *primer* a ser estendido. O anelamento para composição dos dois substratos distintos se deu pela incubação de 0,8  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo em cada par diluído em água, desnaturação da mistura a 95°C por 5 minutos e resfriamento gradual em bancada até 25°C.

O ensaio de extensão de primers constou da incubação da enzima mutante e dos controles Tcpol $\beta$  e Tcpol $\beta$ PAK com 50mM de cada um dos primers-templates testados, 5mM de DTT, 100 $\mu$ g/mL de BSA, 10 mM de Tris-HCl, pH [7.5], 10mM de MgCl<sub>2</sub> e 10mM de dNTPs. As reações ocorreram por 30 minutos a 37°C, sendo finalizadas pela adição de 10  $\mu$ L de *stop solution* (80% de formamida deionizada, 10 mM de EDTA pH [8.0], 1 mg/mL de Xileno Cianol e 1 mg/mL de Azul de Bromofenol), aquecidos a 90°C durante 2 minutos e transferidos imediatamente para um recipiente com gelo. Os produtos foram aplicados em um gel SDS-PAGE desnaturante em um seqüenciador de DNA automático ALF (Pharmacia). Utilizamos o software AlleleLocator v.1.03 para visualização dos fluorogramas e análise dos dados.

### 3.4.2 - Ensaio de liase

Para verificar atividade de liase, o oligonucleotídeo denominado dRPpblase1 marcado com o fluoróforo Cy5 na extremidade 3' e contendo uma uracila na posição 16 foi anelado ao seu complementar denominado dRPpblase2 de tamanho semelhante (QUADRO I). Uma quantidade de 4  $\mu$ M do anelado contendo o mal-pareamento G-U foi incubada com 0,5 unidade de uracil-N-glicosilase (UDG) de *E. coli* (Invitrogen, USA) e 10 mM de DTT em uma reação de 10  $\mu$ L que foi incubada em

estufa a 37°C durante 1h. Em seguida, a reação foi suplementada com 20 unidades de endonuclease apurínica/apirimidínica APE1 (New England Biolabs), 8mM de MgCl<sub>2</sub> e nova incubação a 37°C por 1:30 H. A verificação de atividade de dRPase intrínseca das proteínas recombinantes polβ e polβPAK se deu pela incubação das mesmas em reações de 10μL contendo 1 μM de substrato de DNA pré-incubado com UDG e APE1, 3 μL da enzima purificada, 1 μL de tampão ótimo das polimerases (Tris-HCl 500mM pH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 100 mM), 15 mM de DTT e 3μg de BSA. Após incubação a 37°C os produtos das reações foram reduzidos pela adição de 300 mM de NaBH<sub>4</sub>, sendo posteriormente precipitados com etanol, resuspendidos em água deionizada e misturados com *stop solution*. As amostras foram desnaturadas a 95°C e aplicadas em um gel SDS-PAGE desnaturante 20% que foi submetido à detecção por laser em um seqüenciador ALF Express II automático (GE Healthcare). Utilizamos o software AlleleLocator v.1.03 para visualização do fluorograma e análise do dados.

### **3.5 - Geração de parasitos superexpressando a polimerase β de *T. cruzi***

#### **3.5.1 - Transfecção de parasitos**

Um total de  $1 \times 10^8$  parasitos epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* foi sedimentado por centrifugação a 3000 RPM por 10 min e ressuspendidos em 5mL de tampão de eletroporação (75% de EPB (NaCl 137mM, KCl 5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7mM, Glicose 6mM e Hepes 21mM pH [7,5] ) adicionados a 25% de Citomix (KCl 120mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, Hepes 25mM, EDTA 2mM e MgCl<sub>2</sub> 5mM). Cinquenta microgramas do plasmídio pROCKpolβNeo foram linearizados através de incubação com a enzima de restrição *NotI* (Promega), passo necessário para ocorrer recombinação e integração do vetor nos *loci* de β-tubulina no genoma do parasito. Os

parasitos foram novamente centrifugados, resuspendidos em tampão de eletroporação e incubados durante 15' a temperatura ambiente na presença de 50µg do plasmídeo linearizado, sendo que em seguida foram submetidos a dois pulsos de 0,3KV e 500 µF de capacitância, com 10 segundos de intervalo entre os pulsos em um eletroporador *Gene Pulser System* (Bio-Rad). Parasitos para o controle negativo da transfecção foram submetidos ao mesmo protocolo mas não foram incubados com vetor linearizado. A amostra transfectada foi transferida para 5mL de meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino. O antibiótico geneticina G418 (200µg) (Gibco) foi adicionado à cultura após 24 horas. A seleção da população transfectada foi confirmada após aproximadamente quatro semanas pela observação da sobrevivência de parasitos na garrafa que recebeu o plasmídeo e morte da cultura que não recebeu a construção.

### **3.5.2 - Seleção de clones transfectantes em meio sólido**

A obtenção de clones de formas epimastigotas contendo o plasmídeo pROCKpolβNeo foi realizada em meio agar-sangue semi-sólido (Goldberg and Chiari 1980). Placas de petri receberam 20 mL de uma mistura de 0,75% de bacto-ágar, 48,4% de LIT completo, 48,4% de BHI (*Brain Heart Infusion*), 2,5% de sangue defibrinado e 250 µg/ml de G-418. As placas foram semeadas individualmente com 100 uL de cultura de parasitos na densidade de  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  parasitos/mL, embaladas uma a uma com papel *craft* e mantidas a 28°C durante um período de 30 dias. Os clones obtidos após este período de incubação foram transferidos para placas de 24 poços que continham 1mL de LIT suplementado com 200µg de G-418, que foram mantidas em câmara úmida por cinco dias com subsequente transferência dos clones

sobreviventes para garrafas de cultura de células contendo 5mL de LIT e mesma concentração do antibiótico.

### **3.6 – Northern Blot**

#### **3.6.1 - Extração de RNA total de *T. cruzi***

Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram centrifugados a 3000 RPM durante 10 minutos à 25°C. O RNA total foi isolado utilizando-se o *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e com o máximo de  $5 \times 10^8$  células por coluna. A concentração do RNA total foi medida por absorvância a 260nm em Nanodrop (GE HHealthcare). A integridade e qualidade do RNA extraído foram avaliadas em gel de agarose 0,8% / formaldeído 2%. Cinco microlitros do RNA (2µg) foram misturados a 25µL de tampão de amostra (0,75 mL de formamida deionizada, 0,15 mL de tampão MOPS 10X, 0,24 mL de Formaldeído, 0,1mL de água, 0,1 mL de Glicerol e 0,08 mL de Azul de Bromofenol 10% p/v) e incubados durante 15 minutos a 65°C. Em seguida foi misturado 1µL de brometo de etídio 1,0mg/mL a cada amostra. Após a corrida, o RNA separado em gel foi visualizado sob a incidência direta de luz UV emitida por transluminador.

#### **3.6.2 - Transferência para membrana**

O RNA purificado (10µg) foi misturado a tampão de amostra e submetido a eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições como descrito acima. Após avaliação e visualização das bandas de RNA ribossomal em transluminador, o gel foi lavado duas vezes durante 20 minutos em solução SSC 10X. A transferência dos RNAs para membrana Hybond-N (Amersham) se deu por capilaridade durante 24 horas

(Ausubel et al. 2007). O RNA transferido foi covalentemente fixado a membrana por *crosslink* em aparelho UV Stratalinker (Stratagene), seguindo protocolo padrão.

### 3.6.3 - Marcação e purificação de sonda radioativa

A sonda de DNA correspondente a parte do gene da Tcpol $\beta$  foi obtida pela digestão do plasmídeo pGEMpol $\beta$  com as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI (Jena Biosciences) durante 1 hora. O digerido foi separado em gel de agarose 0,8% e um fragmento de 694pb correspondente a porção C-terminal do mesmo gene foi purificado utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo protocolo do produto. A amostra purificada foi dosada em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA), o fragmento foi marcado utilizando o kit *Ready-to-Go* (GE Healthcare) e purificado em coluna *NICK<sup>TM</sup> Columns Sephadex-G-50* (GE Healthcare). A marcação da fração eluída da coluna foi confirmada em cintilador radioativo (Perkin Elmer).

### 3.6.4 - Hibridação

A membrana contendo os RNAs transferidos foi incubada em solução de pré-hibridação ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,25 M, SDS 7%, BSA 1%, EDTA 0,5 M pH [8,0], qsp para 70 mL) na proporção de 5 mL de solução por  $\text{cm}^2$  de membrana, em forno giratório a 60°C por 1 hora. As sondas foram desnaturadas por fervura e adicionadas ao tubo contendo a membrana. O processo de hibridação ocorreu durante 24 horas a 60°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes em solução de lavagem durante 20 minutos, também em forno giratório. A membrana foi exposta em cassete para captura da emissão radioativa durante 6 dias. A imagem foi capturada no aparelho *Storm<sup>®</sup>* (GE Healthcare).

### 3.7 - RT-PCR semi-quantitativa

A reação para geração de cDNA total a partir do RNA extraído envolveu incubação de 5µg de RNA, dNTP, oligodT e ddH<sub>2</sub>O num volume final de 10µL. A reação permaneceu a 65°C durante 5 minutos e posteriormente foi colocada no gelo. A reação foi suplementada com Superscript, DTT e tampão específico, sendo incubada a 42°C por 50 minutos e em seguida a 70°C durante 15 minutos. O cDNA gerado serviu como molde para amplificação do gene da Tcpolβ utilizando os primers SLfw e PolbetaRT em protocolo padrão de PCR (Quadro I). As amostras foram separadas em gel de acrilamida 8% que foi corado pelo método da prata.

### 3.8 - Imunolocalização

A localização sub-celular da polβ de *T. cruzi* foi determinada para as formas epimastigota e amastigota da cepa CL Brener, e também para a forma tripomastigota da cepa Y. Também realizamos localização da proteína nas formas epimastigota e tripomastigota após tratamento das mesmas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Células em fase exponencial de crescimento foram sedimentadas por centrifugação, coletadas e concentradas para 5x10<sup>6</sup> parasitos/mL em PBS 1X. Dez microlitros da suspensão celular foram aplicados em lâmina de vidro convencional e tratada com solução de PBS 1X suplementada com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X, as células foram incubadas com PBS + Triton X-100 0,1% por 5 minutos, lavadas novamente, e bloqueadas com PBS 1X + BSA 1% por 15 minutos. Anticorpos policlonais primários anti-Tcpolβ isolados em coelho foram diluídos na proporção 1:2000 em PBS + BSA 0,1% e aplicados na lâmina. Após 1 hora a lâmina foi lavada e incubada com DAPI na

concentração de 10 µg/mL e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 555 (Invitrogen, EUA) durante 30 minutos. Após uma última lavagem com PBS 1X, as imagens foram capturadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon E600 equipado com uma câmera DXM 1200 F. As imagens das imunolocalizações realizadas em tripomastigotas após tratamento com peróxido de hidrogênio foram coletadas utilizando microscopia de convolução utilizando microscópio Olympus IBX81 e processadas pelo software Cell<sup>M</sup>.

### 3.9 – Microscopia eletrônica de transmissão

Para verificação de possíveis alterações ultraestruturais no cinetoplasto das células superexpressoras de polβ, alíquotas da cultura foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram inicialmente lavadas em PBS, pH 7,2 e fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, por uma hora. Em seguida, foram lavadas e então pós-fixadas em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e ósmio 1% diluídos no mesmo tampão, por 45 minutos. Terminada a etapa de pós-fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas em uma bateria de acetona em concentrações crescentes com intervalos de 10 minutos entre cada desidratação (de 50% até 90% - uma vez e duas vezes 100%). Em seguida, o material foi infiltrado *overnight* com uma mistura 1:1 de acetona 100% e resina epóxi (Polybed). No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina pura e 5 horas depois foram emblocadas. Este material permaneceu 48 horas em estufa à 60°C, até que já estivesse polimerizado. Os cortes ultrafinos foram obtidos através de ultramicrotomia em aparelho Reichert (Leica) e contrastados em acetato de uranila a 5% por 45 minutos e

em citrato de chumbo por 5 minutos. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

### **3.10 - Curvas de sobrevivência utilizando agentes genotóxicos**

#### **3.10.1 - Condições experimentais de estabelecimento dos tratamentos e contagem dos parasitos**

Todos os experimentos de sobrevivência foram conduzidos utilizando epimastigotas transfectados com o plasmídeo pROCK sem inserto como controle e dois clones superexpressores da pol $\beta$  de *T. cruzi*, denominados *clone 1* e *clone 2*. As células foram apropriadamente diluídas e transferidas para placas de teste contendo 24 poços (TPP, Suíça) com capacidade de 2 ml cada um. Para cada tratamento, um total de 1,5 mL da cultura foi transferido para um poço. Após adição do agente genotóxico, a cultura foi homogeneizada com pipeta de 1mL e o volume redistribuído igualmente para dois poços adjacentes, perfazendo uma triplicata experimental (500  $\mu$ l cada um). As placas foram vedadas lateralmente com uma tira de *Parafilm* e armazenadas em estufa a 28°C por 48 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi novamente homogeneizado, uma alíquota foi retirada e diluída em PBS 1X suplementado com eritrosina B a 0,04% para contagem em câmara de Neubauer. Os dados foram organizados em uma planilha e os resultados foram expressos como porcentagens de crescimento em relação às culturas não tratadas. Os gráficos foram gerados utilizando software Graphpad Prism versão 5.01.

### **3.10.2 - Curva de sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio e metoxiamina**

Nos ensaios envolvendo  $H_2O_2$  como agente genotóxico, desafiamos células que estavam sendo mantidas em fase *exponencial* de crescimento ( $5 \times 10^6$  células / mL) e também células que estavam sendo mantidas próximas da fase *estacionária* de crescimento ( $1 \times 10^8$  células / mL). É importante ressaltar que as células em fase estacionária receberam tratamento *enquanto estavam na concentração de  $1 \times 10^8$  células/mL*. Esta concentração foi mantida *na placa* durante todo o período de incubação das células com o peróxido de hidrogênio (em geral 48 ou 72 horas) até o momento da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Os tratamentos realizados foram 200, 300 e 400  $\mu M$  de  $H_2O_2$  para células em fase exponencial e 1, 2 e 3 mM para células em fase estacionária. Outro agente genotóxico testado foi a metoxiamina (MX) nas concentrações de 10, 50 e 100 mM. Curvas adicionais com duplo tratamento simultâneo envolvendo  $H_2O_2$  e MX foram estabelecidas com as mesmas concentrações de peróxido testadas anteriormente para os dois tipos celulares (exponencial e estacionário) agora suplementadas com 10mM de MX. Os parasitos foram contados após 48 horas de tratamento.

### **3.10.3 - Curva de sobrevivência na presença de MMS**

Também testamos a sobrevivência das células mantidas em fase *exponencial* de crescimento ( $5 \times 10^6$  células / mL) frente ao agente metilante metilmetanosulfonato (MMS). As culturas celulares diluídas em placa foram suplementadas com 0,001%, 0,002% e 0,003% de MMS. Neste caso os parasitos foram contados 72 horas após o tratamento.

#### **3.10.4 - Curva de sobrevivência na presença de AZT**

Uma possível diferença de sobrevivência entre os clones superexpressando a polimerase beta e células controle foi verificada após tratamento com AZT. Um total de 1,33g de AZT em pó (gentilmente cedido pela Profa. Kenya Silva Cunha, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade de Goiânia/GO) foi diluído em 1 ml de água deionizada para uma solução final de 5mM que foi utilizada no tratamento de células em fase exponencial de crescimento. As concentrações de AZT testadas foram de 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 150  $\mu$ M. As células foram contadas 48 horas após o tratamento.

#### **3.10.5 - Curva de sobrevivência na presença de benzonidazol**

As células também foram desafiadas quanto a sua sobrevivência na presença de benzonidazol, nas concentrações de 60  $\mu$ M, 120  $\mu$ M e 240  $\mu$ M. Os parasitos foram contados após 48 horas em câmara de Neubauer.

### **3.11 - Quantificação de 8oxoG no cinetoplasto**

Realizamos um estudo qualitativo comparando o acúmulo de 8oxoG no cinetoplasto de células controle e superexpressoras de pol $\beta$ . O procedimento descrito abaixo é adaptação de protocolo anterior (Struthers et al. 1998) que lança mão da capacidade da avidina de reconhecer 8oxoG com alta especificidade, podendo ser utilizada como biomarcador para danos oxidativos ao DNA. Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram concentrados por centrifugação (960 g durante 10 minutos à temperatura ambiente), lavados com PBS 1X gelado, ressuspendidos em 500  $\mu$ l de solução PBS 1X + 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados em gelo durante 0, 1, 2 e 24 horas. Após duas lavagens com PBS 1X, as células foram ressuspendidas em 50 $\mu$ l de PBS 1X. Todas as etapas seguintes foram realizadas protegendo as células da luz e a 4°C,

exceto quando indicado. Os parasitos foram fixados em solução de PBS 1X suplementada com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos, lavados e ressuspendidos em PBS 1X para uma concentração final de  $6 \times 10^8$  células / mL. Alíquotas de 50 mL das suspensões celulares foram distribuídas em lâminas de vidro de 8 poços restritas por câmaras (Nunc, EUA). Após 1 hora de incubação na geladeira para aderência das células na lâmina, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 na concentração final de 0,2% em PBS 1X, tratadas com RNase A na concentração final de 100  $\mu\text{g}$  /ml em PBS 1X durante 15 minutos a 37°C e lavadas 3 vezes com PBS. Seguiu-se um bloqueio com solução de PBS suplementada com soro fetal bovino a 5% durante 1 hora. O passo seguinte envolveu incubação com solução de avidina conjugada com FITC dissolvida em PBS 1X para uma concentração final de 5 $\mu\text{g}$  / ml por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais 4 lavagens com PBS 1X foram necessárias antes das lâminas serem montadas com solução de montagem (glicerol/Tris-HCl pH 9.0 na proporção 9:1 + 2,3% DABCO) e visualizadas em microscopia de epifluorescência.

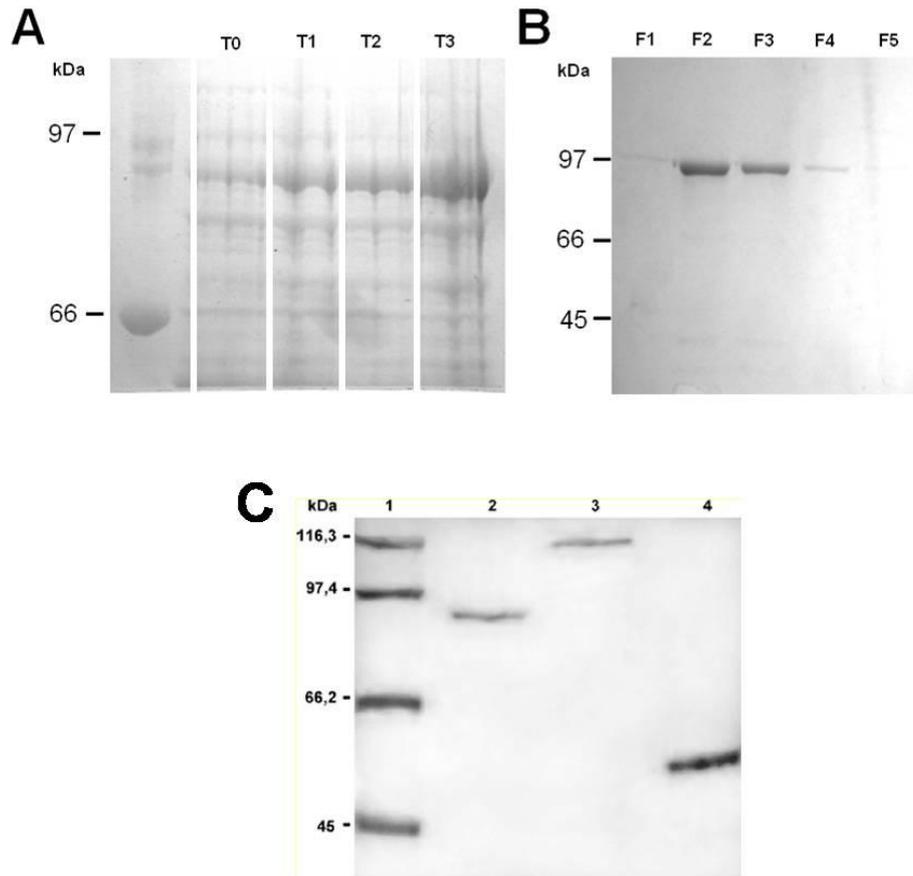
## 4 - Resultados

### 4.1 - Ensaio de extensão de primer para pol $\beta$ mutante F395Y na presença de 8oxoG e mal-pareamento

Nosso grupo mostrou diferenças bioquímicas entre pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi* quanto a capacidade de síntese de DNA na presença de 8oxoG e de erros de mal-pareamento. Enquanto a pol $\beta$ PAK é capaz de estender *in vitro* o primer M13 na presença destes substratos num molde sintético de DNA, a pol $\beta$  não consegue incorporar didesoxinucleotídeos frente a estas lesões. Considerando que apesar das duas proteínas serem relativamente similares em relação às suas sequências primárias de aminoácidos em seus domínios conservados, verificamos a existência de uma troca de tirosina para fenilalanina na posição 395 da pol $\beta$ , numa região de alta conservação na sequência de aminoácidos (Figura 5, resíduo indicado pela seta). Esta tirosina faz parte de um total de 27 resíduos que estão conservados em todas as polimerases da família X (Steitz 1998). Sendo assim, com o objetivo de verificar se esta alteração pontual seria responsável pelas diferenças de síntese translesão observadas para a pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK, foi produzida em bactérias uma pol $\beta$  recombinante revertendo a fenilalanina para tirosina (pol $\beta$ mut), e em seguida foi verificado se esta proteína seria capaz de realizar síntese translesão assim como a pol $\beta$ PAK. Após clonagem em plasmídeo pMAL e transformação em *E. coli*, procedemos com um ensaio de expressão em pequena escala da proteína mutante recombinante em fusão com MBP. Verificamos aumento gradual da expressão da pol $\beta$ mut até 3 horas após indução da expressão com IPTG (Figura 8-A). Em seguida, realizamos a expressão e purificação da proteína em coluna de amilose. Coletamos cerca de vinte frações de eluição e

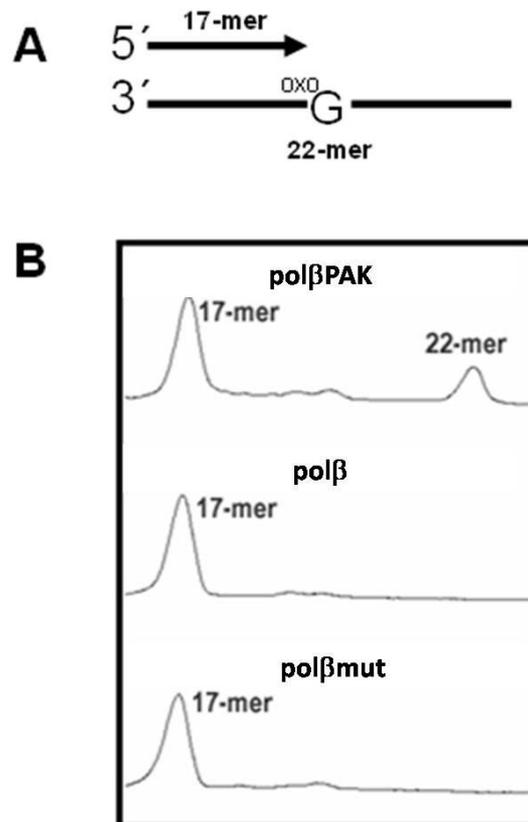
observamos liberação da proteína purificada da coluna nas frações 2 e 3 (Figura 8-B). As bandas correspondentes à proteína de fusão com MBP se apresentaram no tamanho esperado de 88 kDa (polimerase beta 45,5 kDa; MBP2 42.5 kDa). As proteínas recombinantes pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi*, também expressas em *E. coli* em fusão com MBP e purificadas em coluna de amilose, foram gentilmente cedidas pelos alunos Carlos Gustavo Régis da Silva e Débora de Oliveira Lopes e utilizadas como controles experimentais, além de uma amostra da proteína MBP isolada. Tanto a integridade quanto o grau de pureza das amostras cedidas foram avaliados em gel de proteína SDS-PAGE 8% (Figura 8-C).

Nos ensaios de extensão de primer, as proteínas recombinantes pol $\beta$ , pol $\beta$ PAK e pol $\beta$ mut foram incubadas na presença do primer M13 anelado ao oligonucleotídeo contendo 8oxoG (Figura 9-A). A reação ocorreu num tampão ótimo comum entre as pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK, utilizadas como controle de não-extensão e extensão, respectivamente. A presença de um pico de 17-mer indica que o iniciador não foi estendido pela DNA polimerase testada, enquanto que a presença de um pico de 22-mer indica uma extensão total do iniciador. Os resultados mostraram que a pol $\beta$ mut não foi capaz de estender totalmente o iniciador pela ausência do pico esperado de 22-mer no fluorograma (Figura 9-B, fluorograma 3). Já a pol $\beta$ PAK foi capaz de passar pela lesão (Figura 9-B, fluorograma 1). Este resultado mostra que a reversão do resíduo de fenilalanina para tirosina na posição descrita não é capaz de conferir a pol $\beta$  a capacidade de sintetizar DNA na presença de uma lesão de natureza oxidativa como a 8oxoG.



**Figura 8 - Expressão e purificação da pol $\beta$  de *T. cruzi* com a mutação F395Y**

**A**, expressão da proteína de fusão MBP-Tcpol $\beta$ F395Y (avaliada em aproximadamente 88kDa) em extrato total de *E. coli*. As frações foram coletadas nos tempos 0h(T0), 1h (T1), 2h (T2) e 3h (T3) após indução com IPTG. A esquerda está o padrão de peso molecular em kDa. **B**, purificação em coluna de amilose da proteína de fusão MBP-Tcpol $\beta$ F395Y; F1 a F5 correspondem às cinco frações de 1,5mL que foram coletadas durante o processo de eluição da proteína da coluna de amilose. As amostras de A e B foram separadas em gel de acrilamida 8% na presença de SDS. **C**, preparação das proteínas recombinantes pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK em fusão com MBP. As amostras de pol $\beta$ MBP (linha 2), pol $\beta$ PAKMBP (linha 3) e MBP (linha 4) foram aplicadas em gel SDS-PAGE 8% corado com Azul de Coomassie. A linha 1 corresponde ao padrão de peso molecular indicado em kDa. Pesos moleculares estimados: pol $\beta$ MBP (88 kDa); pol $\beta$ PAK (111.3 kDa); MBP (48.4 kDa).



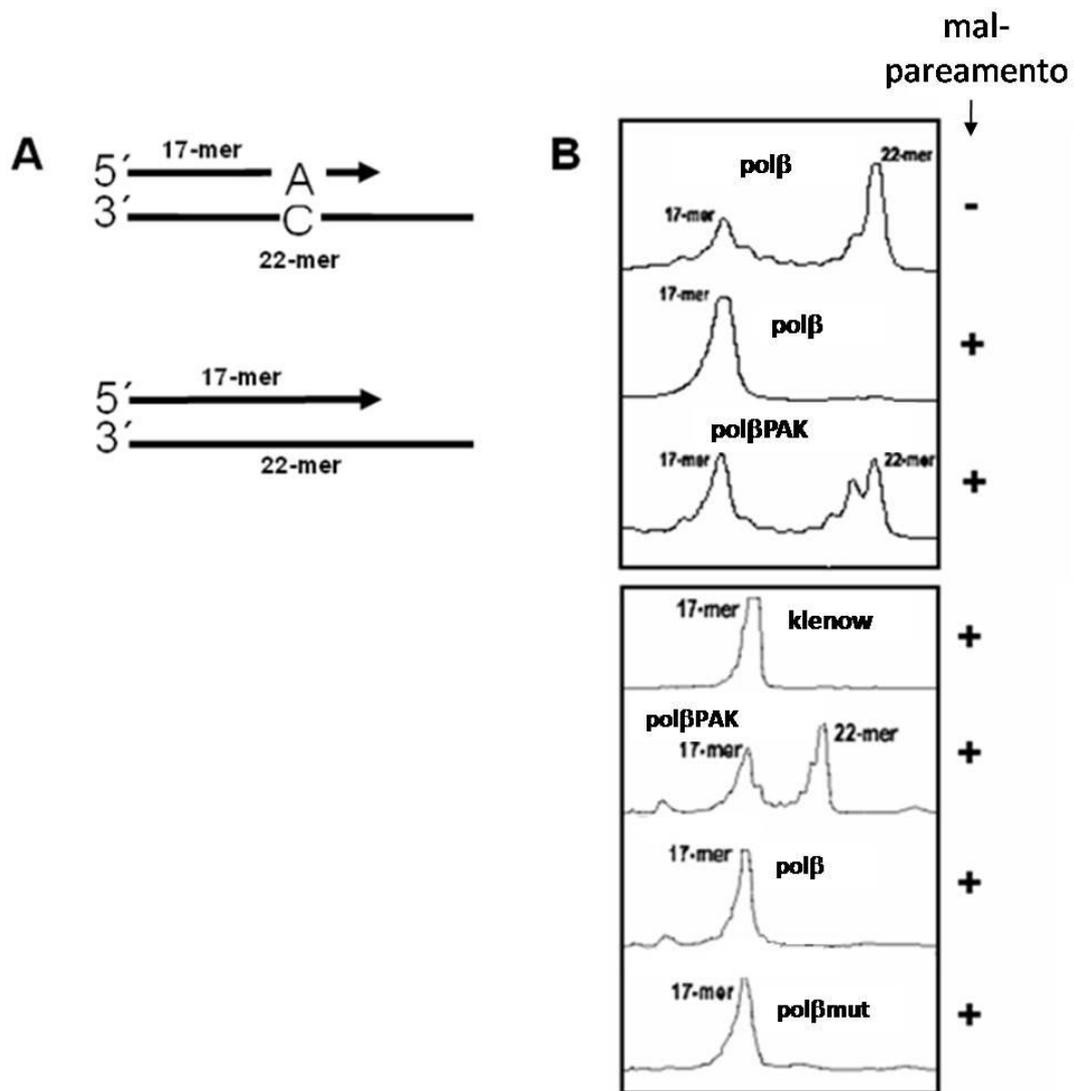
**Figura 9 - Ensaio de extensão de iniciador in vitro para a polβmut na presença de 8oxoG**

Síntese de DNA em um oligonucleotídeo contendo 8oxoG. **A**, representação esquemática do oligonucleotídeo contendo a lesão anelado ao primer M13. **B**, Padrão de picos obtidos em um sequenciador automático para os ensaios de extensão de primer na presença de 8oxoG. As proteínas recombinantes polβ e polβPAK de *T. cruzi* e a polβ com reversão do resíduo de fenilalanina para tirosina na posição 395 (indicadas acima de cada fluorograma) foram incubadas separadamente com 50nM de cada uma das construções em condições ótimas de polimerização a 37°C durante 30 minutos.

Foram realizados também ensaios de extensão do primer M13 na presença de um substrato contendo um erro de mal-pareamento adenina:citosina (Figura 10-A). Na ausência de mal-pareamento, a pol $\beta$  é capaz de estender completamente o iniciador pela presença de um pico de 22-mer (Figura 10-B, fluorograma 1). A pol $\beta$  recombinante não é capaz de sintetizar DNA na presença do mal pareamento, atividade que foi realizada pela pol $\beta$ PAK (Figura 10-B, fluorogramas 2 e 3 respectivamente) sendo que as duas proteínas foram utilizadas como controle experimental. O fragmento de Klenow (Promega, EUA) foi utilizado também como controle negativo da reação (Figura 10-B, fluorograma 4). Os resultados mostraram que a pol $\beta$ mut com reversão do resíduo foi incapaz de estender o primer pela ausência no fluorograma de um pico correspondente a um fragmento de 22-mer correspondente a completa extensão do primer M13 (Figura 10-B, fluorograma 7). Este resultado mostra que o resíduo de fenilalanina 395 não é responsável por conferir a pol $\beta$  de *T. cruzi* a incapacidade de realizar síntese de DNA na presença de mal-pareamentos.

#### **4.2 - Ensaio de atividade de liase para pol $\beta$ e pol $\beta$ PAK**

A atividade de liase da pol $\beta$  é importante na remoção do resíduo de desoxirribose fosfato que é gerado após a atividade da endonuclease APE1 na via curta do BER (Sobol et al. 2000). O prosseguimento do reparo depende da correta remoção do resíduo de dRP pela pol $\beta$ . A demonstração de atividade de liase se justifica por ser uma forte evidência da participação desta enzima no reparo por excisão de bases através da via curta, já que as evidências anteriores indicaram que a pol $\beta$  não é capaz de realizar



**Figura 10 - Ensaio de extensão de iniciador in vitro para polβmut na presença de mal-pareamento do tipo adenina:citosina**

**A**, desenho esquemático do oligonucleotídeo (22-mer) anelado a *primer* M13 (17-mer) (presença de mal-pareamento) e anelamento controle. **B**, fluorogramas obtidos em um seqüenciador automático ALF. Os símbolos (-) indicam o substrato sem o mal-pareamento, enquanto o símbolo (+) indica presença.

síntese translesão. Em tripanossomatídeos, experimentos que demonstram a atividade de liase já foram realizados apenas para proteínas recombinantes provenientes de *T. brucei* (Saxowsky et al. 2003) e *C. fasciculata* (Saxowsky et al. 2002), mas ainda não existem evidências desta atividade para a pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi*.

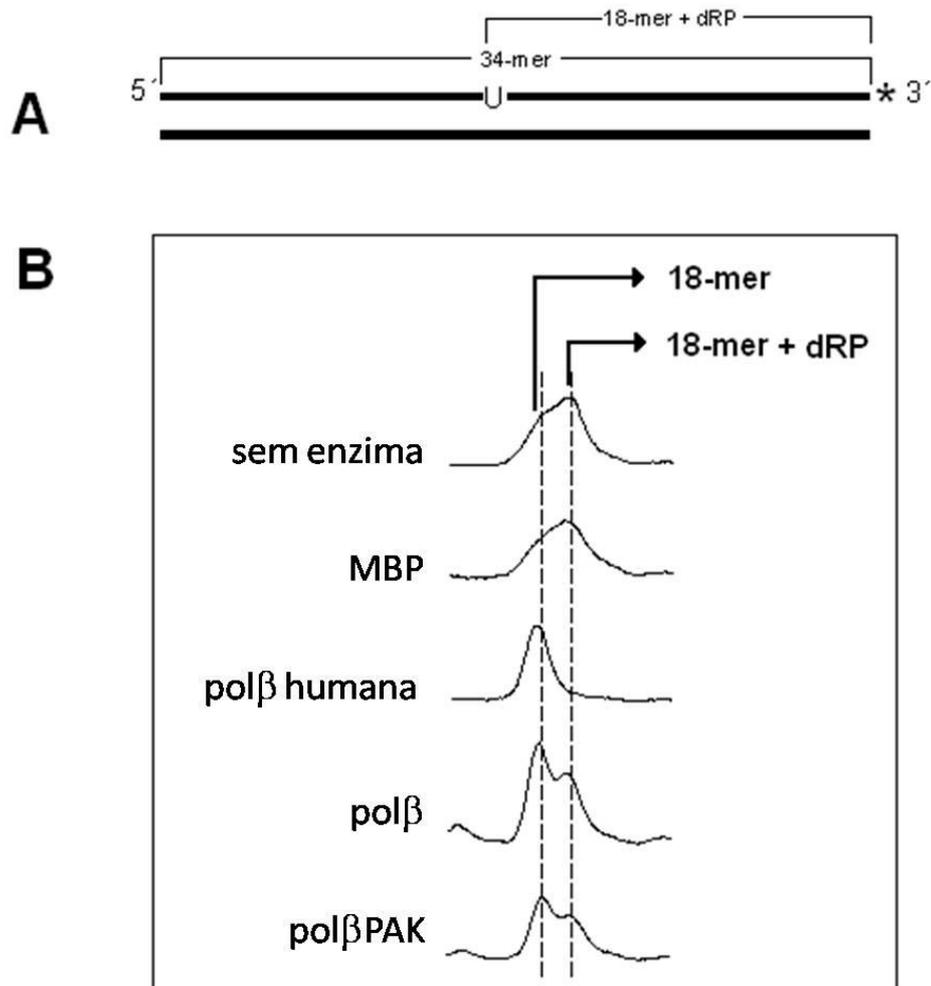
A estratégia utilizada para verificar a presença de atividade de liase constou da incubação da proteína recombinante purificada com uma construção contendo o substrato normalmente reconhecido pela polimerase durante o BER e contendo um resíduo de dRP (Figura 11-A). Para obtenção deste substrato, dois oligonucleotídeos foram anelados, sendo que um deles continha uma uracila e era marcado com o fluoróforo Cy5 em sua extremidade 3' ao invés de marcação radioativa que vem sendo rotineiramente utilizada em ensaios desta natureza. O tratamento destes oligonucleotídeos anelados com uma glicosilase gerou um intermediário abásico que foi incubado com uma endonuclease específica que clivou o fragmento a 5' da lesão, originando um intermediário do BER que pôde ser reconhecido pela pol $\beta$ . A remoção do resíduo pela enzima (atividade de liase) libera o dRP do fragmento de 18 bases, que aparece como um pico menor após processamento da amostra caso a enzima seja capaz de removê-lo. Como mostra a Figura 11-B, detectamos a atividade de liase para ambas polimerases de *T. cruzi* testadas. A pol $\beta$  humana (Trevigen, EUA) foi utilizada como controle positivo e mostrou uma eficiência maior na remoção do resíduo de dRP em comparação com as enzimas de *T. cruzi*. Não houve processamento significativo do fragmento nas amostras sem enzima e na presença de MBP durante o tempo de incubação das amostras. Estes resultados sugerem fortemente participação da pol $\beta$  e

pol $\beta$ PAK de *T. cruzi* em via de reparo de DNA, possivelmente num BER de natureza mitocondrial.

### 4.3 - Geração de *T. cruzi* superexpressando a pol $\beta$

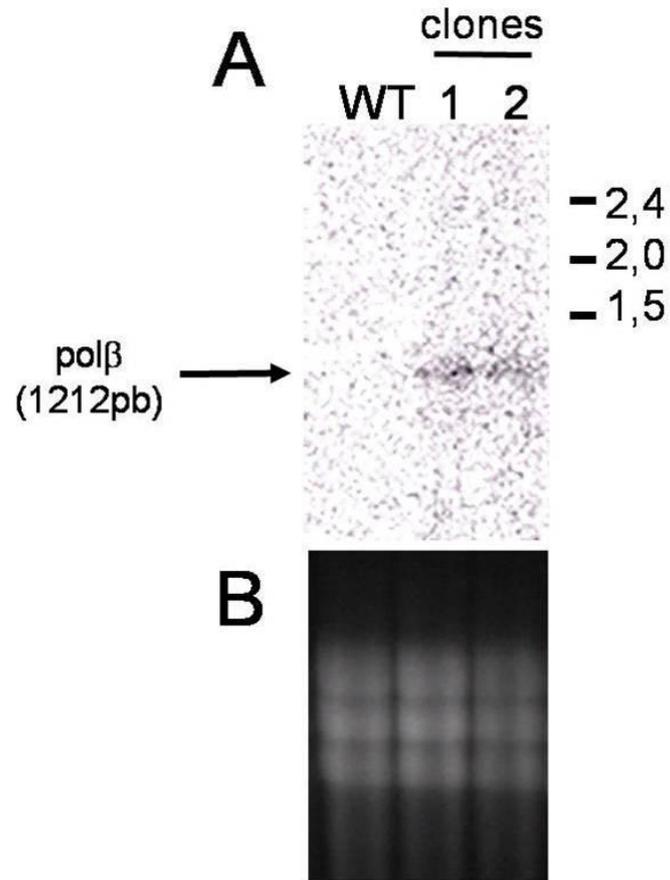
Os resultados anteriores sugerem que a pol $\beta$  de *T. cruzi* está envolvida no BER. Para continuar o estudo da proteína em ensaios *in vivo* decidimos analisar o fenótipo de parasitos expressando a pol $\beta$  em níveis mais elevados. Para geração de células superexpressoras, um dos alelos da pol $\beta$  do clone CL Brener de *T. cruzi* (derivado de uma cepa híbrida) foi subclonado no vetor integrativo pROCK (DaRocha et al. 2004). Este vetor permite uma alta expressão do gene clonado favorecida por sequências derivadas do promotor ribossomal TcP2 $\beta$  e da região 5' UTR do gene de GAPDH (ANEXO I). Além disso, possui uma parte do gene de  $\beta$ -tubulina para integração do vetor, por recombinação homóloga, no genoma do parasito. Após seleção de transfectantes com neomicina em meio líquido e isolamento de clones em meio sólido Agar-sangue, realizamos ensaio de *Northern Blot* (Figura 12-A) para verificar a superexpressão do mRNA da pol $\beta$  em dois clones escolhidos aleatoriamente, denominados *clones 1 e 2*. Verificamos um aumento dos níveis de mRNA mensageiro de pol $\beta$  nos dois clones em comparação com células transfectadas com o plasmídeo pROCK sem inserto (controle experimental).

Os clones obtidos também foram caracterizados quanto à capacidade de expressarem um nível maior de mRNA para pol $\beta$  através de ensaios de transcrição reversa dos RNAs mensageiros seguida de uma PCR semi-quantitativa para o gene em



**Figura 11 - Ensaio de liase para a pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi***

**A**, representação esquemática do dúplice de DNA utilizado como substrato para tratamento seqüencial com UDG e APE1. O asterisco indica marcação com Cy5. 18-mer+dRP indica o tamanho esperado do produto após remoção da uracila pela UDG e clivagem a 5' do sítio AP pela APE1. **B**, fluorogramas representando os picos detectados após incubação com as proteínas. A primeira e a segunda linhas tracejadas verticais indicam a posição estimada dos picos de 18-mer e 18-mer+dRP, respectivamente. Os produtos de reação foram separados em SDS-PAGE 20% e analisados em um seqüenciador automático ALF.

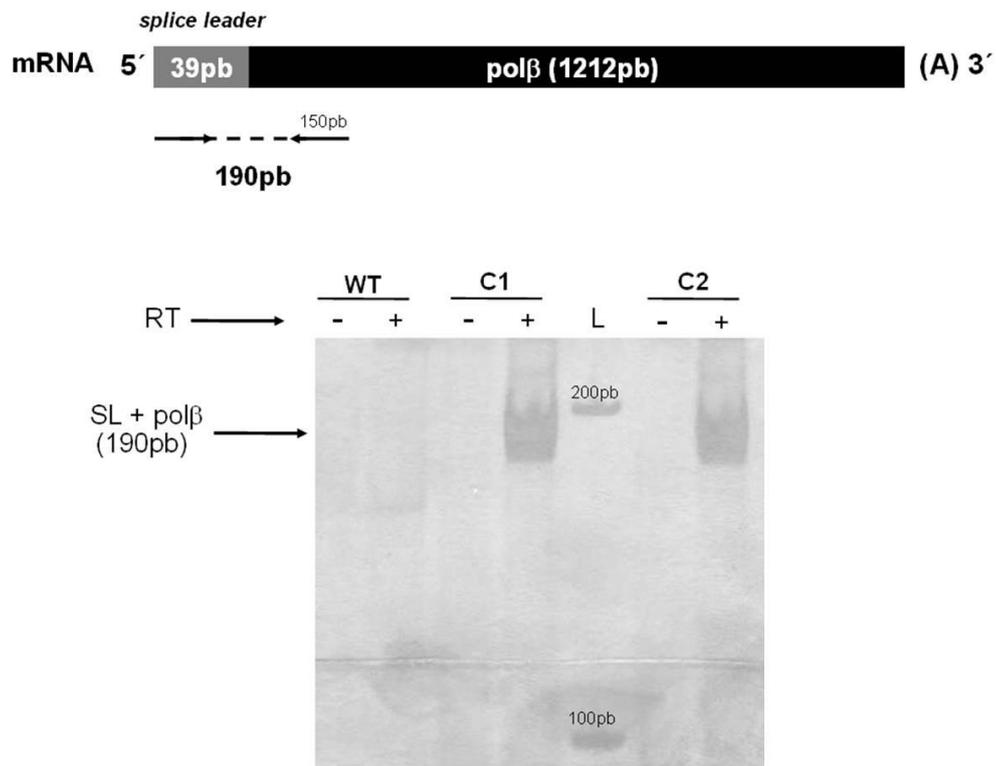


**Figura 12 - Ensaio de *Northern blot***

O ensaio utilizou RNA total de epimastigotas transfectados com plasmídio pROCK vazio e contando o gene da polbeta. **A**, a hibridação foi realizada em RNA total das cepas CL Brener WT e clones C1 e C2. Os números à direita correspondem à posição relativa e aos tamanhos, em quilobases, dos RNAs ribossomais 18s, 24s $\alpha$  e 24s $\beta$ . **B**, a quantidade similar de RNA aplicada no gel de agarose pode ser visualizada pela coloração com brometo de etídio.

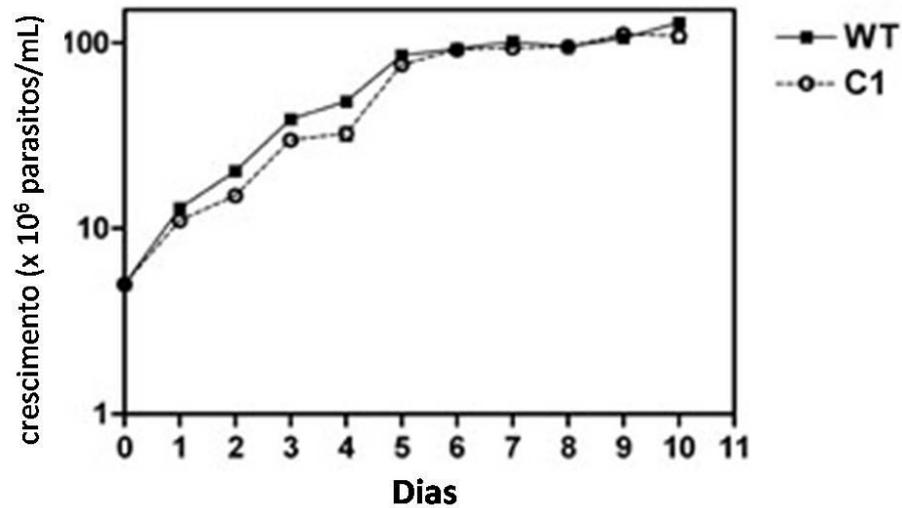
questão. Para tanto, foi realizada a extração do RNA total dos dois clones e das células controle, seguida de transcrição reversa dos mensageiros. Com o cDNA em mãos, realizou-se uma PCR com *primer forward* para anelamento na região de *splice leader* (localizado na extremidade 5' do mensageiro) e *reverse* específico com anelamento a 150 bases abaixo do códon de iniciação do gene da pol $\beta$  (Figura 13-A). Também foram incluídos controles negativos que consistiram na realização da PCR em amostras que não receberam transcriptase reversa, isto é, na ausência de cDNAs que pudessem ser parcialmente amplificados pela reação de PCR. Os resultados mostram a presença de uma banda de 190pb nas amostras correspondentes aos clones 1 e 2, indicando níveis elevados de mRNA para o gene da pol $\beta$  (Figura 13-B). Não foi possível visualizar este fragmento para o mRNA endógeno extraído de células controle. Também não foi detectada a banda nas amostras que não receberam transcriptase reversa (Figura 13-B, amostras RT-), o que era esperado pela inexistência de cDNA nestas amostras. Estes resultados reforçam os dados obtidos do *Northern Blot* de que os clones 1 e 2 possuem níveis maiores de mRNA para o gene da pol $\beta$  em relação às células controle.

De posse dos dois clones, foi verificado se haveria alguma alteração no crescimento dos clones em relação ao controle através de uma curva de crescimento envolvendo o controle e o clone 1. Estabelecemos as culturas para uma concentração inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL e procedemos com a contagem das células a cada 24 horas durante 10 dias (Figura 14). Os dados mostraram que a superexpressão da pol $\beta$  não influenciou o ciclo celular das células transfectadas, resultando no crescimento normal das culturas.



**Figura 13 - RT-PCR semi-quantitativa para o mRNA de polβ nos clones superexpressores**

**A**, desenho esquemático mostrando o anelamento dos primers *forward* e *reverse* para geração de um fragmento esperado de 190pb por PCR. **B**, gel de poliacrilamida 8% corado pelo método da prata. RT, transcriptase reversa; WT, *wild type*; C1, clone 1; C2, clone 2; L, padrão 1Kb.



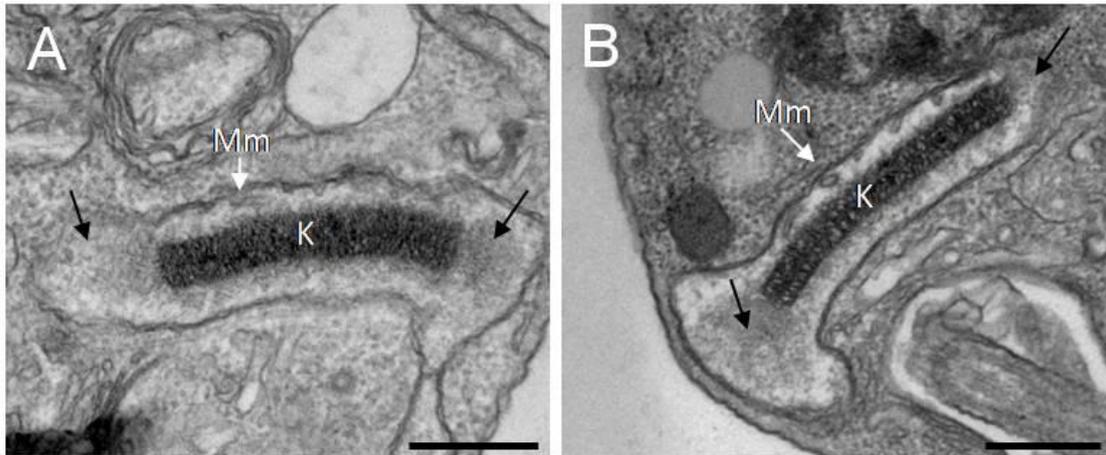
**Figura 14 - Curva de crescimento de células controle e superexpressora de pol $\beta$**

A curva foi estabelecida para uma densidade inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL tanto para as células controle transfectadas com o plasmídeo pROCK vazio (WT) quanto para o clone 1 (C1). As amostras foram apropriadamente diluídas em meio PBS 1X suplementado com o corante vital eritrosina e contadas em câmara de Neubauer durante 10 dias. As barras indicam o desvio padrão.

Também verificamos se a superexpressão da pol $\beta$  poderia interferir na morfologia do cinetoplasto, da mitocôndria e de estruturas associadas. Células controle e superexpressoras foram contrastadas e emblocadas adequadamente para visualização em microscopia eletrônica de transmissão. As imagens não revelaram diferenças ultraestruturais significativas entre as células testadas (Figura 15) já que a integridade da membrana mitocondrial e do cinetoplasto se apresentaram normais. Além disso, a superexpressão da polimerase também não modificou a morfologia dos sítios antipodais do cinetoplasto que se mostraram normalmente posicionados.

#### **4.4 - Curva de sobrevivência na presença de AZT**

Foi verificado que formas amastigotas de *T. cruzi* são sensíveis ao tratamento com 3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-monofosfato (AZT), um análogo de bases pirimidínicas terminador de cadeia, isto é, capaz de impedir a elongação do DNA por polimerases dependentes de molde (Nakajima-Shimada and Aoki 1998). Em sua tese de doutorado, o aluno Carlos Gustavo Régis da Silva mostrou uma inibição gradativa da síntese de DNA *in vitro* realizada pela pol $\beta$  de *T. cruzi* recombinante à medida que se aumentava a concentração de AZT na reação, sugerindo que esta enzima pode ser uma das polimerases responsáveis pela incorporação seletiva do análogo tóxico *in vivo* neste organismo. De posse dos clones superexpressores de pol $\beta$ , realizamos ensaios *in vivo* envolvendo tratamento com AZT para uma melhor avaliação do envolvimento desta DNA polimerase tanto em processos de replicação quanto de reparo de DNA, comparando a resposta com células controle. Os parasitos cresceram por 48 horas em meio LIT suplementado com AZT, sendo seguido pela contagem das células. O resultado mostrou uma densidade menor de células nos clones



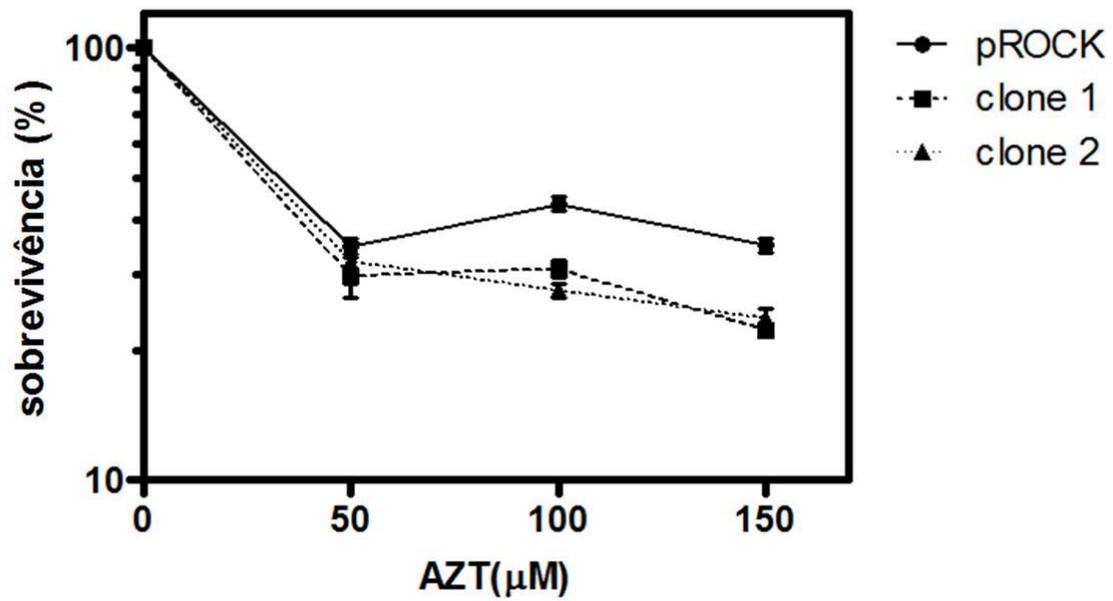
**Figura 15 - Análise ultraestrutural do cinetoplasto de *T. cruzi* superexpressando a pol $\beta$**   
**A**, epimastigotas controle transfetados com o plasmídeo vazio e **B**, células superexpressoras de pol $\beta$  (clone 1) foram visualizadas através de microscopia eletrônica de transmissão. As setas pretas apontam para as regiões dos sítios antipodais. K indica cinetoplasto e Mm indica membrana mitocondrial. Barra=0,5 $\mu$ M.

superexpressores após o tratamento em comparação com o controle nas doses de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de AZT (Figura 16). Em conjunto com os resultados de Regis-da-Silva, estes dados sugerem que a pol $\beta$  é capaz de incorporar AZT e portanto pode interferir no processo de replicação celular

#### **4.5 - Localização celular da pol $\beta$ de *T. cruzi* em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas**

Os resultados obtidos após tratamento com AZT nos motivou a verificar melhor o envolvimento da pol $\beta$  de *T. cruzi* na replicação e no reparo do DNA. Em eucariotos, a pol $\beta$  é descrita como uma enzima nuclear que participa primariamente do reparo por excisão de bases pelas vias curta e longa (Asagoshi et al. 2009). Em tripanossomatídeos, contudo, dois padrões de localização sub-celular foram descritos, sendo primariamente mitocondrial em *T. brucei* e *C. fasciculata* (Saxowsky et al. 2002; Saxowsky et al. 2003) e nuclear em *L. infantum* (Taladriz et al. 2001). Os estudos de localização sub-celular descritos para membros da ordem kinetoplastida não exploraram a possibilidade de haver diferenças na localização entre as formas do parasito. Decidimos determinar a localização sub-celular da pol  $\beta$  nas duas formas *replicativas* de *T. cruzi* (epimastigota e amastigota) e na forma sanguínea *não-replicativa* (tripomastigota) encontrada nos hospedeiros vertebrados incluindo o homem.

Uma primeira abordagem foi tentar localizar a proteína através da clonagem da ORF completa do gene da pol $\beta$  em fusão com o gene de GFP no plasmídio pTREX (Teixeira and daRocha 2003). Confirmamos a clonagem da proteína por seqüenciamento e preparamos o DNA plasmidiano para transfecção de epimastigotas

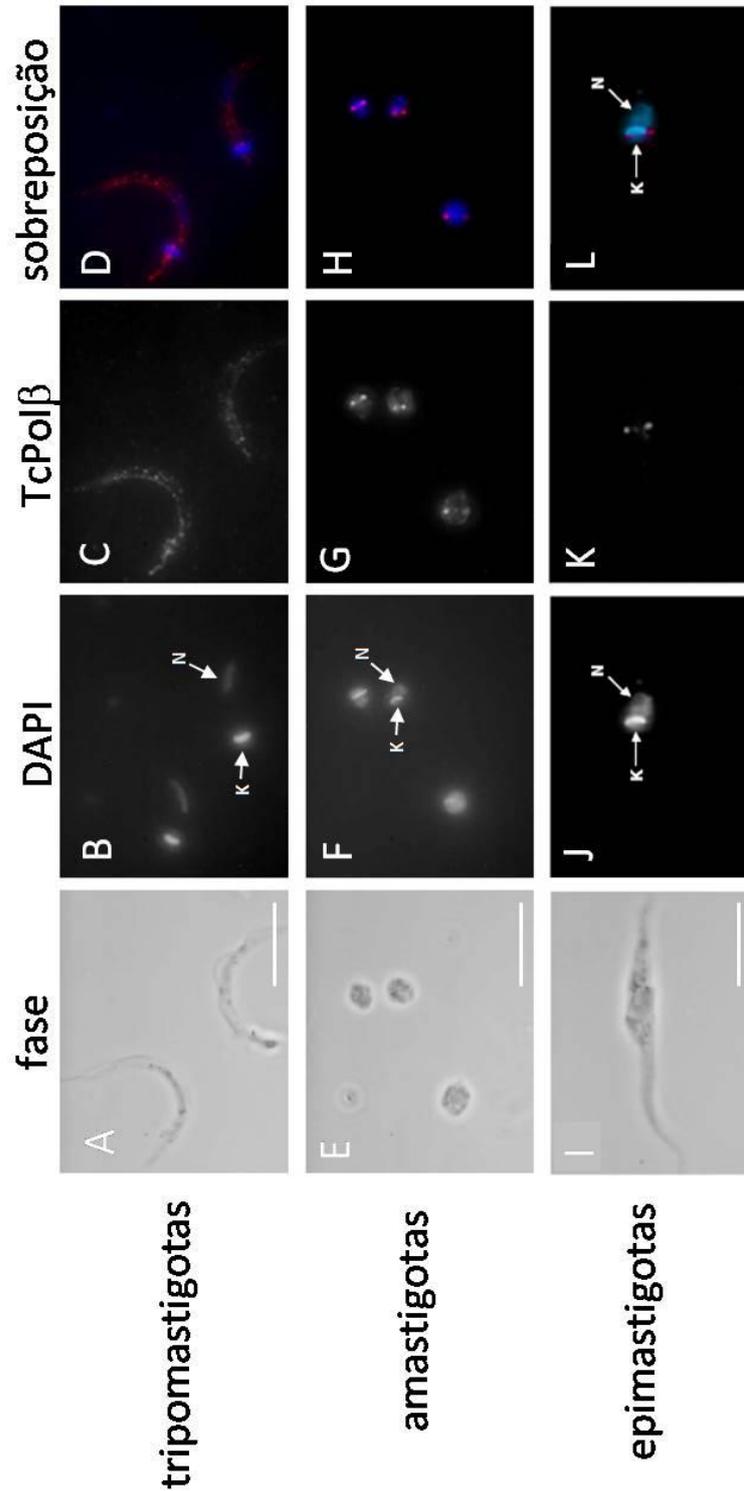


**Figura 16 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de polβ ao AZT**

Parasitos em fase exponencial de crescimento transfectados com o plasmídio pROCK vazio (●) e os clones 1 (■) e 2 (▲) foram expostos a 50, 100 e 150 μM de AZT. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

da cepa CL-Brener em fase exponencial de crescimento. Após um período de 24 horas, não fomos capazes de determinar a localização precisa da pol $\beta$  através desta estratégia. Após várias tentativas, verificamos que a taxa de transfecção foi baixa (menor que 1% dos parasitos puderam ser detectados com fluorescência interna), embora a transfecção com plasmídeo pTREXGFP tenha gerado parasitos verdes numa taxa mais alta. Além disso, não houve um padrão celular definido e constante dentre os poucos parasitos que mostraram alguma fluorescência decorrente da excitação da proteína GFP associada à pol $\beta$ , o que impossibilitou a localização da polimerase através desta estratégia.

Decidimos então localizar a pol $\beta$  nas três formas principais encontradas no ciclo de vida de *T. cruzi* utilizando anticorpo policlonal anti-pol $\beta$  cedido pelo ex-aluno de doutorado Carlos Gustavo Régis da Silva. Verificamos concentração da proteína nas duas regiões correspondentes aos sítios antipodais do cinetoplasto em amastigotas e epimastigotas, que possuem potencial replicativo (Figura 17, H e L respectivamente). De modo distinto, este padrão não foi observado em formas tripomastigotas intracelulares, que são formas não-replicativas do parasito. Ao invés de se localizar no cinetoplasto, a polimerase se mostrou difusa por todo o corpo celular, provavelmente no interior da mitocôndria única e ramificada característica desta espécie (Figura 17, D). Em todos os experimentos, os padrões observados tanto para formas replicativas e a forma não-replicativa corresponderam a dados observados em mais de 90% dos parasitos presentes na lâmina. Este resultado sugere fortemente a ocorrência de um envolvimento coordenado da polimerase beta durante o ciclo de vida de *T. cruzi*.



**Figura 17 -** Imunolocalização da polbeta em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*

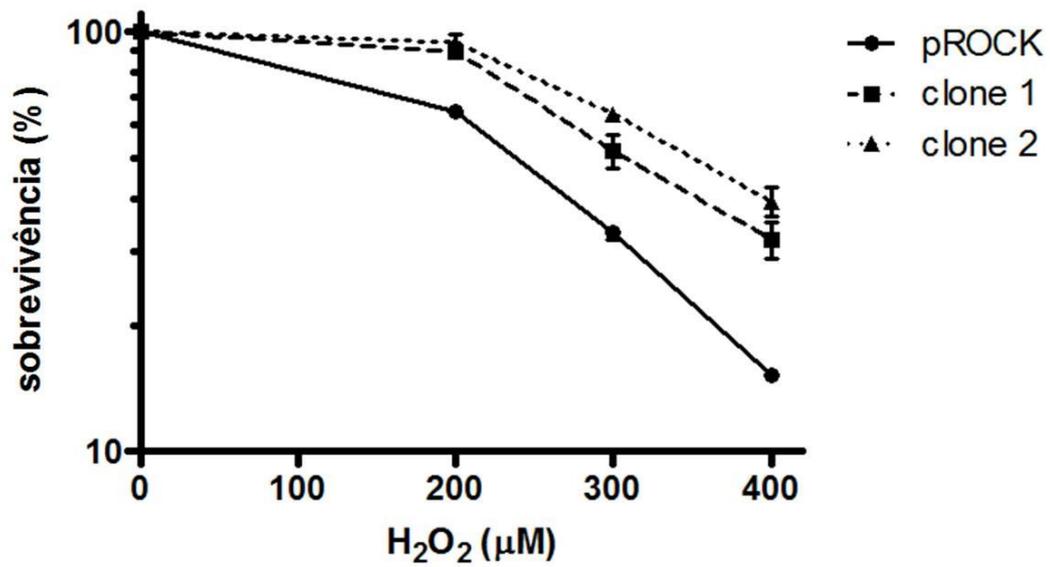
Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (I-L), amastigotas extracelulares (E-H) e tripomastigotas (A-D) foram incubadas com anticorpo IgG policlonal anti-pol $\beta$ . O núcleo (N) e o cinetoplasto (K) foram contracorados com DAPI. Barra = 5  $\mu$ m.

#### **4.6 – Curva de sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio**

O resultado obtido envolvendo a localização da pol $\beta$  nas três formas encontradas no ciclo celular de *T. cruzi* sugere participação da polimerase na replicação do kDNA. Para melhor investigar o papel da pol $\beta$  na célula, os clones superexpressores foram avaliados quanto ao papel do BER neste organismo no reparo de lesões de natureza oxidativa. Comparamos a resposta dos clones superexpressores e das células controle após tratamento com diversas concentrações do agente oxidativo peróxido de hidrogênio que é capaz de gerar 8oxoG no DNA (Slupphaug et al. 2003). Após um período de 48 horas, células superexpressando pol $\beta$  em fase exponencial ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) de crescimento mostraram maior resistência ao tratamento quando comparadas às células controle nas três concentrações testadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 18). Assim, este resultado indica um envolvimento desta DNA polimerase no reparo de lesões oxidativas no kDNA de células epimastigotas, provavelmente através da via de BER.

#### **4.7 - Curva de sobrevivência na presença de metoxiamina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Para verificar se a maior sobrevivência observada para os clones superexpressando a pol $\beta$  após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era devido a uma maior atividade do BER, realizamos uma curva de sobrevivência na presença de metoxiamina (MX). A MX é um reagente sintético que reage com o grupamento aldeído presente em sítiosapurínicos/apirimidínicos, fazendo com que este se torne refratário ao processo de beta-eliminação do resíduo de desoxirribose-fosfato que é realizado pela pol $\beta$  durante o BER. Já que o MX é considerado um agente que bloqueia especificamente esta via de reparo (Liuzzi and Talpaert-Borle 1985; Rosa et al. 1991; Horton et al. 2000), decidimos

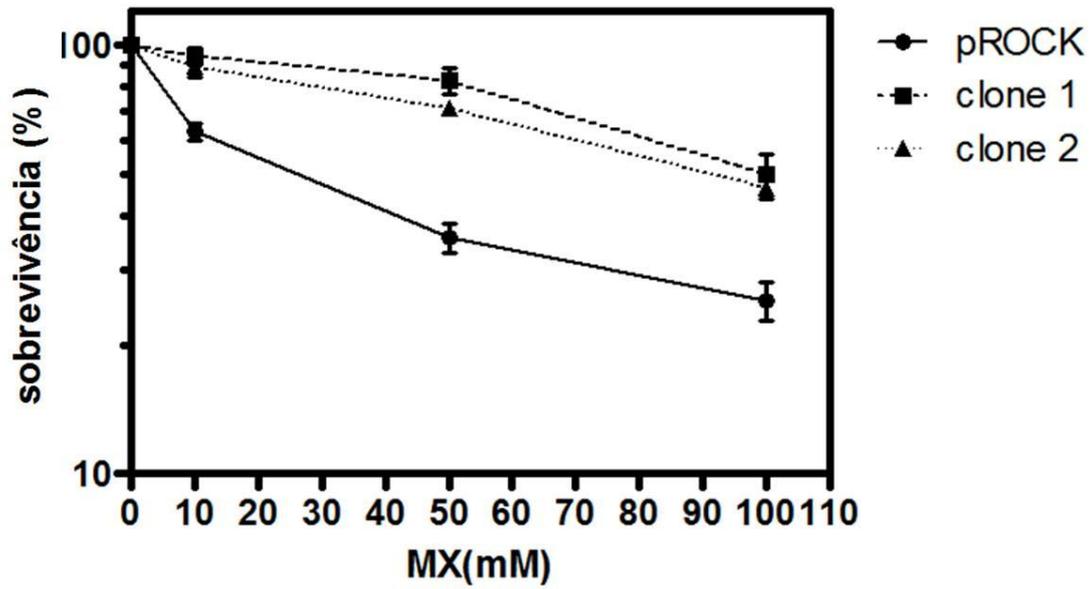


**Figura 18 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de polβ em fase exponencial de crescimento ao peróxido de hidrogênio**

Parasitos transfectados com o plasmídeo pROCK vazio (●) e os clones 1(■) e 2 (▲) foram expostos a 200, 300 e 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

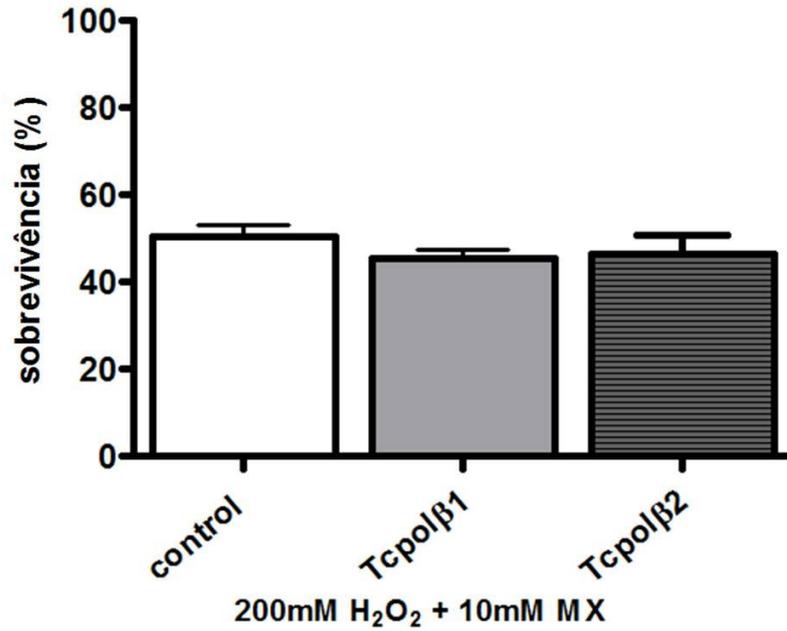
verificar a influência da pol $\beta$  na resposta das células superexpressoras em comparação com células controle após 48 horas de incubação em diferentes doses de MX. A curva obtida mostrou que a superexpressão da polimerase favoreceu significativamente uma menor taxa de morte celular nas três doses testadas de MX quando comparado às células controle que não a superexpressam (Figura 19).

Uma fração significativa dos danos genotóxicos causados pelo peróxido de hidrogênio são reparados majoritariamente pela via do BER, que tem as atividades de liase e de polimerase realizadas pela pol $\beta$  como fatores limitantes da via. Decidimos verificar se o aumento da resistência ao peróxido de hidrogênio mostrado pelas células supererxpressoras era devido a uma maior estimulação do BER nestas células. Para tanto, as células foram incubadas na presença de diferentes doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suplementadas com uma dose constante de MX. Foi verificado que o duplo tratamento aumentou e homogeneizou a taxa de morte em todas as células testadas em fase exponencial de crescimento (Figura 20). Aqui uma concentração baixa de 10mM de MX foi capaz de sensibilizar células superexpressoras, elevando o nível de morte celular quando comparado ao tratamento somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na mesma dose de 200  $\mu$ M (ver Figura 19). Este aumento também foi pronunciado em células controle. Estes resultados mostram que o composto MX é capaz de sensibilizar tanto células superexpressoras e células controle em fase exponencial de crescimento, aumentando a morte celular e mostrando que a superexpressão da pol $\beta$  está influenciando especificamente a via do BER.



**Figura 19 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de polβ em fase exponencial de crescimento à metoxiamina**

Parasitos transfectados com o plasmídeo pROCK vazio (●) e os clones 1 (■) e 2 (▲) foram expostos a 10, 50 e 100 mM de MX. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

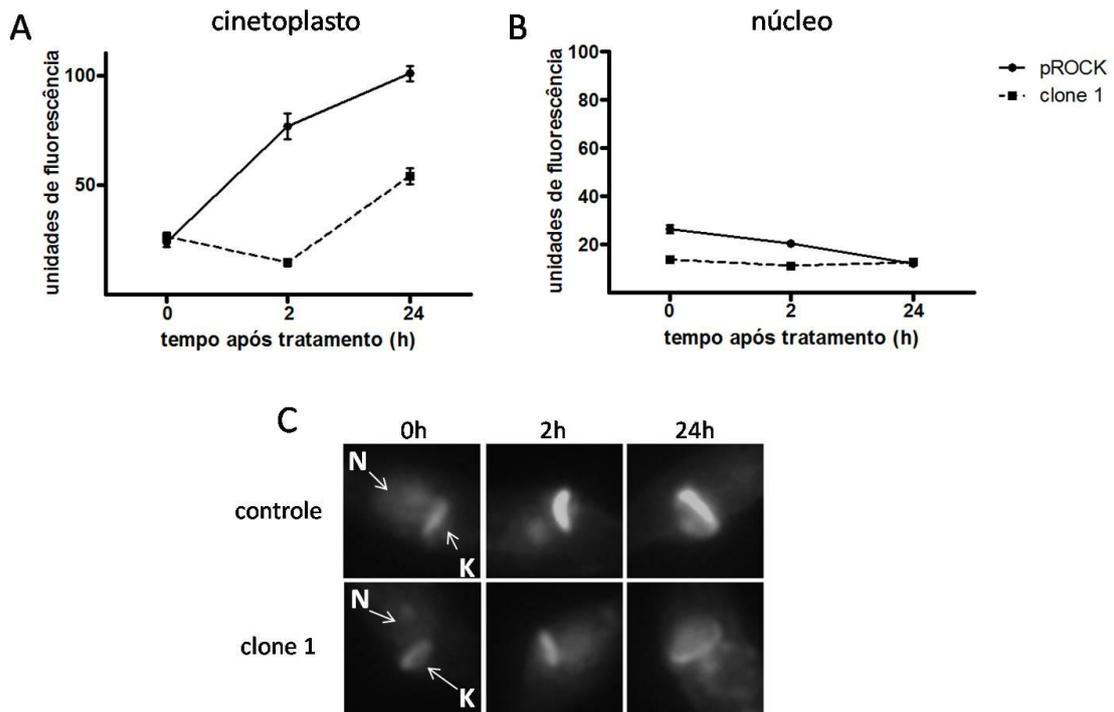


**Figura 20 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de pol $\beta$  ao peróxido de hidrogênio e metoxiamina**

Parasitos transfectados com o plasmídio pROCK vazio (barra branca) e os clones 1 (barra cinza) e 2 (barra listrada) foram expostos a 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10mM de MX. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

#### **4.8 - Ensaio de reparação de 8oxoG no cinetoplasto de *T. cruzi* superexpressando a polimerase beta**

Os resultados provenientes dos dados obtidos *in vivo* utilizando agentes genotóxicos de natureza oxidativa como o peróxido de hidrogênio indicam a atividade de um BER mitocondrial definido em *T. cruzi*. Uma forma indireta para verificação qualitativa da eficiência de vias de reparo celular se dá pela investigação dos níveis de dano utilizando anticorpos específicos para as lesões (Asagoshi et al. 2009; Jansen et al. 2009). Outra estratégia envolve a utilização de conjugados moleculares que também foram avaliados como específicos para lesões no DNA, como no caso da avidina que mostrou afinidade específica para 8oxoG (Struthers et al. 1998). Foi de nosso interesse verificar um acúmulo diferenciado de 8oxoG no cinetoplasto de células superexpressoras de pol $\beta$ . Para tanto, as células foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o nível de oxoguanina foi quantificado seguindo protocolo que utiliza um conjugado molecular FITC-avidina. Após tratamento das células com peróxido de hidrogênio, observamos uma evidente diminuição do sinal do FITC no cinetoplasto de células superexpressoras, enquanto que as células controle mostraram um nível maior de fluorescência nesta mesma estrutura (Figura 21-A). Duas horas após o tratamento, verificamos um decaimento do nível de fluorescência no cinetoplasto do clone 1, ao mesmo tempo em que este nível aumenta nas células controle. Após 24 horas houve um aumento dos níveis da fluorescência tanto no clone quanto no controle, em taxa similar. Contudo a diferença do nível de fluorescência nuclear para as células testadas foi menor do que aquela vista no cinetoplasto (Figura 21-B). Este resultado sugere uma manutenção mais controlada da lesão no cinetoplasto de células superexpressoras de pol $\beta$ .



**Figura 21 - Análise do acúmulo de 8oxoG no cinetoplasto e no núcleo de epimastigotas superexpressando pol $\beta$**

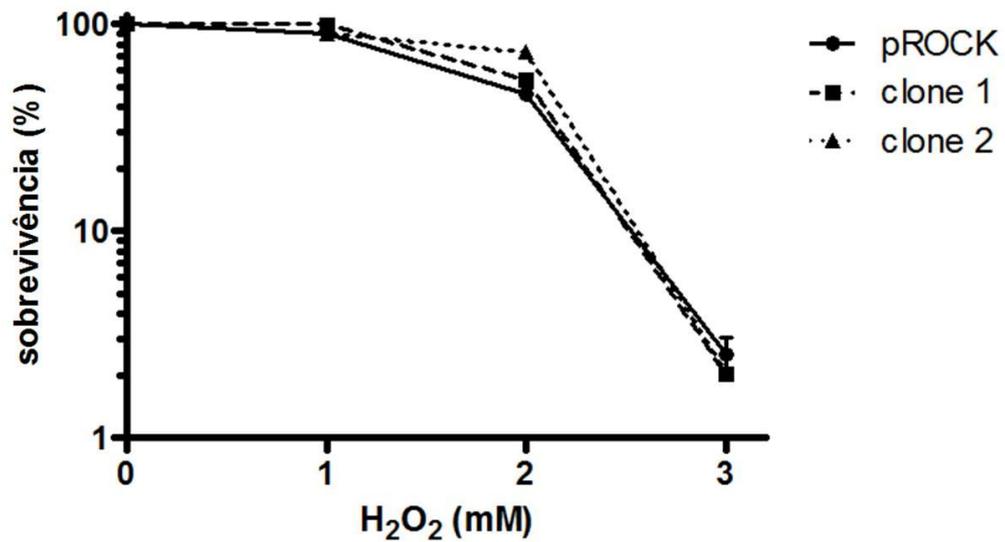
Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram tratados com 200 $\mu$ M de peróxido de hidrogênio (ver Material e Métodos) e incubados com avidina conjugada a FITC por 1h. A fluorescência foi quantificada utilizando programa ImageJ ([HTTP://rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/)). As curvas obtidas em **A** (cinetoplasto) e **B** (núcleo) representam as médias e desvios padrão de 25 quantificações. Em **C** estão mostradas figuras representativas das células controle e superexpressando pol $\beta$  (clone 1) nos tempos pós-tratamento.

#### **4.9 - Curva de sobrevivência de células em fase estacionária de crescimento na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O resultado de maior sobrevivência das células superexpressoras de pol $\beta$  frente ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado utilizando epimastigotas em fase exponencial de crescimento ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL). Contudo, decidimos avaliar esta mesma resposta em células em fase estacionária de crescimento ( $1 \times 10^8$  parasitos/mL). Nesta situação não observamos um favorecimento na multiplicação de células superexpressoras em relação às células controle (Figura 22), não havendo diferenças significativas entre os valores de concentração celular verificados para os clones e células controle em todas as doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testadas. Além disso, células nesta condição se mostraram mais resistentes ao tratamento e toleraram doses mais elevadas de peróxido de hidrogênio. Este resultado sugere que o BER, representado pela atividade da pol $\beta$ , não está muito atuante no reparo de lesões oxidativas induzidas em células em fase estacionária e com potencial replicativo baixo.

#### **4.10 - Localização sub-celular da pol $\beta$ em epimastigotas tratados com peróxido de hidrogênio**

Nossos resultados mostraram localização estrita da pol $\beta$  de *T. cruzi* nos sítios antipodais do cinetoplasto em células replicativas como epimastigotas e amastigotas, nas quais deve estar participando de processos de replicação do DNA (Lopes Dde et al. 2008). Este envolvimento provavelmente também está relacionado ao metabolismo celular basal de minicírculos e maxicírculos nestas regiões, reparando e preenchendo os *gaps* entre os fragmentos de Okasaki resultantes da replicação destes círculos e



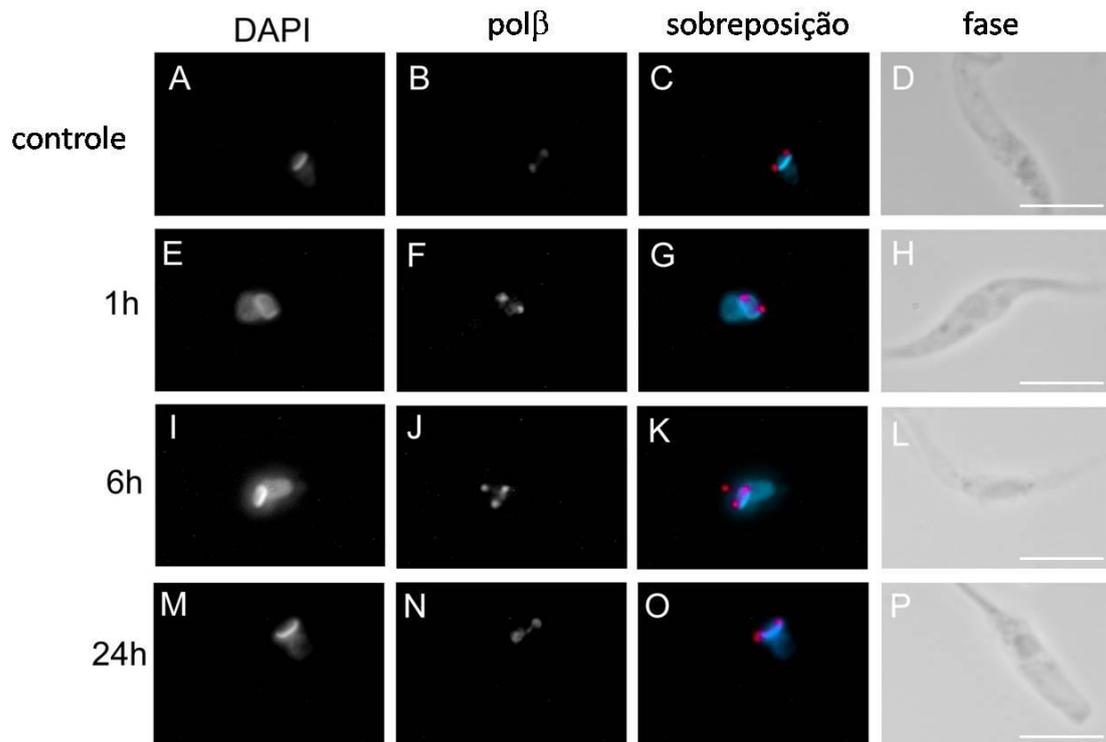
**Figura 22 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de polβ em fase estacionária de crescimento ao peróxido de hidrogênio**

Parasitos transfectados com o plasmídio pROCK vazio (●) e os clones 1 (■) e 2 (▲) foram expostos a 1, 2 e 3 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

preparando a rede concatenada para segregação na mitose (Saxowsky et al. 2003). Ainda é escasso o conhecimento acerca do direcionamento sub-celular da pol $\beta$  sob pressão genotóxica oxidativa e se a localização da proteína na célula é modulada por agentes oxidantes. Decidimos tratar epimastigotas selvagens da cepa CL Brener com 150 $\mu$ M de H $_2$ O $_2$  durante 20 minutos e verificar a localização celular da polimerase em diferentes tempos após este tratamento. Constatamos o aparecimento de um terceiro foco bem definido que foi reconhecido pelo anticorpo anti-pol $\beta$  após 6 horas de tratamento com o peróxido de hidrogênio (Figura 23). Este foco se localizou em uma região equidistante dos sítios antipodais, na região anterior do parasito e claramente externa à região do DNA mitocondrial. Estimamos visualmente vários campos da lâmina e constatamos que mais de 90% das células em fase exponencial de crescimento apresentavam esta marcação. Este terceiro ponto não foi observado em células 24 horas após o tratamento. Adicionalmente, este foco não foi observado após tratamento das células com 0,001% de MMS. Este resultado sugere a formação de um foco de reparo de DNA para danos de natureza oxidativa no cinetoplasto de *T. cruzi* após tratamento com agente oxidante.

#### **4.11 - Localização da pol $\beta$ durante o ciclo celular de epimastigotas**

Resolvemos procurar por alterações específicas na localização sub-celular da pol $\beta$  para as formas intermediárias que podem ser identificadas no ciclo de vida de epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Para tanto, utilizamos as informações *tamanho e número de flagelos* presentes na célula e *número de cinetoplastos e de núcleos* como marcadores do ciclo celular. Desta maneira é possível discriminar bem as células e classificá-las apropriadamente como pertencentes às fases G1/S, G2, mitose e



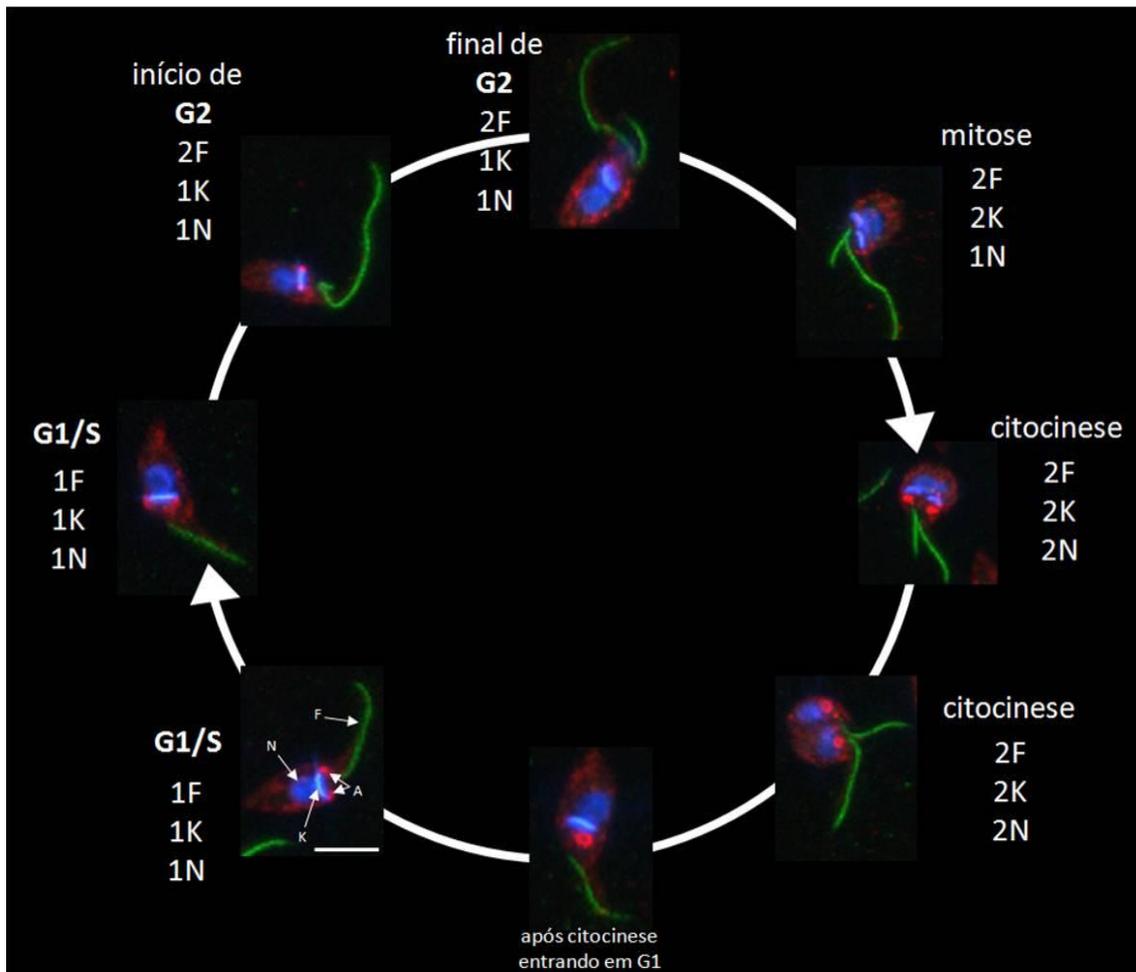
**Figura 23 -** Imunolocalização de polβ em epimastigotas após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os parasitos foram tratados com 150μM de peróxido de hidrogênio e as células foram analisadas após 1h (E-H), 6h (I-L) e 24h (M-P) e comparadas com células não tratadas (A-D). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon E600. Barra = 5μm.

citocinese (Elias et al. 2007). Com esta medida, fomos capazes de recriar o ciclo celular de epimastigotas (Figura 24). Verificamos que durante a fase G1/S a pol $\beta$  se concentrou nos sítios antipodais do cinetoplasto, se mantendo localizada nestes pontos até o início da fase G2, onde ocorre emergência de um segundo flagelo, mas ainda não ocorreram os passos de mitose do cinetoplasto e núcleo. Já no final da fase G2, onde o segundo flagelo se encontra mais desenvolvido, verificamos uma visível diminuição da intensidade da marcação nos sítios antipodais e aumento desta marcação no citoplasma, em forma difusa e em grânulos. Este direcionamento fase-dependente da pol $\beta$  ocorreu, portanto, após a duplicação do material genético celular. *Foci* discretos puderam ser visualizados também durante a mitose, momento no qual coexistem dois cinetoplastos e dois núcleos em processo de segregação para as células filhas, além de um segundo flagelo já bem desenvolvido. Durante a citocinese, ocorre uma diminuição da marcação no citoplasma e retorno da pol $\beta$  para uma região anterior ao cinetoplasto, com agregação da proteína em um ponto bem definido. A morfologia da agregação muda para uma estrutura semelhante a um anel, que provavelmente se desfaz e migra novamente para os pontos nativos dos dois sítios antipodais do cinetoplasto. Esta dinâmica observada para a pol $\beta$  sugere especialização e mudança de função da proteína durante o ciclo celular, o que pode ocorrer também para outras proteínas de reparo.

#### **4.12 - Localização sub-celular da pol $\beta$ em tripomastigotas tratados com peróxido de hidrogênio**

O aparecimento de um foco de reparo em células epimastigotas que estão replicando seu DNA sugere que esta forma celular conta com um mecanismo de



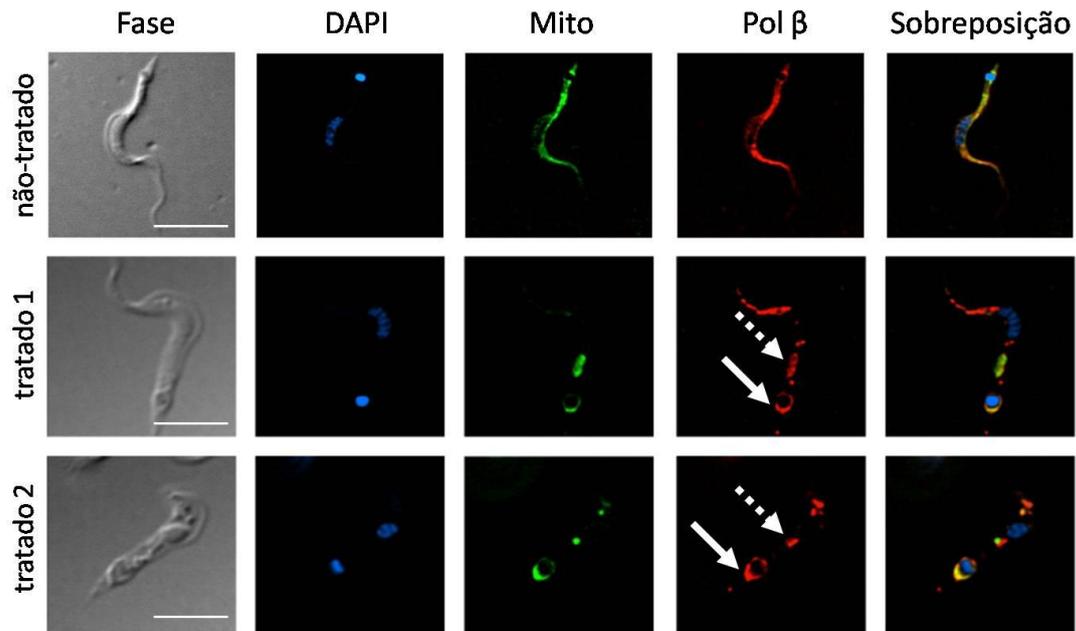
**Figura 24 - Localização da polβ durante diferentes estágios do ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi***

Durante a fase G1/S ocorre concentração da polβ nos sítios antipodais do cinetoplasto, aonde permanece até o início da fase G2. No final da fase G2 há diminuição da intensidade da marcação nos sítios antipodais e aumento desta marcação no citoplasma, em forma difusa e em grânulos. *Foci* discretos são visualizados durante a mitose. Durante a citocinese, ocorre uma diminuição da marcação no citoplasma e retorno da polβ para uma região anterior ao cinetoplasto, com agregação da proteína em um ponto bem definido. A morfologia da agregação muda para uma estrutura semelhante a um anel, que provavelmente se desfaz e migra novamente para os pontos nativos dos dois sítios antipodais do cinetoplasto. Ver item 4.2 para maiores detalhes.

controle adicional envolvendo redirecionamento de uma proteína de reparo de DNA, especificamente uma DNA polimerase. Resolvemos investigar se tal redirecionamento também ocorria em um tipo celular que não se divide como no caso das formas tripomastigotas. Para responder esta pergunta, tratamos células tripomastigotas metacíclicas da cepa Y com 500 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubamos as mesmas com anticorpo anti-pol $\beta$  de *T. cruzi*. Neste experimento foi possível delimitar as regiões da mitocôndria utilizando anticorpo policlonal que reconhece a proteína constitutiva da matriz mitocondrial diidrolipoamida desidrogenase (LipDH) (Lohrer and Krauth-Siegel 1990; Schoneck et al. 1997) gentilmente cedido pelo professor Sérgio Schenkman da UNIFESP/SP. Verificou-se alto grau de colocalização da pol $\beta$  com a proteína LipDH em células não tratadas com o agente genotóxico (Figura 25). Contudo, após 6 horas de tratamento estas células mostraram uma diminuição da extensão da área de colocalização das duas proteínas, mostrando predominância de regiões mais conservadas identificadas entre o núcleo e o cinetoplasto (seta tracejada) e ao redor da região contendo o cinetoplasto (seta contínua). Este resultado mostra a ocorrência de direcionamento subcelular da pol $\beta$  mesmo em tripomastigotas que não têm capacidade de divisão celular.

#### **4.13 - Curva de sobrevivência na presença de metilmetanosulfonato**

Os resultados obtidos indicaram até o momento que a pol $\beta$  de *T. cruzi* está intimamente envolvida em um BER mitocondrial responsável pela manutenção do genoma contido no kDNA contra a ação deletéria de danos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo. Contudo, resolvemos verificar se a resposta dada pela superexpressão também daria vantagem de sobrevivência após tratamento com



**Figura 25 -** Imunolocalização de pol $\beta$  em tripomastigotas extracelulares após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

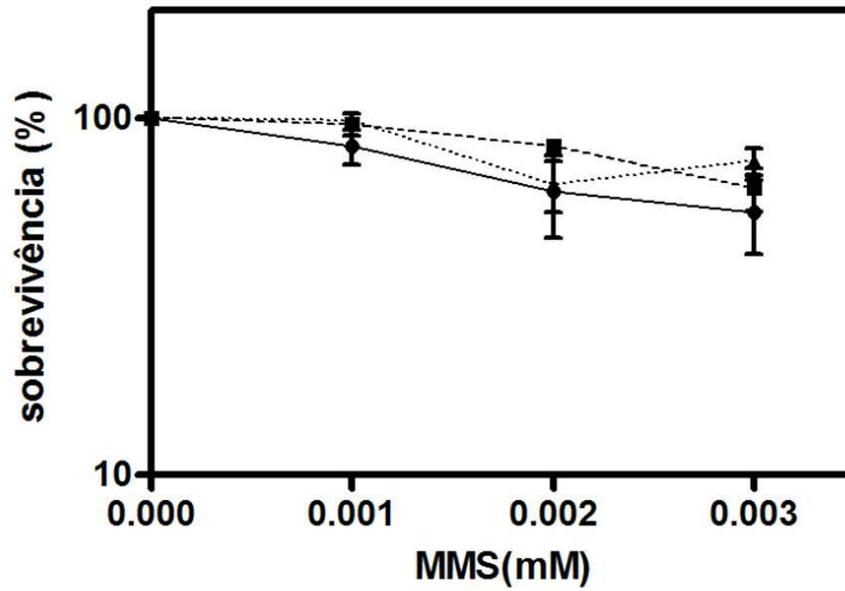
As células foram tratadas com 500 $\mu$ M de peróxido de hidrogênio e observadas após 6h de tratamento. O padrão das células controle (não-tratado) foi comparado com àquele observado para células tratadas (representadas pelas células tratado 1 e tratado 2). Os sítios observados onde ocorre conservação da polimerase após o tratamento ao redor do cinetoplasto (seta contínua) e entre o cinetoplasto e o núcleo (seta tracejada) estão indicados. Barra = 5 $\mu$ m.

agentes que sabidamente não geram estresse oxidativo. Sendo assim, verificamos o efeito do composto metilmetanosulfonato (MMS) no crescimento de células superexpressoras de pol $\beta$  e células controle. MMS é um agente metilante que não está relacionado à geração de estresse oxidativo celular. Atua modificando principalmente guaninas (para 7 metil-guanina) e adeninas (para 3-metildadenina) o que leva a mal-pareamentos e parada de replicação do DNA, respectivamente (Beranek 1990; Lundin et al. 2005). Em geral, determinados tipos de danos alquilantes também são reparados pelo BER. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença de diferentes concentrações de MMS e contadas após 72 horas. A curva de sobrevivência obtida mostrou níveis similares no número de células entre os superexpressores de pol $\beta$  e as células controle (Figura 26), evidenciando que a superexpressão da polimerase não resultou em maior capacidade de sobrevivência quando tratamos epimastigotas com um agente metilante de DNA.

#### **4.14 - Curva de sobrevivência na presença de benzonidazol**

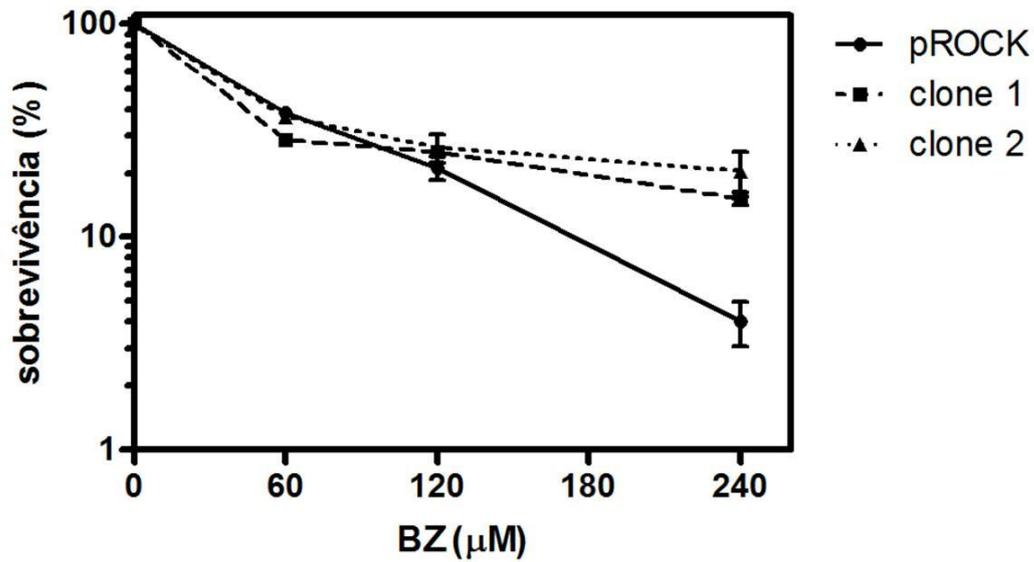
Benzonidazol e nifurtimox são drogas tripanomicidas que vêm sendo utilizadas há mais de 40 anos na quimioterapia da Doença de Chagas. São compostos nitroheterocíclicos que agem como prodrugs que são ativadas por nitrorredutases (NTRs) do tipo I e II do patógeno associadas à FAD ou FMN que tornam o radical nitroso reativo por redução por 1 elétron (Wilkinson et al. 2008). Este radical reage com o oxigênio molecular levando a produção de superóxidos e regeneração do radical. Decidimos realizar curvas de sobrevivência na presença de diferentes doses de benzonidazol como um agente também capaz de aumentar o estresse oxidativo nos parasitos e verificar se a superexpressão de pol $\beta$  celular seria vantajosa neste caso. O

benzonidazol se mostrou tóxico para todas as células testadas nas concentrações mais baixas do fármaco (60 $\mu$ M e 120 $\mu$ M) (Figura 27). Todavia, a curva de sobrevivência mostrou maior resistência dos clones superexpressores após tratamento com benzonidazol (~ 20% de sobrevivência) em relação às células controle (~4% de sobrevivência) na maior dose utilizada no experimento (240 $\mu$ M).



**Figura 26 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de pol $\beta$  em fase exponencial de crescimento à metilmetanosulfonato**

Parasitos transfectados com o plasmídeo pROCK vazio (●) e os clones 1(■) e 2 (▲) foram expostos a 0,001; 0,002 e 0,003 mM de MMS. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.



**Figura 27 - Sensibilidade das culturas de parasitos selvagens e superexpressores de polβ em fase exponencial de crescimento ao benzonidazol**

Parasitos transfectados com o plasmídeo pROCK vazio (●) e os clones 1 (■) e 2 (▲) foram expostos a 60, 120 e 240 μM de BZ. O número de células viáveis foi determinado 48 horas após o tratamento. Os resultados apresentam a média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão.

## 5 - Discussão

O Reparo por Excisão de Bases, ou BER, é considerado essencial no reparo de lesões oxidativas no DNA e é conduzido por interações temporais e funcionais de inúmeras proteínas no sítio da lesão (Lan et al. 2004). Dentre todas as enzimas envolvidas na via curta do BER, a pol $\beta$ , que tem ampla distribuição filogenética (Uchiyama et al. 2009), desempenha um papel chave na remoção do resíduo dRP e incorporação da base correta. A presença de dois ortólogos da pol $\beta$  também em *T. cruzi* tem motivado a realização de ensaios laboratoriais *in vitro* e *in vivo* que possam esclarecer melhor o papel desta via no metabolismo de DNA deste parasito. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho apontam na direção de um envolvimento da pol $\beta$  em processos de replicação e reparo de DNA em *T. cruzi* e controle da via de reparo durante o ciclo celular do parasito para correção de danos de natureza oxidativa especialmente em seu DNA mitocondrial.

Este trabalho buscou contribuir para um melhor entendimento dos papéis das polimerases pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK de *T. cruzi*. Ambas mostraram alta identidade em sequência primária de aminoácidos com a pol $\beta$  humana, mas se localizam em regiões distintas da mitocôndria, o que sugere especialização de função. Além disso, ambas são consideradas DNA polimerases da família X por compartilharem 26 dos 27 resíduos que são estritamente conservados nos membros desta família. Há somente uma troca de fenilalanina na posição 395 da pol $\beta$  ao invés de uma tirosina que é encontrada em todas as outras polimerases, inclusive pol $\beta$ PAK. Decidimos verificar se esta alteração única era responsável por conferir a pol $\beta$ PAK a capacidade de realizar síntese de DNA na presença de 8oxoG e mal-pareamento, atividade que não foi observada para a pol $\beta$ .

A pol $\beta$  humana pode ter sua função facilmente modulada por mutações pontuais, já que inúmeros resíduos únicos são responsáveis pelas atividades de polimerase, de liase e de interação com outras proteínas. Uma mutação de lisina para alanina na posição 72 é suficiente para abolir a atividade de liase e impedir especificamente a ocorrência da via curta do BER (Allinson et al. 2001), enquanto que mutações na arginina 283 levam a uma enzima com deficiência na discriminação e incorporação de nucleotídeos (Sobol et al. 2000). Sabe-se que ocorre alternância na conformação dos domínios da pol $\beta$  quando associada a mal-pareamentos adenina-guanina em seu sítio ativo (Batra et al. 2008). Um pareamento correto Watson-Crick reposiciona o domínio de *thumb* promovendo o alinhamento de resíduos específicos no sítio ativo da polimerase envolvidos na transferência do resíduo de nucleotídeo, o que caracteriza um estado de *encaixe por indução* da polimerase que aumenta a fidelidade do processo (Sawaya et al. 1997). Nossos ensaios mostraram que a alteração no resíduo 395, presente em região homóloga ao domínio de *thumb* nas polimerases de *T. cruzi*, não é responsável pelas diferenças de síntese translesão e extensão de mal-pareamento observadas *in vitro* para as polimerases pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK. É possível que a diferença observada para o resíduo 395 confira diferenças bioquímicas *in vivo*, onde ocorrem diversas interações proteína-proteína e proteína-DNA. Sabe-se que a pol $\beta$  interage e é estimulada por inúmeras proteínas envolvidas no BER como APE1 (Wong and Demple 2004), XRCC1 (Kubota et al. 1996; Dianova et al. 2004), PARP-1 (Dantzer et al. 2000), PCNA (Kedar et al. 2002), FEN1 (Prasad et al. 2000) e DNA ligase I (Prasad et al. 1996). Além disso, a pol $\beta$  também pode estimular a atividade de outras proteínas como FEN1 e DNA ligase I (Balakrishnan et al. 2009), o que mostra uma complexidade de interações durante o BER. É possível também que as polimerases pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK

possam interagir entre si durante o reparo de lesões oxidativas, embora nenhum sítio de interação em potencial tenha sido identificado. Novas abordagens experimentais devem ser realizadas na investigação das possíveis interações moleculares entre as proteínas do BER mitocondrial de *T. cruzi*.

A atividade de liase desempenhada pela pol $\beta$  na via curta do BER (Allinson et al. 2001) condiciona o prosseguimento da via, pois reconstitui o grupamento hidroxila na extremidade 3' da quebra permitindo a ocorrência de ligação fosfodiéster após inserção da base correta. Mutações pontuais de lisina para alanina nas posições 35, 68 e 72 na proteína humana abolem completamente a atividade de liase tornando as células sensíveis ao tratamento com MMS, sendo que a expressão por si só do domínio de 8KDa em células nocauteadas para a polimerase é capaz de reverter a sensibilidade ao tratamento com o agente alquilante (Sobol et al. 2000). Verificamos que tanto a pol $\beta$  e a pol $\beta$ PAK de *T. cruzi* também possuem atividade de liase. De fato, as duas polimerases do parasito possuem os três resíduos de lisina conservados em seus domínios preditos de 8 kDa (Lopes Dde et al. 2008). Ambas as polimerases de *T. brucei* e *C. fasciculata* também possuem os mesmos resíduos conservados e atividade de liase *in vitro* (Saxowsky et al. 2003). Esta conservação funcional também foi vista para a pol $\beta$  nuclear de *L. infantum*, embora ensaios *in vitro* não tenham verificado presença de atividade de liase (Taladriz et al. 2001). Estes resultados sugerem que o BER pode ser uma via de reparo bastante conservada em tripanossomatídeos, em especial na mitocôndria onde deve ser crucial na manutenção do kDNA.

Grande parte das abordagens que buscaram conhecer a função da pol $\beta$  *in vivo* veio de estudos utilizando células *knockout*. A deleção do promotor e do primeiro éxon

do gene da polimerase leva a um fenótipo letal em camundongos (Gu et al. 1994). Enquanto que extratos de células deficientes na polimerase mostraram deficiência no reparo de uracila, células em cultura com características de crescimento e viabilidade normais mostram uma sensibilidade aumentada a agentes alquilantes monofuncionais como MMS e *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG). Estas mesmas células não apresentaram sensibilidade à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e à radiação UV (Sobol et al. 1996; Polosina et al. 2004), embora outro trabalho tenha mostrado que a dupla deleção do gene da pol $\beta$  e pol $\theta$  (uma polimerase pertencente à família A de DNA polimerases) aumentou drasticamente a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio e MMS (Yoshimura et al. 2006). Células deficientes em pol $\beta$  também mostram diminuição na frequência de mutações espontâneas (Niimi et al. 2006). Embora estudos envolvendo organismos *knockout* forneçam evidências fortes do envolvimento de produtos gênicos em processos biológicos, também é possível obter evidências da função de determinado gene gerando células que superexpressam o gene de interesse. Assim, decidimos utilizar parasitos superexpressores da pol $\beta$  no estudo do BER *in vivo*. Fenótipos envolvendo a superexpressão da pol $\beta$  são caracterizados por instabilidade genética (Canitrot et al. 1999), diminuição da fidelidade do BER com indução de mutações de mudança de fase de leitura (Chan et al. 2007) e aumento da resistência a drogas quimioterápicas como *cisplatina* que promove ligações covalentes entre fitas de DNA (Canitrot et al. 1998).

Decidimos utilizar os clones superexpressores de pol $\beta$  para verificar envolvimento desta DNA polimerase na replicação e reparo, já que experimentos realizados anteriormente mostraram que ela é capaz de incorporar AZT durante ensaio

de extensão de primer *in vitro*, sugerindo participação da polimerase em processos de síntese de DNA. Sendo assim, após tratar células superexpressoras com AZT verificamos um fenótipo de maior sensibilidade à droga nestas células em relação às células controle. Um efeito de inibição de crescimento de epimastigotas tratados com AZT já era esperado, considerando que um estudo anterior verificou uma redução no número de amastigotas intracelulares após tratamento das culturas com diferentes doses de AZT (Nakajima-Shimada and Aoki 1998). Este mesmo trabalho excluiu a possibilidade deste efeito ter como causa a atividade de transcritases reversas codificadas no genoma de *T. cruzi* e atribuiu esta atividade à DNA polimerases. Sabe-se que a pol $\alpha$  e pol $\beta$  humanas são capazes de incorporar AZT durante a replicação do DNA (Copeland et al. 1992) e que mutações nos resíduos de aspartato 246 e na arginina 253 localizados no domínio *palm* (palma) da pol $\beta$  diminuem a eficiência catalítica na incorporação do análogo. De fato, *E. coli* que expressam as polimerases pol $\alpha$  e pol $\beta$  mutantes são insensíveis ao AZT (Kosa and Sweasy 1999). Experimentos realizados por Carlos Gustavo Régis da Silva mostraram que o AZT-trifosfato diminui a capacidade da polimerase beta em incorporar timidina radioativa em um ensaio de extensão de primer *in vitro*, sugerindo que a pol $\beta$  poderia ser a principal efetora na incorporação de AZT *in vivo* (dados não publicados). Nossos resultados corroboram os dados anteriores e nos conduzem à interpretação de que a pol $\beta$  poderia incorporar AZT no genoma de epimastigotas de *T. cruzi*, inibindo o crescimento da cultura. Assim, um excesso de pol $\beta$  na célula, ou uma maior atividade do BER, poderia estar aumentando a incorporação de AZT durante processos de replicação e reparo. Novas curvas que pudessem comparar a sobrevivência de epimastigotas e tripomastigotas frente ao tratamento com AZT poderiam revelar diferenças de eficiência do BER nestas

formas. Também é possível verificar possíveis influências dos estados replicativo e não replicativo na incorporação também de outros análogos de bases específicos que poderiam vir a ser utilizados no tratamento da doença de Chagas.

Como os dados do AZT deram indícios da participação da pol $\beta$  na replicação, buscamos verificar se a localização sub-celular da pol $\beta$  poderia variar em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas. Já foi verificado que o padrão de localização das proteínas associadas ao cinetoplasto KAP4 e KAP6 varia entre as três formas do parasito (Cavalcanti et al. 2009). Através de imunolocalização utilizando anticorpo específico, foi evidenciado um padrão no qual a pol $\beta$  se localiza nos sítios antipodais do cinetoplasto apenas em epimastigotas e amastigotas, que são formas celulares com potencial replicativo. Este resultado é concordante com aqueles previamente observados em formas celulares replicativas em *T. brucei* (Saxowsky et al. 2003). Apesar de *C. fasciculata* possuir uma pol $\beta$  com motivo de endereçamento mitocondrial situado na extremidade N-terminal da proteína, sua localização *in situ* ainda não foi realizada (Saxowsky et al. 2002). Curiosamente, tripomastigotas mostraram um padrão de localização difusa caracterizado por uma ausência da proteína nos sítios antipodais e difusão da mesma pela matriz mitocondrial. Estas diferenças sugerem inicialmente um envolvimento da pol $\beta$  na replicação do DNA mitocondrial, mais especificamente em processos de reparo subseqüentes à duplicação do kDNA semelhante àquele proposto para *T. brucei* (Saxowsky et al. 2003). Ainda não se sabe quais alterações estruturais específicas ocorrem no cinetoplasto de tripanossomatídeos durante a metacicloênese além do posicionamento posterior do kDNA em relação ao núcleo. Possivelmente estas mudanças envolvam dissolução dos

sítios antipodais e maior compactação do DNA mitocondrial, o que a princípio protegeria o kDNA de danos oxidativos maiores durante a infecção. Nenhuma pol $\beta$  foi localizada no núcleo das três formas analisadas em *T. cruzi*, embora buscas adicionais no banco de dados do genoma de *T. cruzi* mostraram presença de uma proteína hipotética homóloga a pol $\beta$  que poderia vir a ser um homólogo funcional nuclear da pol $\beta$  neste organismo (dados não mostrados). Este resultado não exclui a presença de um BER nuclear, já que uma redundância funcional na via poderia ser desempenhada pelas polimerases replicativas épsilon e delta (Fortini et al. 1998; Stucki et al. 1998). Também é possível que ocorra translocação da pol $\beta$  para o núcleo através de modificações pós-traducionais, como fosforilação. As DNA polimerases mitocondriais ID e IC, ambas da família A das DNA polimerases, são fosforiladas em *T. cruzi* (Nakayasu et al. 2009). Isso sugere que outras DNA polimerases, tal como a pol $\beta$ , também podem ser modificadas da mesma forma e ter seu direcionamento subcelular modulado por fosforilação.

Nossos resultados mostraram também que os clones superexpressores de pol $\beta$  em fase exponencial de crescimento são mais resistentes do que células controle na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ocorre um aumento da expressão de triparredoxinas peroxidases à medida que os parasitos são submetidos a doses sub-letais crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5-20  $\mu$ M) e este aumento está associado a uma resposta do parasito em promover desintoxicação (Finzi et al. 2004). Os nossos dados indicam que o BER também está contribuindo para o aumento da resistência ao estresse oxidativo, já que a superexpressão de pol $\beta$  resultou em uma maior sobrevivência celular em doses elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200-400  $\mu$ M). Os clones superexpressores também foram mais

resistentes ao tratamento com MX, que inibe especificamente a via curta do BER. Neste caso pode ter ocorrido competição entre a pol $\beta$  e moléculas de MX pelos sítios AP espontâneos presentes no kDNA. Assim, o excesso de polimerase na célula aumentaria a taxa do BER por diminuir o número de sítios AP potenciais a serem bloqueados por MX. Também verificamos que o tratamento combinado envolvendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MX reduz a sobrevivência dos parasitos superexpressores e iguala sua taxa à observada para as células controle, indicando que o BER é a via mais ativa no reparo de danos oxidativos em *T. cruzi*. Experimentos que avaliassem a eficiência de reparo *in vitro* utilizando extratos celulares suplementados com pol $\beta$  purificada de *T. cruzi* e MX poderiam ajudar a investigar a participação do BER neste processo.

Os resultados de resistência dos superexpressores de pol $\beta$  ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram correlacionados à um menor acúmulo de 8oxoG observado no kDNA destas mesmas células em comparação com células controle. A queda nos níveis de 8oxoG observada no superexpressor após 2h de tratamento indica uma maior atividade do BER estimulada por um excesso de pol $\beta$  celular. Ocorreu aumento dos níveis do dano após 24h para as duas células, certamente pela incorporação de 8oxoG provindas do *pool* de nucleotídeos durante a replicação. Porém este nível permaneceu mais baixo nas células superexpressoras. Também observamos que não ocorreram diferenças no acúmulo de 8oxoG no *núcleo* das células testadas, indicando um aumento da eficiência somente do BER mitocondrial. Diferentes vias envolvidas na eliminação de 8oxoG foram conservadas ao longo da evolução dos seres vivos. Em *E. coli*, ocorrem glicosilases do BER especializadas em remover a 8oxoG como lesões pré-mutagênicas (Russo et al. 2007) denominadas *Fpg* (*mutM*), *mutY* e *mutT* que compõe

uma via conhecida como Sistema GO. Fpg remove 8oxoGs pareadas com citosinas e possui atividade de liase intrínseca que será subseqüentemente processada por APE1 e reparada. Entretanto, resíduos de 8oxoG que escapam do reconhecimento e excisão de *Fpg* podem se parear com adeninas durante a replicação, gerando um substrato 8oxoG:adenina que pode ser reconhecido por *mutY* que catalisa a excisão da adenina. Além disso, *mutT* hidrolisa 8oxoG-GTP a 8oxoG-GMP no *pool* de nucleotídeos minimizando a incorporação de 8oxoG durante a replicação. Em *T. cruzi* não foram detectados ortólogos de *mutT*, embora existam ortólogos de *mutY* e *Fpg* (El-Sayed et al. 2005). É possível que a sensibilidade do parasito ao estresse oxidativo seja reflexo de um sistema incompleto na remoção de 8oxoG. Além disso, componentes do MMR também estão envolvidos na resposta a 8oxoG (Slupphaug et al. 2003). Uma linhagem de *T. brucei* deficiente em *MSH2* mostrou um aumento na sensibilidade à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a complementação heteróloga com a proteína de *T. cruzi* foi capaz de reverter este quadro (Machado-Silva et al. 2008). A deleção de um único alelo do gene *MSH2* de *T. cruzi* também foi capaz de aumentar a sensibilidade destes parasitos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e elevar os níveis de 8oxoG no kDNA, mostrando que o MMR também está envolvido na resposta ao estresse oxidativo neste organismo (Priscila Campos et al., artigo submetido).

Verificamos que as taxas de sobrevivência após tratamento dos clones superexpressores de pol $\beta$  e células controle com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram menores para as células em fase exponencial de crescimento do que o observado para células mantidas em fase estacionária, que se mostraram mais resistentes ao regime oxidativo. Estudos preliminares em mamíferos evidenciaram diminuição da eficiência e fidelidade do BER

em células não-proliferativas, o que foi atribuído a ocorrência exclusiva da via curta que é dependente da atividade da pol $\beta$  (Akbari et al. 2009). Foi mostrado também que o estado de senescência em células *knockout* para a pol $\beta$  predispõe a um aumento de sensibilidade à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação às células em fase replicativa, embora a eficiência do BER em reparar 8oxoG esteja reduzida em ambos estados celulares (Horton et al. 2002). Nossos resultados foram contrários aos obtidos por Horton e colaboradores. Uma explicação plausível é que em *T. cruzi* um excesso de pol $\beta$  estaria favorecendo somente células em fase replicativa, indicando possivelmente que neste estado a atividade do BER de via curta estaria sobrepondo o de via longa, onde polimerases replicativas podem substituir a pol $\beta$  no preenchimento do *gap* (Fortini and Dogliotti 2007). Quando estas células chegam ao estado estacionário, pode estar ocorrendo inativação do BER e ativação de outra via de reparo que seria capaz de reparar lesões oxidativas com alta eficiência. As altas doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, necessárias para inibir o crescimento das células em um nível similar àquele observado para células não replicativas, também poderiam ser explicados pelo fato de que células não-replicativas já estariam se aproximando da homeostase de tripomastigotas. Tripomastigotas realizam mais fermentação do que respiração, com conseqüente diminuição da atividade mitocondrial para produção de energia (Bringaud et al. 2006). Assim, em tripomastigotas de *T. cruzi*, a atividade de um BER mitocondrial de via curta poderia estar diminuída ou dando lugar à outras vias de reparo de lesões oxidativas, tanto no núcleo quanto na mitocôndria. Isso foi visto em mitocôndrias humanas para outros tipos de lesões oxidativas como 2-desoxiribonolactona, que são reparadas exclusivamente pela via longa que é dependente da atividade de FEN1 (Liu et al. 2008). Também é possível que ocorra uma alta expressão das proteínas detoxificantes do

complexo enzimático T(SH)<sub>2</sub>/Trx nestas células (Finzi et al. 2004) dispensando os complexos de reparo de DNA nessa fase. Este dado é corroborado com os dados aqui obtidos envolvendo localização da pol $\beta$  nas fases G2, mitose e citocinese de epimastigotas e em tripomastigotas sanguíneos, onde ocorre descentralização da enzima na célula e espalhamento da polimerase pela matriz mitocondrial, sugerindo uma possível dissociação da maquinaria de reparo e desvinculação do reparo do DNA mitocondrial. Uma possível abordagem experimental para elucidar um pouco melhor este aspecto seria verificar a atividade de diversas vias de reparo de DNA de células selvagens *in vitro* incubando extratos celulares contendo oligonucleotídeos sintéticos mimetizando vários intermediários de vias de reparo. Também seria interessante verificar os níveis protéicos das proteínas de reparo e das proteínas do complexo tripanotona em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas por *Western blot*.

Ao avaliar a localização sub-celular da pol $\beta$  após tratamento de formas epimastigotas de *T.cruzi* com peróxido de hidrogênio, verificamos formação de um foco discreto de polimerase beta 6h após incubação em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dissociação da proteína nos tempos subseqüentes analisados. Já foi visto que proteínas de diferentes vias de reparo de DNA acumulam-se sequencialmente em *foci* nucleares de células HeLa contendo lesões reconhecidas principalmente pelo BER, o que inclui OGG1 (Luna et al. 2005), XRCC1, PCNA (Hashiguchi et al. 2007), ligase III e polimerase beta, sendo que os domínios de 8kDa e 31kDa da polimerase estão envolvidos no reconhecimento de lesões oxidativas e SSBs, respectivamente, geradas após microirradiação local com UVA (Lan et al. 2004). Proteínas envolvidas na via de NHEJ (Wang et al. 2006), NER (Green and Almouzni 2003) e na manutenção de metilação no DNA (Mortusewicz et al.

2005) também mostraram direcionamento para *foci* discretos no núcleo após indução de lesões, sendo que em todos os casos os *foci* persistiram por um período determinado de tempo, possivelmente somente até o reparo completo de todas as lesões geradas. Esse efeito também deve ter ocorrido em nosso experimento, considerando que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ter induzido danos oxidativos no kDNA durante 30 minutos que é o período de estabilidade do peróxido após diluição em meio líquido de cultura. Acreditamos que este possível foco de reparo está localizado na região cinetoflagelar na qual ocorre replicação dos círculos e onde se localizam diversas DNA polimerases (Liu et al. 2005). Nosso resultado nos faz acreditar fortemente na ocorrência de um provável BER mitocondrial também nesta região. Observamos também uma aparente sobreposição deste foco com a região única de concentração de polimerase beta observada em epimastigotas em citocinese, o que poderia indicar eventos assíncronicos de reparo desvinculados da fase G1/S. Novos experimentos utilizando marcadores mitocondriais associados a anticorpos que reconhecem outras proteínas da maquinaria do BER e de outras vias são necessários para obter um melhor panorama do reparo de lesões oxidativas em *T. cruzi*.

Sabe-se que os padrões morfológicos observados na mitose de epimastigotas envolvem emergência de um segundo flagelo durante a fase G2 seguida de segregação do cinetoplasto e mitose nuclear, com posterior citocinese gerando duas células filhas (Elias et al. 2007). Os dados obtidos neste trabalho com relação à localização da polβ durante o ciclo celular mostraram concentração da enzima nos sítios antipodais do cinetoplasto nos estágios G1 /S onde ocorre replicação e reparo do DNA, considerando que protrusão do novo flagelo na fase G2 se dá somente após a completa duplicação

do DNA nuclear que procede à do kDNA na fase S (Elias et al. 2007). O prosseguimento do ciclo durante as fases G2, mitose e citocinese mostram padrão de localização semelhante àquele observado nas formas tripomastigotas sanguíneas, caracterizado pela dispersão da polimerase pela matriz mitocondrial. Durante a citocinese a pol $\beta$  parece retornar às imediações do kDNA, formando uma estrutura pontual seguida de reestruturação em forma de anel. Possivelmente esta dinâmica na fase final da citocinese possa favorecer um rearranjo do estoque de enzimas funcionais e controle da segregação igual novamente para os sítios antipodais do cinetoplasto. Até o momento de finalização deste trabalho, não tomamos conhecimento de nenhum registro na literatura científica envolvendo localização sub-celular de proteínas participantes de vias de reparo de DNA durante as diferentes fases do ciclo celular em eucariotos. Esta é a primeira vez que uma enzima de reparo, mais precisamente uma DNA polimerase, tem seu direcionamento acompanhado durante o ciclo celular em *T. cruzi*, e possivelmente o único descrito em tripanossomatídeos. Estas observações corroboram o envolvimento da pol $\beta$  na replicação e reparo do kDNA, já que novamente sua localização nos sítios antipodais se mostrou exclusivamente dependente de um estado de replicação do genoma mitocondrial. Acreditamos que este tipo de informação é crucial na complementação dos dados oriundos de evidências bioquímicas dos ensaios obtidos *in vitro* com as proteínas recombinantes. Estamos trabalhando com outras proteínas envolvidas em processos de manutenção do kDNA (por exemplo SSE1 e UMSBP) e de processos de reparo de DNA (por exemplo APE1 e OGG1) para verificação da ocorrência de direcionamento celular.

De modo inesperado, também verificamos recrutamento da pol $\beta$  em tripomastigotas não-replicativos após tratamento com peróxido de hidrogênio, sendo que não ocorreu sobreposição total da polimerase com o marcador mitocondrial utilizado. Proteínas como PCNA e RPA, importantes na replicação e no reparo de DNA, podem ser direcionadas a sítios de lesão nucleares em células HeLa sincronizadas na fase S do ciclo celular como também em células não-S (Mortusewicz et al. 2005). Na maioria dos casos observamos que a pol $\beta$  sempre esteve bastante associada à região do kDNA. Em tripomastigotas não tratados a pol $\beta$  aparece em forma de grânulos, indicando interação e organização da enzima no armazenamento ou para degradação. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também alterou de alguma forma a localização da proteína LipDH, que é uma FAD-cisteína oxidoredutase envolvida no metabolismo de tióis em *T. cruzi*, mas preservou regiões de sobreposição com a pol $\beta$ , indicando possivelmente a participação das duas proteínas em processos desencadeados pela exposição ao peróxido de hidrogênio. Esta foi a primeira vez que se mostrou alteração na localização celular de uma proteína de reparo em tripomastigotas não replicativos, sugerindo que neste estágio também possa ocorrer ativação de vias de reparo de DNA.

Curiosamente não observamos diferenças de sobrevivência entre as células superexpressoras e o controle após tratamento com MMS. Este agente metilante monofuncional transfere grupamentos metil para adeninas e guaninas levando a formação de N3-metiladenina que pode levar a parada da forquilha de replicação e morte celular (Engelward et al. 1998), e N7-metilguanina considerada citotóxica (Varadarajan et al. 2003). Lesões do tipo O6-metilguanina são pré-mutagênicas já que as DNA polimerases podem incorporar timina frente a estas lesões induzindo a

transições do tipo GC-AT (Margison et al. 2002). Mutações no domínio de 8kDa (liase) da pol $\beta$  conferem hipersensibilidade à MMS que pode ser revertida pela expressão do domínio de liase por si só ou reintrodução da pol $\beta$  selvagem (Sobol et al. 2000). Este resultado mostra especificidade e exclusividade do BER no reparo de danos alquilantes causados por MMS em mamíferos, já que vias de reparo alternativas não puderam interceder na suplementação do BER inativo nestas células (Sobol et al. 2000). Contudo, a sensibilidade ao MMS foi similar em células controle e superexpressoras de pol $\beta$ , sugerindo que o reparo de lesões alquilantes em *T. cruzi* está dependente de outras vias de reparo, o que também fortalece a idéia do envolvimento do BER no reparo de lesões de natureza oxidativa. É possível que danos alquilantes sejam reparados através da via longa do BER em *T. cruzi*, considerando que as células tratadas com MMS estavam em fase logarítmica de crescimento e que neste estágio ocorra predominância da via curta. Também é possível que a superexpressão, neste caso, não tenha alterado significativamente a homeostase do BER a ponto de aumentar ou diminuir a sensibilidade das células ao MMS. Contudo este efeito não foi verificado em células superexpressoras de N-metilpurina DNA glicosilase (MPG), que mostraram sensibilidade ao agente alquilante temozolomida, possivelmente por levar a um desbalanço do BER pela saturação do resíduo de dRP pela pol $\beta$  (Trivedi et al. 2008). Outro ponto é que o reparo de danos alquilantes pelo BER levaria à intermediários de quebra simples que evoluiriam para quebras duplas que são principalmente reparadas por recombinação homóloga (Pascucci et al. 2005) e isso acoplaria duas vias de reparo, BER e HR, no reparo de danos alquilantes ao DNA. Todavia, outro grupo mostrou que o MMS não provoca quebras duplas *in vivo* (Lundin et al. 2005), embora estes experimentos não tenham sido realizados em células

*knockout* para polimerase beta. Uma última consideração refere-se à possível ausência de glicosilases específicas no reconhecimento de danos alquilantes na mitocôndria de *T. cruzi*. Considerando que a ocorrência do BER está condicionada à criação de sítios AP após ação das glicosilases, um excesso de pol $\beta$  não traria vantagens na sobrevivência celular já que as atividades de liase e de polimerase efetuadas pela pol $\beta$  ocorrem sequencialmente após ação da glicosilases e da AP endonuclease. Abordagens experimentais adicionais são necessárias para elucidação da via de reparo de danos alquilantes, ainda pouco estudadas em tripanosomatídeos.

As curvas realizadas com benzonidazol mostraram uma maior resistência das células superexpressoras em relação às células controle ao tratamento. Este resultado está de acordo com a curva de sobrevivência obtida após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde observamos a mesma resistência, porém em níveis maiores. Acreditamos que os dois compostos estão aumentando o estresse oxidativo no parasito gerando superóxidos intracelulares com potencial oxidante. Epimastigotas de *T. cruzi* resistentes ao tratamento com nifurtimox, outro composto utilizado no tratamento da Doença de Chagas (mas com estrutura molecular e efeitos oxidativos semelhantes ao benzonidazol) mostraram uma redução nos níveis de NTR do tipo I, resistência cruzada ao benzonidazol e alteração no cariótipo, sugerindo deleção de cópia do gene que codifica NTR, o que levaria à redução no nível de ativação da prodroga no parasito. Isto foi confirmado pela geração de parasitos transgênicos resistentes ao tratamento com nifurtimox e benzonidazol pela deleção no gene NTR (Wilkinson et al. 2008). Adicionalmente, parasitos superexpressando NTR foram 10 vezes mais sensíveis ao tratamento com drogas nitroheterocíclicas, mostrando que NTR está diretamente

envolvido na ativação de drogas que têm efeito tripanomicida por induzir estresse oxidativo (Docampo 1990). Outros trabalhos mostraram aumento da expressão de TXNPx mitocondrial e citoplasmática (Nogueira et al. 2009) e de superóxido dismutase (Nogueira et al. 2006) em células resistente a benzonidazol, indicando que esta droga induz uma resposta dos sistemas antioxidantes do parasito. Novamente é possível que o BER esteja mais ativo em células superexpressoras de pol $\beta$ , e esta maior eficiência reduz os efeitos deletérios do estresse oxidativo causados pelo benzonidazol, pelo menos no kDNA. Este resultado fortalece os dados vistos nas curvas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MX de que as células superexpressoras de pol $\beta$  são mais resistentes a um aumento do estresse oxidativo do que as células controle, e este fato se deve basicamente a um aumento da eficiência do BER. Este resultado também contribui para o entendimento do mecanismo de ação do benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas.

Os resultados deste trabalho apontam para um papel do BER na sobrevivência de *T. cruzi*. Os ensaios *in vitro* e a utilização de células superexpressoras de pol $\beta$  foram direcionados com o intuito de melhor esclarecer o envolvimento desta DNA polimerase no reparo de lesões de natureza oxidativa. Certamente novos desafios metodológicos e experimentais puderam aflorar em decorrência de novas perguntas que naturalmente apareceram ao longo deste trabalho. Como exemplo, ainda é necessário esclarecer melhor o envolvimento da pol $\beta$ PAK na replicação e no reparo do kDNA e possíveis interações moleculares desta enzima com outras proteínas mitocondriais. Outra meta seria a obtenção de células *knockout* para pol $\beta$  e pol $\beta$ PAK e avaliação do fenótipo e sobrevivência destas células em diversas condições de estresse genotóxico. Gradualmente, um domínio mais aprofundado acerca da bioquímica

envolvida na proteção dos genomas mitocondrial e nuclear do parasito contra o estresse oxidativo vem sendo construído, ampliando possibilidades de intervenção no estudo do *T. cruzi* e no tratamento de portadores da Doença de Chagas.

## Referências Bibliográficas

- Akbari, M., J. Pena-Diaz, S. Andersen, N. B. Liabakk, M. Otterlei and H. E. Krokan (2009). "Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity." DNA Repair (Amst) **8**(7): 834-43.
- Allinson, S. L., Dianova, II and G. L. Dianov (2001). "DNA polymerase beta is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts." EMBO J **20**(23): 6919-26.
- Asagoshi, K., Y. Liu, A. Masaoka, L. Lan, R. Prasad, J. K. Horton, A. R. Brown, X. H. Wang, H. M. Bdour, R. W. Sobol, J. S. Taylor, A. Yasui and S. H. Wilson (2009). "DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair in living cells." DNA Repair (Amst).
- Augusto-Pinto, L., D. C. Bartholomeu, S. M. Teixeira, S. D. Pena and C. R. Machado (2001). "Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*." Gene **272**(1-2): 323-33.
- Augusto-Pinto, L., S. M. Teixeira, S. D. Pena and C. R. Machado (2003). "Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency." Genetics **164**(1): 117-26.
- Balakrishnan, L., P. D. Brandt, L. A. Lindsey-Boltz, A. Sancar and R. A. Bambara (2009). "Long patch base excision repair proceeds via coordinated stimulation of the multienzyme DNA repair complex." J Biol Chem **284**(22): 15158-72.
- Batra, V. K., W. A. Beard, D. D. Shock, L. C. Pedersen and S. H. Wilson (2008). "Structures of DNA polymerase beta with active-site mismatches suggest a transient abasic site intermediate during misincorporation." Mol Cell **30**(3): 315-24.
- Bell, J. S., T. I. Harvey, A. M. Sims and R. McCulloch (2004). "Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **51**(1): 159-73.
- Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." Mutat Res **231**(1): 11-30.
- Biade, S., R. W. Sobol, S. H. Wilson and Y. Matsumoto (1998). "Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/apyrimidinic site repair on linear DNA." J Biol Chem **273**(2): 898-902.
- Bohr, V. A., T. Stevnsner and N. C. de Souza-Pinto (2002). "Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells." Gene **286**(1): 127-34.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brener, Z. (1973). "Biology of *Trypanosoma cruzi*." Annu Rev Microbiol **27**: 347-82.

- Bringaud, F., L. Riviere and V. Coustou (2006). "Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 1-9.
- Bruhn, D. F., B. Mozeleski, L. Falkin and M. M. Klingbeil (Aceito para publicação). "Mitochondrial DNA polymerase POLIB is essential for minicircle DNA replication in African trypanosomes." Mol Microbiol.
- Burton, P., D. J. McBride, J. M. Wilkes, J. D. Barry and R. McCulloch (2007). "Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology." Eukaryot Cell **6**(10): 1773-81.
- Cabelof, D. C., Y. Ikeno, A. Nyska, R. A. Busuttill, N. Anyangwe, J. Vijg, L. H. Matherly, J. D. Tucker, S. H. Wilson, A. Richardson and A. R. Heydari (2006). "Haploinsufficiency in DNA polymerase beta increases cancer risk with age and alters mortality rate." Cancer Res **66**(15): 7460-5.
- Camargo, E. P. (1964). "Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **12**: 93-100.
- Canitrot, Y., C. Cazaux, M. Frechet, K. Bouayadi, C. Lesca, B. Salles and J. S. Hoffmann (1998). "Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12586-90.
- Canitrot, Y., M. Frechet, L. Servant, C. Cazaux and J. S. Hoffmann (1999). "Overexpression of DNA polymerase beta: a genomic instability enhancer process." FASEB J **13**(9): 1107-11.
- Carnieri, E. G., S. N. Moreno and R. Docampo (1993). "Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages." Mol Biochem Parasitol **61**(1): 79-86.
- Carpenter, L. R. and P. T. Englund (1995). "Kinetoplast maxicircle DNA replication in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **15**(12): 6794-803.
- Cavalcanti, D. P., M. K. Shimada, C. M. Probst, T. C. Souto-Padron, W. de Souza, S. Goldenberg, S. P. Fragoso and M. C. Motta (2009). "Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*." BMC Microbiol **9**: 120.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **1**: 159-218.
- Chan, K., S. Houlbrook, Q. M. Zhang, M. Harrison, I. D. Hickson and G. L. Dianov (2007). "Overexpression of DNA polymerase beta results in an increased rate of frameshift mutations during base excision repair." Mutagenesis **22**(3): 183-8.
- Conway, C., C. Proudfoot, P. Burton, J. D. Barry and R. McCulloch (2002). "Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **45**(6): 1687-700.
- Copeland, W. C., M. S. Chen and T. S. Wang (1992). "Human DNA polymerases alpha and beta are able to incorporate anti-HIV deoxynucleotides into DNA." J Biol Chem **267**(30): 21459-64.

- Dalal, S., A. Chikova, J. Jaeger and J. B. Sweasy (2008). "The Leu22Pro tumor-associated variant of DNA polymerase beta is dRP lyase deficient." Nucleic Acids Res **36**(2): 411-22.
- Dalal, S., S. Hile, K. A. Eckert, K. W. Sun, D. Starcevic and J. B. Sweasy (2005). "Prostate-cancer-associated I260M variant of DNA polymerase beta is a sequence-specific mutator." Biochemistry **44**(48): 15664-73.
- Dantzer, F., G. de La Rubia, J. Menissier-De Murcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia and V. Schreiber (2000). "Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1." Biochemistry **39**(25): 7559-69.
- DaRocha, W. D., R. A. Silva, D. C. Bartholomeu, S. F. Pires, J. M. Freitas, A. M. Macedo, M. P. Vazquez, M. J. Levin and S. M. Teixeira (2004). "Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols." Parasitol Res **92**(2): 113-20.
- de Freitas, J. M., L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V. F. Goncalves, S. M. Teixeira, E. Chiari, A. C. Junqueira, O. Fernandes, A. M. Macedo, C. R. Machado and S. D. Pena (2006). "Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*." PLoS Pathog **2**(3): e24.
- de Souza-Pinto, N. C., D. M. Wilson, 3rd, T. V. Stevnsner and V. A. Bohr (2008). "Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1098-109.
- de Souza, W. (2009). "Structural organization of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 89-100.
- De Souza, W. and D. P. Cavalcanti (2008). "DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: a review." Trends Cell Mol Biol **2**: 89-104.
- Dianov, G. and T. Lindahl (1994). "Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway." Curr Biol **4**(12): 1069-76.
- Dianova, I., K. M. Sleeth, S. L. Allinson, J. L. Parsons, C. Breslin, K. W. Caldecott and G. L. Dianov (2004). "XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair." Nucleic Acids Res **32**(8): 2550-5.
- Docampo, R. (1990). "Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs." Chem Biol Interact **73**(1): 1-27.
- Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff and S. N. Moreno (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." Nat Rev Microbiol **3**(3): 251-61.
- Downey, N., J. C. Hines, K. M. Sinha and D. S. Ray (2005). "Mitochondrial DNA ligases of *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **4**(4): 765-74.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Wortley, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S.

- Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart and B. Andersson (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-15.
- Elias, M. C., J. P. da Cunha, F. P. de Faria, R. A. Mortara, E. Freymuller and S. Schenkman (2007). "Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle." Protist **158**(2): 147-57.
- Engelward, B. P., J. M. Allan, A. J. Dreslin, J. D. Kelly, M. M. Wu, B. Gold and L. D. Samson (1998). "A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome." J Biol Chem **273**(9): 5412-8.
- Finzi, J. K., C. W. Chiavegatto, K. F. Corat, J. A. Lopez, O. G. Cabrera, A. A. Mielniczki-Pereira, W. Colli, M. J. Alves and F. R. Gadelha (2004). "Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 37-43.
- Flohe, L., P. Steinert, H. J. Hecht and B. Hofmann (2002). "Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase." Methods Enzymol **347**: 244-58.
- Fortini, P. and E. Dogliotti (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." DNA Repair (Amst) **6**(4): 398-409.
- Fortini, P., B. Pascucci, E. Parlanti, R. W. Sobol, S. H. Wilson and E. Dogliotti (1998). "Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells." Biochemistry **37**(11): 3575-80.
- Fortune, J. M., Y. I. Pavlov, C. M. Welch, E. Johansson, P. M. Burgers and T. A. Kunkel (2005). "Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase delta: high fidelity for base substitutions but lower fidelity for single- and multi-base deletions." J Biol Chem **280**(33): 29980-7.
- Gedik, C. M. and A. Collins (2005). "Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study." FASEB J **19**(1): 82-4.
- Goldberg, S. S. and E. Chiari (1980). "Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* on solid medium." J Parasitol **66**(4): 677-9.
- Green, C. M. and G. Almouzni (2003). "Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo." EMBO J **22**(19): 5163-74.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann and K. Rajewsky (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-6.
- Hakem, R. (2008). "DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly." EMBO J **27**(4): 589-605.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.

- Hashiguchi, K., Y. Matsumoto and A. Yasui (2007). "Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells." Nucleic Acids Res **35**(9): 2913-23.
- Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra (2008). "Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells." Cell Res **18**(1): 27-47.
- Hines, J. C., M. L. Engel, H. Zhao and D. S. Ray (2001). "RNA primer removal and gap filling on a model minicircle replication intermediate." Mol Biochem Parasitol **115**(1): 63-7.
- Hofmann, B., H. J. Hecht and L. Flohe (2002). "Peroxi-redoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-64.
- Horton, J. K., A. Baker, B. J. Berg, R. W. Sobol and S. H. Wilson (2002). "Involvement of DNA polymerase beta in protection against the cytotoxicity of oxidative DNA damage." DNA Repair (Amst) **1**(4): 317-33.
- Horton, J. K., R. Prasad, E. Hou and S. H. Wilson (2000). "Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair." J Biol Chem **275**(3): 2211-8.
- Huang, H. and K. G. Manton (2004). "The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review." Front Biosci **9**: 1100-17.
- Hubscher, U., G. Maga and S. Spadari (2002). "Eukaryotic DNA polymerases." Annu Rev Biochem **71**: 133-63.
- Izumi, T., L. R. Wiederhold, G. Roy, R. Roy, A. Jaiswal, K. K. Bhakat, S. Mitra and T. K. Hazra (2003). "Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage." Toxicology **193**(1-2): 43-65.
- Jansen, J. G., A. Tsaalbi-Shtylik, G. Hendriks, H. Gali, A. Hendel, F. Johansson, K. Erixon, Z. Livneh, L. H. Mullenders, L. Haracska and N. de Wind (2009). "Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells." Mol Cell Biol **29**(11): 3113-23.
- Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-46.
- Kanaar, R., C. Wyman and R. Rothstein (2008). "Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing." EMBO J **27**(4): 581-8.
- Kedar, P. S., S. J. Kim, A. Robertson, E. Hou, R. Prasad, J. K. Horton and S. H. Wilson (2002). "Direct interaction between mammalian DNA polymerase beta and proliferating cell nuclear antigen." J Biol Chem **277**(34): 31115-23.
- Klingbeil, M. M., S. A. Motyka and P. T. Englund (2002). "Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*." Mol Cell **10**(1): 175-86.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." Toxicol Pathol **30**(6): 620-50.
- Kosa, J. L. and J. B. Sweasy (1999). "3'-Azido-3'-deoxythymidine-resistant mutants of DNA polymerase beta identified by in vivo selection." J Biol Chem **274**(6): 3851-8.
- Krahn, J. M., W. A. Beard, H. Miller, A. P. Grollman and S. H. Wilson (2003). "Structure of DNA polymerase beta with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential." Structure **11**(1): 121-7.

- Krauth-Siegel, R. L. and M. A. Comini (2008). "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1236-48.
- Kubota, Y., R. A. Nash, A. Klungland, P. Schar, D. E. Barnes and T. Lindahl (1996). "Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein." EMBO J **15**(23): 6662-70.
- Kumar, A., J. Abbotts, E. M. Karawya and S. H. Wilson (1990a). "Identification and properties of the catalytic domain of mammalian DNA polymerase beta." Biochemistry **29**(31): 7156-9.
- Kumar, A., S. G. Widen, K. R. Williams, P. Kedar, R. L. Karpel and S. H. Wilson (1990b). "Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase beta. Identification of a discrete template binding domain." J Biol Chem **265**(4): 2124-31.
- Lages-Silva, E., L. E. Ramirez, A. L. Pedrosa, E. Crema, L. M. da Cunha Galvao, S. D. Junho Pena, A. M. Macedo and E. Chiari (2006). "Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil." J Clin Microbiol **44**(6): 2167-71.
- Lan, L., S. Nakajima, Y. Oohata, M. Takao, S. Okano, M. Masutani, S. H. Wilson and A. Yasui (2004). "In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13738-43.
- Leibeling, D., P. Laspe and S. Emmert (2006). "Nucleotide excision repair and cancer." J Mol Histol **37**(5-7): 225-38.
- Liu, B., Y. Liu, S. A. Motyka, E. E. Agbo and P. T. Englund (2005). "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." Trends Parasitol **21**(8): 363-9.
- Liu, B., J. Wang, N. Yaffe, M. E. Lindsay, Z. Zhao, A. Zick, J. Shlomai and P. T. Englund (2009). "Trypanosomes have six mitochondrial DNA helicases with one controlling kinetoplast maxicircle replication." Mol Cell **35**(4): 490-501.
- Liu, P., L. Qian, J. S. Sung, N. C. de Souza-Pinto, L. Zheng, D. F. Bogenhagen, V. A. Bohr, D. M. Wilson, 3rd, B. Shen and B. Demple (2008). "Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria." Mol Cell Biol **28**(16): 4975-87.
- Liu, Y. and P. T. Englund (2007). "The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication." Mol Microbiol **64**(3): 676-90.
- Liuzzi, M. and M. Talpaert-Borle (1985). "A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine." J Biol Chem **260**(9): 5252-8.
- Lohrer, H. and R. L. Krauth-Siegel (1990). "Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*." Eur J Biochem **194**(3): 863-9.
- Lopes Dde, O., B. L. Schamber-Reis, C. G. Regis-da-Silva, M. A. Rajao, W. D. Darocha, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. C. Nardelli, S. Schenkman, J. S. Hoffmann, C. Cazaux, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2008). "Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance." DNA Repair (Amst) **7**(11): 1882-92.

- Lopes, D. O., B. L. Schamber-Reis, C. G. Regis-da-Silva, M. A. Rajao, W. D. Darocha, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. C. Nardelli, S. Schenkman, J. S. Hoffmann, C. Cazaux, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2008). "Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance." DNA Repair (Amst) **7**(11): 1882-92.
- Lu, C. Y., H. C. Lee, H. J. Fahn and Y. H. Wei (1999). "Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin." Mutat Res **423**(1-2): 11-21.
- Luna, L., V. Rolseth, G. A. Hildrestrand, M. Otterlei, F. Dantzer, M. Bjoras and E. Seeberg (2005). "Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant." Nucleic Acids Res **33**(6): 1813-24.
- Lundin, C., M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A. S. Goldman and T. Helleday (2005). "Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks." Nucleic Acids Res **33**(12): 3799-811.
- Macedo, A. M., C. R. Machado, R. P. Oliveira and S. D. Pena (2004). "Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(1): 1-12.
- Machado-Silva, A., S. M. Teixeira, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, R. McCulloch and C. R. Machado (2008). "Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage." Gene **411**(1-2): 19-26.
- Machado, C. R., L. Augusto-Pinto, R. McCulloch and S. M. Teixeira (2006). "DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes." Mutat Res **612**(1): 40-57.
- Margison, G. P., M. F. Santibanez Koref and A. C. Povey (2002). "Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O6-methylguanine." Mutagenesis **17**(6): 483-7.
- Matsuda, T., B. J. Vande Berg, K. Bebenek, W. P. Osheroff, S. H. Wilson and T. A. Kunkel (2003). "The base substitution fidelity of DNA polymerase beta-dependent single nucleotide base excision repair." J Biol Chem **278**(28): 25947-51.
- Mortusewicz, O., L. Schermelleh, J. Walter, M. C. Cardoso and H. Leonhardt (2005). "Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 8905-9.
- Muller, S., E. Liebau, R. D. Walter and R. L. Krauth-Siegel (2003). "Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites." Trends Parasitol **19**(7): 320-8.
- Nakajima-Shimada, J. and T. Aoki (1998). "Inhibition by 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells and a possible mechanism of action." Adv Exp Med Biol **431**: 719-22.
- Nakayasu, E. S., M. R. Gaynor, T. J. Sobreira, J. A. Ross and I. C. Almeida (2009). "Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage." Proteomics **9**(13): 3489-506.
- Neijenhuis, S., M. Verwijs-Janssen, U. Kasten-Pisula, G. Rumping, K. Borgmann, E. Dikomey, A. C. Begg and C. Vens (2009). "Mechanism of cell killing after ionizing

- radiation by a dominant negative DNA polymerase beta." DNA Repair (Amst) **8**(3): 336-46.
- Nicholl, I. D., K. Nealon and M. K. Kenny (1997). "Reconstitution of human base excision repair with purified proteins." Biochemistry **36**(24): 7557-66.
- Niimi, N., N. Sugo, Y. Aratani, Y. Gondo, M. Katsuki and H. Koyama (2006). "Decreased mutant frequency in embryonic brain of DNA polymerase beta null mice." Mutagenesis **21**(1): 55-9.
- Nogueira, F. B., M. A. Krieger, P. Nirde, S. Goldenberg, A. J. Romanha and S. M. Murta (2006). "Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in Trypanosoma cruzi population with in vitro-induced resistance to benznidazole." Acta Trop **100**(1-2): 119-32.
- Nogueira, F. B., J. C. Ruiz, C. Robello, A. J. Romanha and S. M. Murta (2009). "Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanredoxin peroxidase in Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole." Parasitol Res **104**(4): 835-44.
- PAHO, P. A. H. O.-. (2010). "Chagas Disease: Fact Sheet and Poster." Retrieved 20/01, 2010, from <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dch-poster.htm#status>.
- Parker, W. B., E. L. White, S. C. Shaddix, L. J. Ross, R. W. Buckheit, Jr., J. M. Germany, J. A. Secrist, 3rd, R. Vince and W. M. Shannon (1991). "Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human DNA polymerases alpha, beta, and gamma by the 5'-triphosphates of carbovir, 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxyguanosine and 3'-deoxythymidine. A novel RNA template for the evaluation of antiretroviral drugs." J Biol Chem **266**(3): 1754-62.
- Pascucci, B., G. Maga, U. Hubscher, M. Bjoras, E. Seeberg, I. D. Hickson, G. Villani, C. Giordano, L. Cellai and E. Dogliotti (2002). "Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins." Nucleic Acids Res **30**(10): 2124-30.
- Pascucci, B., M. T. Russo, M. Crescenzi, M. Bignami and E. Dogliotti (2005). "The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells." Nucleic Acids Res **33**(1): 280-8.
- Pelletier, H., M. R. Sawaya, W. Wolfle, S. H. Wilson and J. Kraut (1996). "Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity." Biochemistry **35**(39): 12742-61.
- Pena-Diaz, J., M. Akbari, O. Sundheim, M. E. Farez-Vidal, S. Andersen, R. Sneve, D. Gonzalez-Pacanowska, H. E. Krokan and G. Slupphaug (2004). "Trypanosoma cruzi contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair." J Mol Biol **342**(3): 787-99.
- Polosina, Y. Y., T. A. Rosenquist, A. P. Grollman and H. Miller (2004). "'Knock down' of DNA polymerase beta by RNA interference: recapitulation of null phenotype." DNA Repair (Amst) **3**(11): 1469-74.
- Prakash, S., R. E. Johnson and L. Prakash (2005). "Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function." Annu Rev Biochem **74**: 317-53.

- Prasad, R., V. K. Batra, X. P. Yang, J. M. Krahn, L. C. Pedersen, W. A. Beard and S. H. Wilson (2005). "Structural insight into the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase mechanism." DNA Repair (Amst) **4**(12): 1347-57.
- Prasad, R., W. A. Beard, P. R. Strauss and S. H. Wilson (1998). "Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism." J Biol Chem **273**(24): 15263-70.
- Prasad, R., G. L. Dianov, V. A. Bohr and S. H. Wilson (2000). "FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair." J Biol Chem **275**(6): 4460-6.
- Prasad, R., R. K. Singhal, D. K. Srivastava, J. T. Molina, A. E. Tomkinson and S. H. Wilson (1996). "Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis." J Biol Chem **271**(27): 16000-7.
- Regis-da-Silva, C. G., J. M. Freitas, D. G. Passos-Silva, C. Furtado, L. Augusto-Pinto, M. T. Pereira, W. D. DaRocha, G. R. Franco, A. M. Macedo, J. S. Hoffmann, C. Cazaux, S. D. Pena, S. M. Teixeira and C. R. Machado (2006). "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation." Mol Biochem Parasitol **149**(2): 191-200.
- Richter, C., J. W. Park and B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-7.
- Rosa, S., P. Fortini, P. Karran, M. Bignami and E. Dogliotti (1991). "Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo." Nucleic Acids Res **19**(20): 5569-74.
- Russo, M. T., G. De Luca, P. Degan and M. Bignami (2007). "Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine." Mutat Res **614**(1-2): 69-76.
- Sanchez-Burgos, G., R. G. Mezquita-Vega, J. Escobedo-Ortegon, M. J. Ramirez-Sierra, A. Arjona-Torres, A. Ouaisi, M. M. Rodrigues and E. Dumonteil (2007). "Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice." FEMS Immunol Med Microbiol **50**(3): 333-41.
- Sawaya, M. R., H. Pelletier, A. Kumar, S. H. Wilson and J. Kraut (1994). "Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism." Science **264**(5167): 1930-5.
- Sawaya, M. R., R. Prasad, S. H. Wilson, J. Kraut and H. Pelletier (1997). "Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism." Biochemistry **36**(37): 11205-15.
- Saxowsky, T. T., G. Choudhary, M. M. Klingbeil and P. T. Englund (2003). "*Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes." J Biol Chem **278**(49): 49095-101.
- Saxowsky, T. T., Y. Matsumoto and P. T. Englund (2002). "The mitochondrial DNA polymerase beta from *Crithidia fasciculata* has 5'-deoxyribose phosphate (dRP) lyase activity but is deficient in the release of dRP." J Biol Chem **277**(40): 37201-6.
- Schoneck, R., O. Billaut-Mulot, P. Numrich, M. A. Ouaisi and R. L. Krauth-Siegel (1997). "Cloning, sequencing and functional expression of dihydroliipoamide

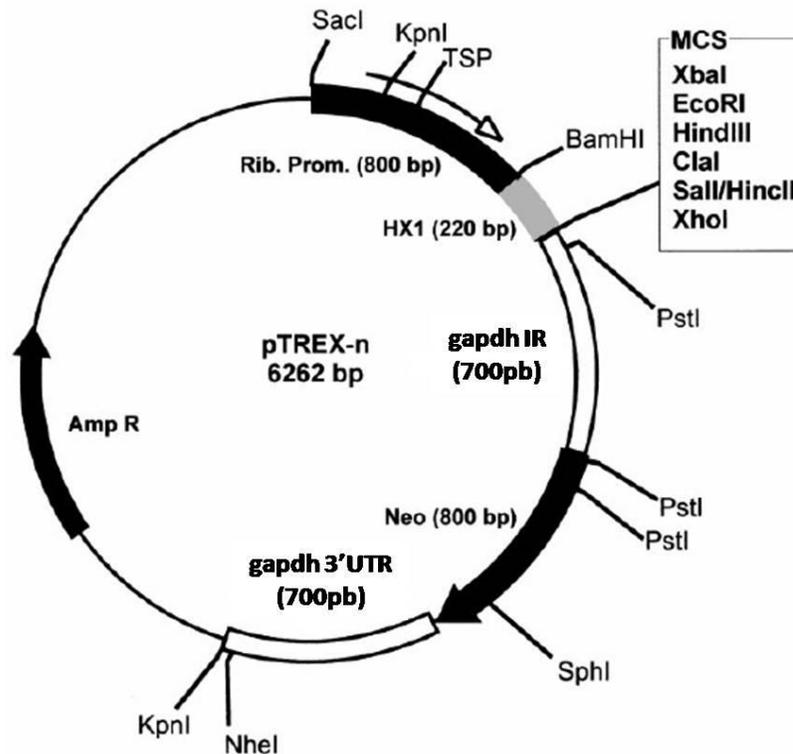
- dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*." Eur J Biochem **243**(3): 739-47.
- Shapiro, T. A. (1993). "Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7809-13.
- Shcherbakova, P. V., Y. I. Pavlov, O. Chilkova, I. B. Rogozin, E. Johansson and T. A. Kunkel (2003). "Unique error signature of the four-subunit yeast DNA polymerase epsilon." J Biol Chem **278**(44): 43770-80.
- Simonelli, V., M. D'Errico, D. Palli, R. Prasad, S. H. Wilson and E. Dogliotti (2009). "Characterization of DNA polymerase beta splicing variants in gastric cancer: the most frequent exon 2-deleted isoform is a non-coding RNA." Mutat Res **670**(1-2): 79-87.
- Singhal, R. K. and S. H. Wilson (1993). "Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive." J Biol Chem **268**(21): 15906-11.
- Sliwinski, T., P. Ziemia, Z. Morawiec, M. Kowalski, M. Zadrozny and J. Blasiak (2007). "Polymorphisms of the DNA polymerase beta gene in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **103**(2): 161-6.
- Slupphaug, G., B. Kavli and H. E. Krokan (2003). "The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage." Mutat Res **531**(1-2): 231-51.
- Slupska, M. M., W. M. Luther, J. H. Chiang, H. Yang and J. H. Miller (1999). "Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein." J Bacteriol **181**(19): 6210-3.
- Smart, D. J., J. K. Chipman and N. J. Hodges (2006). "Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine." DNA Repair (Amst) **5**(11): 1337-45.
- Sobol, R. W., J. K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R. K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky and S. H. Wilson (1996). "Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair." Nature **379**(6561): 183-6.
- Sobol, R. W., R. Prasad, A. Evenski, A. Baker, X. P. Yang, J. K. Horton and S. H. Wilson (2000). "The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity." Nature **405**(6788): 807-10.
- Sonoda, E., H. Hohegger, A. Saberi, Y. Taniguchi and S. Takeda (2006). "Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair." DNA Repair (Amst) **5**(9-10): 1021-9.
- Souza, W. (2008). "Electron microscopy of trypanosomes--a historical view." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(4): 313-25.
- Starcevic, D., S. Dalal and J. B. Sweasy (2004). "Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?" Cell Cycle **3**(8): 998-1001.
- Steitz, T. A. (1998). "A mechanism for all polymerases." Nature **391**(6664): 231-2.
- Struthers, L., R. Patel, J. Clark and S. Thomas (1998). "Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues." Anal Biochem **255**(1): 20-31.
- Stucki, M., B. Pascucci, E. Parlanti, P. Fortini, S. H. Wilson, U. Hubscher and E. Dogliotti (1998). "Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon." Oncogene **17**(7): 835-43.

- Sung, J. S. and B. Demple (2006). "Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA." FEBS J **273**(8): 1620-9.
- Taladriz, S., T. Hanke, M. J. Ramiro, M. Garcia-Diaz, M. Garcia De Lacoba, L. Blanco and V. Larraga (2001). "Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation." Nucleic Acids Res **29**(18): 3822-34.
- Teixeira, A. R., R. J. Nascimento and N. R. Sturm (2006). "Evolution and pathology in chagas disease--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(5): 463-91.
- Teixeira, S. M. and W. D. daRocha (2003). "Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae." Genet Mol Res **2**(1): 148-58.
- Tibayrenc, M. (1998). "Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach." Int J Parasitol **28**(1): 85-104.
- Torri, A. F. and P. T. Englund (1995). "A DNA polymerase beta in the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*." J Biol Chem **270**(8): 3495-7.
- Trivedi, R. N., X. H. Wang, E. Jelezcova, E. M. Goellner, J. B. Tang and R. W. Sobol (2008). "Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide." Mol Pharmacol **74**(2): 505-16.
- Turrens, J. F. (2004). "Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa." Mol Aspects Med **25**(1-2): 211-20.
- Uchiyama, Y., R. Takeuchi, H. Koderia and K. Sakaguchi (2009). "Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes." Biochimie **91**(2): 165-70.
- Van Remmen, H. and A. Richardson (2001). "Oxidative damage to mitochondria and aging." Exp Gerontol **36**(7): 957-68.
- Varadarajan, S., D. Shah, P. Dande, S. Settles, F. X. Chen, G. Fronza and B. Gold (2003). "DNA damage and cytotoxicity induced by minor groove binding methyl sulfonate esters." Biochemistry **42**(48): 14318-27.
- Vazquez, M. P. and M. J. Levin (1999). "Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector." Gene **239**(2): 217-25.
- Venegas, J. A., L. Aslund and A. Solari (2009). "Cloning and characterization of a DNA polymerase beta gene from *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Int **58**(2): 187-92.
- Visnes, T., M. Akbari, L. Hagen, G. Slupphaug and H. E. Krokan (2008). "The rate of base excision repair of uracil is controlled by the initiating glycosylase." DNA Repair (Amst) **7**(11): 1869-81.
- Wang, M., W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang and G. Iliakis (2006). "PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways." Nucleic Acids Res **34**(21): 6170-82.
- Wei, Y. H. and H. C. Lee (2002). "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging." Exp Biol Med (Maywood) **227**(9): 671-82.
- Westenberger, S. J., G. C. Cerqueira, N. M. El-Sayed, B. Zingales, D. A. Campbell and N. R. Sturm (2006). "*Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region." BMC Genomics **7**: 60.

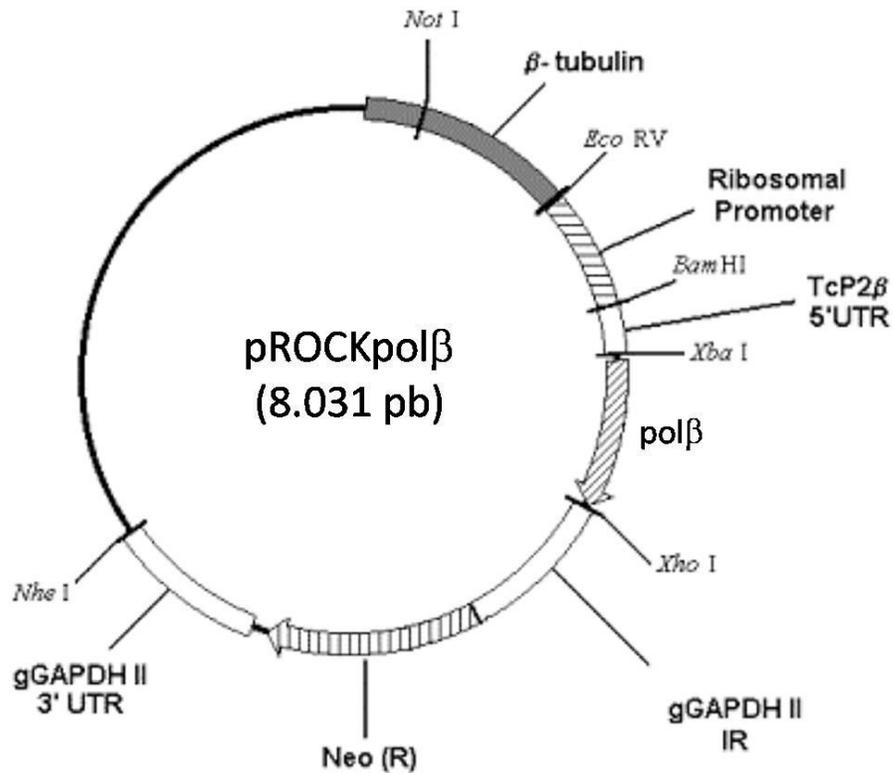
- Wilkinson, S. R., M. C. Taylor, D. Horn, J. M. Kelly and I. Cheeseman (2008). "A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5022-7.
- Wong, D. and B. Demple (2004). "Modulation of the 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase and DNA synthesis activities of mammalian DNA polymerase beta by apurinic/aprimidinic endonuclease 1." J Biol Chem **279**(24): 25268-75.
- Wood, R. D., M. Mitchell, J. Sgouros and T. Lindahl (2001). "Human DNA repair genes." Science **291**(5507): 1284-9.
- Yakes, F. M. and B. Van Houten (1997). "Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 514-9.
- Yang, W. and R. Woodgate (2007). "What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15591-8.
- Yoshimura, M., M. Kohzaki, J. Nakamura, K. Asagoshi, E. Sonoda, E. Hou, R. Prasad, S. H. Wilson, K. Tano, A. Yasui, L. Lan, M. Seki, R. D. Wood, H. Arakawa, J. M. Buerstedde, H. Hohegger, T. Okada, M. Hiraoka and S. Takeda (2006). "Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage." Mol Cell **24**(1): 115-25.
- Zharkov, D. O. and A. P. Grollman (2005). "The DNA trackwalkers: principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases." Mutat Res **577**(1-2): 24-54.
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc and A. G. Schijman (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(7): 1051-4.

## ***Anexo I***

Plasmídios pTREX e pROCKpol $\beta$



**Vetor pTREX-n.** Este vetor permite expressão transiente do gene de interesse em *T. cruzi* e carrega um espaçador ribossômico que é parte integrante do promotor de rRNA que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter. Também está presente o promotor de rRNA que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de HX1 que é um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*, derivado da região intergênica do gene TcP2 $\beta$ . Além disso, possui as regiões intergênica e 3'UTR do gene GAPDH II, que são sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do gene *Neo*, respectivamente. Também está presente a região codificadora para neomicina fosfotransferase (*Neo*) que confere resistência a neomicina e seu análogo G418. MCS, sítio múltiplo de clonagem. Figura adaptada de (Vazquez and Levin 1999).



**Vetor pROCKpolβ.** O vetor pROCK é usado para expressão permanente do gene de interesse. É composto por um fragmento do gene de beta-tubulina de *T. cruzi* que permite a integração do vetor linearizado por *Not I* no locus de β-tubulina no genoma do parasito por recombinação homóloga. Também está presente o promotor de rRNA que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de HX1 que é um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*, derivado da região intergênica do gene TcP2β. Além disso possui as regiões intergênica e 3'UTR do gene gGAPDH II, que são sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do gene *Neo*, respectivamente. Também está presente a região codificadora para neomicina fosfotransferase [*Neo (R)*] que confere resistência a neomicina e seu análogo G418.

## ***Anexo II***

Artigo publicado na revista *DNA Repair*