

Pedro Henrique Nascimento de Aguiar

Estresse oxidativo e lesões no DNA:  
papel da 8-oxoguanina na viabilidade  
do *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado

Coorientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Coorientadora: Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

Belo Horizonte  
Março 2013

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

## **TESE DE DOUTORADO**

Estresse oxidativo e lesões no DNA: papel da 8-oxoguanina na viabilidade do *Trypanosoma cruzi*

**Pedro Henrique Nascimento de Aguiar**

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado  
Coorientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade  
Coorientadora: Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

Tese apresentada ao  
Departamento de Bioquímica e  
Imunologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito para  
obtenção da titulação de Doutor em  
Biologia Molecular.

Belo Horizonte  
Março 2013

*“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.”*

Clarice Lispector

## Agradecimentos

Certamente este trabalho não teria sido concluído sem a ajuda, sugestões, críticas e cooperação de muitas pessoas. Tentarei enumerá-las e agradecer de alguma forma a estas pessoas e espero que consiga deixar claro o quanto foram importantes para mim.

Agradeço ao Prof. Carlos Renato por me receber no doutorado com um projeto estimulante e me orientar durante esses quatro anos. Por estar sempre disponível, propondo ideias, questionando, incentivando e escutando com paciência. As discussões durante esse período contribuíram muito para meu amadurecimento científico.

À minha coorientadora Luciana Andrade, que também me recebeu muito bem desde o início do doutorado, agradeço pelo olhar crítico, pelos ensinamentos de bancada, pelas conversas e sugestões. Obrigado por me ensinar tanta coisa sobre biologia celular e *T. cruzi*.

À minha segunda coorientadora Alessandra Guarneri, que está comigo há menos tempo, mas mesmo assim teve contribuição fundamental na minha formação. Agradeço pelo carinho com que sempre me recebeu no René e pela paciência em me ensinar a trabalhar com “coisas” maiores do que DNA, células e parasitos.

Agradeço aos pesquisadores Andréa Macedo, Glória Franco e Sérgio Pena, que contribuíram de diversas formas, com colaborações, sugestões e críticas essenciais ao meu trabalho. Principalmente agradeço à Glória pelo carinho e pelos ensinamentos que recebi desde a iniciação.

Agradeço à Prof. Fernanda Gadelha, ao Dr. Eduardo Peloso e ao Kiko pelos experimentos de Western Blotting na Unicamp.

À pesquisadora Leda Quércia e sua aluna Grazielle Ribeiro pela colaboração com a infecção em macrófagos.

À Neuza, Katita, Sabrina, Camila, Rúbia e Miroca que contribuem (ou contribuíram no passado) muito com a organização do laboratório, dando apoio técnico, permitindo a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do grupo de reparo: Anna Cláudia, Bruno Repolês, Ceres, Egídio, Isabela Mendes, Jarbas, João Pedro, Marianna, Paula, Sabrininha e Selma, obrigado por estarem sempre presentes deixando o dia de trabalho mais divertido. Agradeço pela grande amizade, sinceridade e cumplicidade nas horas difíceis.

Aos demais colegas e amigos do LGB: André, Carlos Santos, Elisângela, Helaine Grazielle, Heron, Mainá, Mariana Costa, Mariana Boroni, Michele Araújo, Priscila Grynberg, Sílvia, Thiago Mafra, Thomaz, Isabella Andrade, Ítalo, Joice, Marcela Segatto, Rodrigo, Tiago Bruno, Viviane, Daniele Durso, Maíra, Pricila, Raony, agradeço especialmente pelo carinho, pelas conversas, pelo apoio moral, pelos almoços em boa companhia, enfim, por todos os momentos que tornaram estes anos de LGB muito prazerosos.

Aos ex-integrantes do LGB que foram e continuam sendo muito especiais para mim, agradeço pelos ensinamentos, ajuda e companheirismo. Em especial Alice, Bruno Chamber, Carol Furtado, Carlos E. Calzavara, Carlos Gustavo, Chico Lobo, Danielle Gomes, Débora Aline, Hélder, Jorge, Leo Carnevalli, Lucas Secchim, Fernanda Kedhy, Marcela Drummond, Marina, Michele Barbi e Matheus Rajão, grandes amigas que fiz desde meus primeiros anos de LGB e espero levar por toda a vida.

Aos colegas do Laboratório Conceição Machado e LBCM, Andrea, Bárbara, Dina, Fábio, Letícia, Ludmila, Lucas, Josi, Matheus, Thalita, companheiros de sala de cultura, que me ajudaram muito desde o início.

Aos colegas do LATEC, principalmente Ju Rodrigues, Raquel e Roberta por me ensinarem pacientemente a lidar com barbeiros e camundongos.

Agradeço aos amigos da graduação em Biologia, que mesmo de longe estamos sempre torcendo uns pelos outros.

Aos amigos eternos do Colégio Santo Antônio, especialmente Bolinha, Parasita, Peixe e Pipoca, que não me abandonaram nem depois de meus longos sumiços.

Agradeço aos meus pais, pelos exemplos de moral, caráter, força de vontade e valores familiares que sempre me passaram. Obrigado também pelo carinho e o apoio para alcançar meus objetivos.

À minha irmã, avôs e avó, tios, primos, toda a família, agradeço pelo carinho e por sempre acreditarem em mim.

Finalmente, gostaria de agradecer às duas pessoas que estão sempre do meu lado, me apoiando ou me aturando, me ajudando ou atrapalhando (sempre por bons motivos, claro). Sem elas eu não seria metade da pessoa que me tornei hoje, e não teria alcançado este objetivo com tanta garra e determinação. Pois tudo que faço, só faz sentido se for para fazer estas pessoas felizes. Muito obrigado Débora e Giovana, simplesmente por existirem. Amo muito vocês.

## SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas .....	4
Lista de figuras: .....	6
Resumo .....	7
Abstract .....	8
1. Introdução .....	9
1.1. O estresse oxidativo .....	10
1.2. Danos oxidativos no DNA .....	11
1.2.1. A lesão 8-oxoguanina .....	12
1.3. O sistema de reparo por excisão de bases .....	14
1.3.1. A via de reparo a 8-oxoguanina .....	17
1.3.2. A superfamília Nudix hidrolase .....	19
1.4. O reparo por erros de pareamento e o reparo de 8-oxoG .....	20
1.5. O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.5.1. O processo de invasão celular e o ciclo do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado .....	24
1.5.2. A passagem do parasito pelo triatomíneo .....	28
1.5.3. O <i>T. cruzi</i> e o estresse oxidativo .....	28
1.5.4. Sistemas antioxidantes do <i>T. cruzi</i> .....	31
1.5.5. Sistemas de reparo de DNA em <i>T. cruzi</i> .....	32
2. Objetivos .....	41
2.1. Objetivo Geral .....	42
2.2. Objetivos Específicos .....	42
3. Metodologia .....	43
3.1. Superexpressão das proteínas TcMTH e MutT em <i>T. cruzi</i> CL Brener ..	44

3.1.1.	Amplificação e clonagem no vetor pGEM-T®.....	44
3.1.2.	Sequenciamento do gene TcMTH.....	46
3.1.3.	Análise <i>in silico</i> da TcMTH.....	46
3.1.4.	Clonagem no vetor de expressão pROCK-NEO.....	47
3.1.5.	Transfecção e seleção dos parasitos superexpressores.....	48
3.2.	Cultura dos parasitos epimastigotas.....	49
3.3.	Extração de RNA e ensaio de RT PCR.....	49
3.4.	Curva de sobrevivência a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.5.	Ensaio de QPCR.....	51
3.5.1.	Extração de DNA de alto peso molecular.....	51
3.5.2.	Dosagem das amostras de DNA.....	51
3.5.3.	Amplificação por QPCR.....	52
3.5.4.	Análise dos resultados.....	54
3.6.	Metaciclogênese <i>in vitro</i> dos parasitos.....	55
3.7.	Cultura de células e parasitos tripomastigotas.....	55
3.8.	Ensaio de infecção <i>in vitro</i> .....	57
3.9.	Imunofluorescência.....	58
3.10.	Análise da expressão de proteínas da rede antioxidante.....	59
3.10.1.	Preparo de extratos proteicos.....	59
3.10.2.	Ensaio de Western Blot.....	60
3.11.	Experimentos de infecção <i>in vivo</i> .....	61
3.12.	Análise experimental.....	62
4.	Resultados.....	63
4.1.	Confirmação da expressão heteróloga de MutT em <i>T. cruzi</i> .....	64
4.2.	A expressão heteróloga de MutT em <i>T. cruzi</i> não altera o crescimento das epimastigotas mas aumenta a sobrevivência a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
4.3.	Epimastigotas que expressam MutT apresentam menos lesões no DNA nuclear.....	66



4.4. A expressão heteróloga da MutT aumenta o crescimento intracelular <i>in vitro</i> do <i>T. cruzi</i> .....	68
4.5. Enzimas antioxidantes têm seus níveis influenciados pela expressão de MutT .....	73
4.6. A multiplicação dos parasitos <i>in vivo</i> é aumentada pela expressão da MutT de <i>E. coli</i> .....	75
4.7. Sequenciamento e análise <i>in silico</i> do gene TcMTH .....	77
4.8. Obtenção de parasitos que superexpressam o gene TcMTH.....	79
4.9. A superexpressão de TcMTH aumenta a sobrevivência dos parasitos a tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	83
5. Discussão .....	85
6. Conclusões e Perspectivas.....	99
7. Bibliografia .....	101
8. Anexos .....	115

## Lista de siglas e abreviaturas

5-hidroxi-C	5-hidroxicitosina
5-hidroxi-U	5-hidroxiuracila
8-oxo-dGMP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
8-oxo-dGTP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
8-oxoA	7,8-dihidro-8-oxoadenina
AP	Apurínico/apirimidínico
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo por excisão de bases
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNMP	desorribonucleotídeos-monofosfatos
dNTP	desoxirribonucleotídeos-trifosfatos
DSB	Quebra de fita dupla de DNA
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
Eteno-A	etenoadenina
faPy-A	4,6-diamino-5-formamidopirimidina
faPy-G	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
GPX	Peroxidase glutationa-dependente
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HR	Recombinação homóloga
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfato
LIT	<i>Liver infusion tryptone</i>
MMR	Reparo de erros de pareamento
MTH	Homólogo de MutT
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPHox	NADPH oxidase

O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
<sup>•</sup> OH	Radical hidroxila
OGG	8-oxoguanina DNA glicosilase
PARP	poli ADP-ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLC	fosfolipase C
PPi	pirofosfato inorgânico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
QPCR	PCR quantitativa
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFBI	Soro fetal bovino inativado
SOD	Superóxido dismutase
T(SH) <sub>2</sub>	Tripanotiona
TAU	<i>Triatomine artificial urine</i>
TcAPX	Hemoperoxidase ascorbato-dependente
TcCPX	Triparedoxina peroxidase citosólica
TcMPX	Triparedoxina peroxidase mitocondrial
TCTs	Tripomastigotas de cultura de células
TLS	Síntese translesão
TR	Tripanotiona redutase
TS	Tripanotiona sintetase
TXN	Triparedoxina
UDG	Uracila DNA glicosilase

## Lista de figuras:

Figura 1: A lesão 8-oxoguanina e seus tipos de pareamento.....	13
Figura 2: Via de reparo por excisão de bases (BER). ....	15
Figura 3: A via de reparo a 8-oxoguanina. ....	18
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
Figura 5: Processo de invasão e replicação intracelular do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado .....	26
Figura 6: Desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado.....	29
Figura 7: Possível consequência da ausência de um homólogo de MutT em um organismo.....	37
Figura 8: Possível ortólogo de MTH em <i>T. cruzi</i> .....	38
Figura 9: Frequência de mutação de bactérias complementadas com TcMTH.....	39
Figura 10: Confirmação da expressão heteróloga da MutT por RT-PCR.....	65
Figura 11: Curvas de crescimento e sobrevivência em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de <i>T. cruzi</i> . ....	67
Figura 12: Análise das lesões no DNA de parasitos pROCK comparados com MutT através de ensaio QPCR. ....	69
Figura 13: Experimentos de infecção em fibroblastos. ....	70
Figura 14: Experimento de infecção em fibroblastos com tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	72
Figura 15: Análise da expressão das enzimas TcCPX e TcMPX nos parasitos pROCK e MutT. ....	74
Figura 16: Parasitemia dos animais infectados com parasitos WT ou MutT. ....	76
Figura 17: Amplificação e clonagem de TcMTH. ....	78
Figura 18: Sequência da TcMTH, possível homólogo de MutT em <i>T. cruzi</i> . ....	80
Figura 19: A proteína TcMTH e seus ortólogos em outros organismos.....	81
Figura 20: Clonagem de TcMTH no vetor de expressão pROCK.....	82
Figura 21: Curva de sobrevivência em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de <i>T. cruzi</i> . ....	84

## Resumo

Uma das consequências do estresse oxidativo é a formação de lesões no DNA, que podem resultar em instabilidade genômica e levar a morte celular. A guanina é a base mais vulnerável à oxidação devido ao seu baixo potencial redox, e a 8-oxoguanina (8-oxoG) é a lesão mais abundante. Esta característica faz da 8-oxoG um bom biomarcador celular para indicar a extensão de dano oxidativo. Se não for reparada, a 8-oxoG pode parear com adenina e causar transversão de G:C para T:A. Quando a 8-oxoG é inserida durante a replicação do DNA ela pode gerar quebras de fita dupla, o que torna esta lesão particularmente deletéria. Todos os organismos evoluíram mecanismos de reparo para lidar com 8-oxoG. Em eucariotos superiores, as enzimas OGG1, MUTYH e MTH (Homólogo de MutT) constituem a via de reparo a 8-oxoG. *Trypanosoma cruzi* precisa lidar com várias situações de estresse oxidativo a que é exposto, como o ambiente intracelular no hospedeiro mamífero e o trato intestinal do triatomíneo onde o parasito replica. Desde a publicação do genoma do parasito, algumas destas enzimas de reparo de DNA foram caracterizadas. No entanto, alguns elementos importantes da maquinaria de reparo de DNA, como um homólogo de MutT, não foram identificados. A enzima MutT é responsável pela hidrólise de 8-oxo-dGTP para 8-oxo-dGMP no pool de nucleotídeos, prevenindo a incorporação destes nucleotídeos oxidados no DNA. Isso estimulou nosso grupo a transformar parasitos *T. cruzi* CL Brener com o gene *mutT* de *Escherichia coli* para investigar a importância da 8-oxoG durante o ciclo de vida do parasito. Na forma epimastigota, as populações de parasitos recombinante e selvagem apresentaram crescimento semelhante em condições normais, mas as células que expressam MutT foram mais resistentes ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, demonstramos por experimentos de QPCR que a expressão da MutT de *E. coli* em *T. cruzi* reduz a quantidade de lesões no DNA, em relação às células controle. A população de parasito recombinante também mostrou crescimento aumentado após 48 horas de infecção em fibroblastos quando comparada às células do tipo selvagem, assim como parasitemia aumentada em camundongos Suíços. Além disso, demonstramos por experimentos de western blotting que a expressão heteróloga de MutT pode influenciar o nível das enzimas peroxidases citosólica e mitocondrial (CPX e MPX) do parasito. Estes resultados mostram a importância do sistema de reparo da 8-oxoG para a viabilidade celular de *T. cruzi*. Neste trabalho também foi possível realizar a caracterização da proteína TcMTH, a homóloga de MutT de *T. cruzi*. A sequência do gene foi caracterizada *in silico*, e parasitos que superexpressam a TcMTH mostraram maior resistência ao tratamento com peróxido de hidrogênio.

## Abstract

The formation of DNA lesions is one of the consequences of oxidative stress, which might result in genomic instability and lead to cell death. Guanine is the base that is most susceptible to oxidation due to its low redox potential, and 8-oxoguanine (8-oxoG) is the most abundant lesion. This characteristic makes 8-oxoG a good cellular biomarker to indicate the extent of oxidative stress. If not repaired, the 8-oxoG could pair with adenine and cause G:C to T:A transversion. When 8-oxoG is inserted during the DNA replication it could generate double strand breaks, which makes this lesion particularly deleterious. All organisms evolved repair mechanisms to deal with 8-oxoG. In higher eukaryotes, the enzymes OGG1, MUTYH and MTH (MutT Homologous) constitute the 8-oxoG repair pathway. *Trypanosoma cruzi* needs to deal with various oxidative stress situations that it is exposed to, such as the mammalian intracellular environment and the triatomine insect gut where it replicates. Since the publication of the parasite's genome, some of this DNA repair enzymes have been characterized. However, some important elements of the DNA Repair machinery, such as a MutT homolog, have not been identified. The MutT enzyme is responsible for the hydrolysis of 8-oxo-dGTP to 8-oxo-dGMP in the nucleotide pool, preventing the incorporation of these oxidized nucleotides in DNA. This prompted our group to transform *T. cruzi* CL Brener clone with the *Escherichia coli mutT* gene to investigate the importance of the 8-oxoG during the parasite's life cycle. In the epimastigote form, the recombinant and wild type strains showed similar growth in normal conditions, but MutT expressing cells were more resistant to hydrogen peroxide treatment. Furthermore, we demonstrated by QPCR experiments that *E. coli* MutT expression in *T. cruzi* reduces the amount of nuclear DNA lesions, in comparison to control cells. The recombinant strain also showed statistically significant increase in growth after 48 hours of infection in fibroblasts when compared to wild type cells, as well as increased parasitemia in Swiss mice. Additionally, we demonstrated by western blotting experiments that MutT heterologous expression can influence the parasites' mitochondrial and cytosolic peroxidase enzymes (MPX and CPX) protein levels. These results show the importance of the 8-oxoG repair system for *T. cruzi* cell viability. This study also accomplished the characterization of TcMTH, the *T. cruzi* MutT homolog. The gene sequence was studied *in silico*, and parasites overexpressing TcMTH showed increased resistance to hydrogen peroxide treatment.

ATGGCCGCGATGACTGOGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

# 1. Introdução

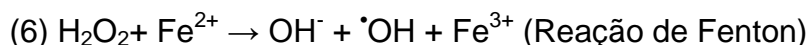
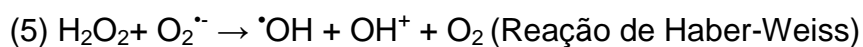
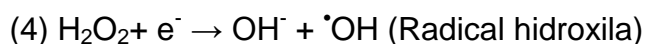
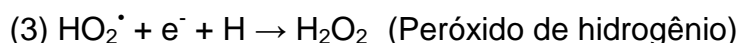
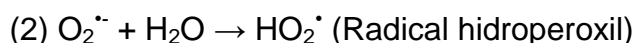
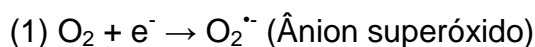
---

GCTCCACACCGATTCCGCATTTCCGTTCTTCTTCCGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCOGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCCGGTCOGATGTTT  
GCCCCACAAAAATAACACAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTTGTTTCCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTCCGCCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

## 1.1. O estresse oxidativo

Estresse oxidativo em sistemas biológicos pode ser definido como a situação em que o balanço entre oxidantes e antioxidantes foi perdido, resultando em níveis elevados de dano celular (Betteridge, 2000). A principal fonte de estresse oxidativo nas células são as espécies reativas de oxigênio (ROS).

Alguns exemplos de maior relevância fisiológica de ROS são: peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e radicais hidroxilas ( $\cdot\text{OH}$ ). Os dois últimos podem ser classificados como radicais livres verdadeiros, pois apresentam elétrons não pareados na camada de valência. Estas moléculas são altamente reativas e podem sofrer reações redox interagindo com moléculas a sua volta para voltar a uma condição mais estável. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é definido como um agente pró-oxidante não-radical. Apesar de sua baixa reatividade, o composto  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem papel importante na geração de dano oxidativo, pois ele pode se difundir através de membranas biológicas e pode gerar o radical  $\cdot\text{OH}$  através das reações de Haber-Weiss (participação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ou Fenton (catalisada por  $\text{Fe}^{2+}$ ). Este radical  $\cdot\text{OH}$  não se difunde do local gerado e, embora apresente meia-vida curta ( $10^{-9}$  s), pode causar vários danos a macromoléculas ao seu redor como aminoácidos, carboidratos, lipídios e, finalmente, ácidos nucleicos (Novo & Parola, 2008). A série de reações abaixo mostra como as ROS podem ser produzidas a partir da redução do oxigênio molecular:





Estas espécies reativas podem ser geradas a partir de fontes endógenas ou exógenas. Sendo que as principais fontes endógenas são a fosforilação oxidativa na mitocôndria, o metabolismo do citocromo P450, os peroxissomos, as enzimas lipoxigenases e NADPH oxidases (Klaunig & Kamendulis, 2004).

Muitos estudos sugerem que a maior parte das ROS produzidas intracelularmente é derivada da mitocôndria. Estes radicais livres seriam produzidos principalmente em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons: no complexo I (NADH desidrogenase) e no complexo III (ubiquinona-citocromo c redutase). O ânion superóxido seria produzido pela redução do  $O_2$  nestes complexos, em seguida este poderia ser convertido em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase (SOD) mitocondrial (Cadenas & Davies, 2000).

ROS também podem ser produzidas por vários processos exógenos: como uma consequência de radiação ionizante, luz ultravioleta, toxinas do ambiente, quimioterápicos e citocinas inflamatórias (Finkel & Holbrook, 2000).

A interação de ROS e outros radicais livres relacionados a estresse oxidativo com macromoléculas de relevância biológica pode ter como consequência danos citotóxicos, ou contribuir para regulação redox e sinalização (Cadenas & Davies, 2000; Winterbourn, 2008). Ácidos graxos poli-insaturados em membranas fosfolipídicas podem sofrer peroxidação dos lipídios e subsequentemente degradação e fragmentação quando interagem com ROS. Proteínas em interação com ROS podem ser modificadas de diversas formas, como: oxidação de resíduos de aminoácidos e formação de ligações dissulfeto intra-moleculares. Mas uma das mais dramáticas consequências do estresse oxidativo é a formação de lesões no DNA, que pode resultar em instabilidade genômica e levar a morte celular (revisado por Maynard *et al.*, 2009).

## 1.2. Danos oxidativos no DNA

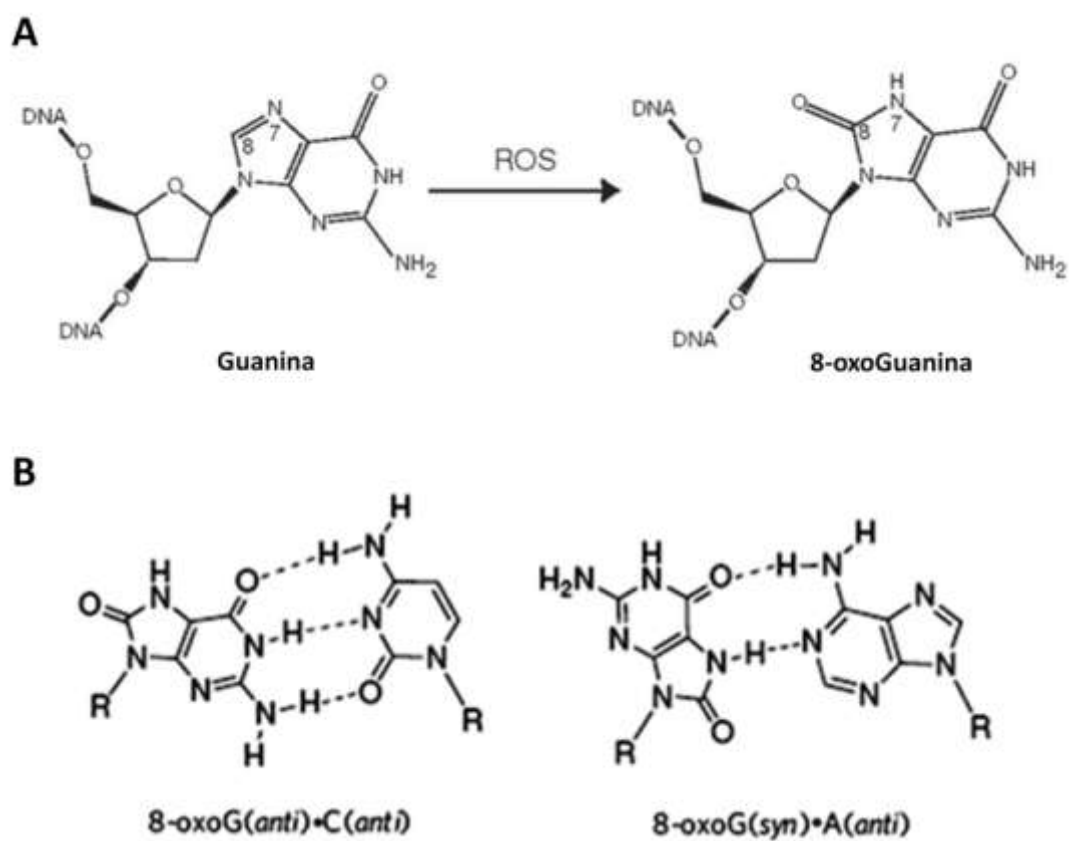
A interação de ROS com o DNA pode gerar uma enorme variedade de danos, tais como bases oxidadas, sítios abásicos, danos ao esqueleto de carbono, quebras de fitas simples ou duplas (DSBs, do inglês *Double-Strand Breaks*), e cross-links DNA-proteínas (Van Loon *et al.*, 2010). Considerando a modificação de bases, a

oxidação representa a maior causa de dano ao DNA, sendo estimada a formação de 10000 bases oxidadas por dia por célula de mamífero (Lindahl & Wood, 1999). Foram encontrados mais de 100 tipos diferentes de modificações oxidadas nas bases de DNA no genoma mamífero, porém, o baixo potencial redox da guanina (G) torna esta base particularmente vulnerável à oxidação (Dizdaroglu, 1991; David *et al.*, 2007). Em condições de estresse oxidativo, lesões do tipo 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (faPy-G) também podem atingir altas taxas de formação. Outras lesões oxidativas muito comuns são: 7,8-dihidro-8-oxoadenina (8-oxoA); uracila glicol; timina glicol; 5-hidroxicitosina (5-hidroxi-C); 5-hidroxiuracila (5-hidroxi-U); etenoadenina (eteno-A) e 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (faPy-A) (Van Loon *et al.*, 2010). Estas lesões no DNA podem causar mutações pontuais ou até mesmo paradas na forquilha de replicação que podem resultar em instabilidade genômica, levando a morte da célula ou oncogêneses (Hoeijmakers, 2001).

### 1.2.1. A lesão 8-oxoguanina

O principal produto da oxidação da G é 7,8-dihidro-8-oxoguanina (ou simplesmente 8-oxoguanina, 8-oxoG). Esta base oxidada surge pela introdução de um grupo oxo no carbono na posição 8 (C8) e um átomo hidrogênio no nitrogênio da posição 7 (N7) (Figura 1A). O baixo potencial redox da guanina torna esta lesão a mais abundante, e talvez por este mesmo motivo, a mais estudada das lesões oxidativas do DNA (Van Loon *et al.*, 2010). Estima-se que sejam formadas aproximadamente  $10^3$  lesões 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) por dia em uma célula humana em condições normais, e este número pode chegar a  $10^5$  lesões por dia em células de tecidos cancerosos. Estes fatores contribuíram para que a base modificada 8-oxoG seja usada frequentemente como um biomarcador celular para indicar a extensão do dano por estresse oxidativo (Neeley & Essigmann, 2006).

A 8-oxoguanina na conformação *syn* é particularmente mutagênica, pois consegue mimetizar funcionalmente uma timina e assim pode parear erroneamente com uma adenina (Figura 1B). Foi demonstrado que durante a replicação a formação do par 8-oxoG(*syn*):A(*anti*) causa menos distorções no molde de DNA do que a formação do par 8-oxoG(*anti*):C(*anti*) (Hsu *et al.*, 2004). Essas características



**Figura 1: A lesão 8-oxoguanina e seus tipos de pareamento.**

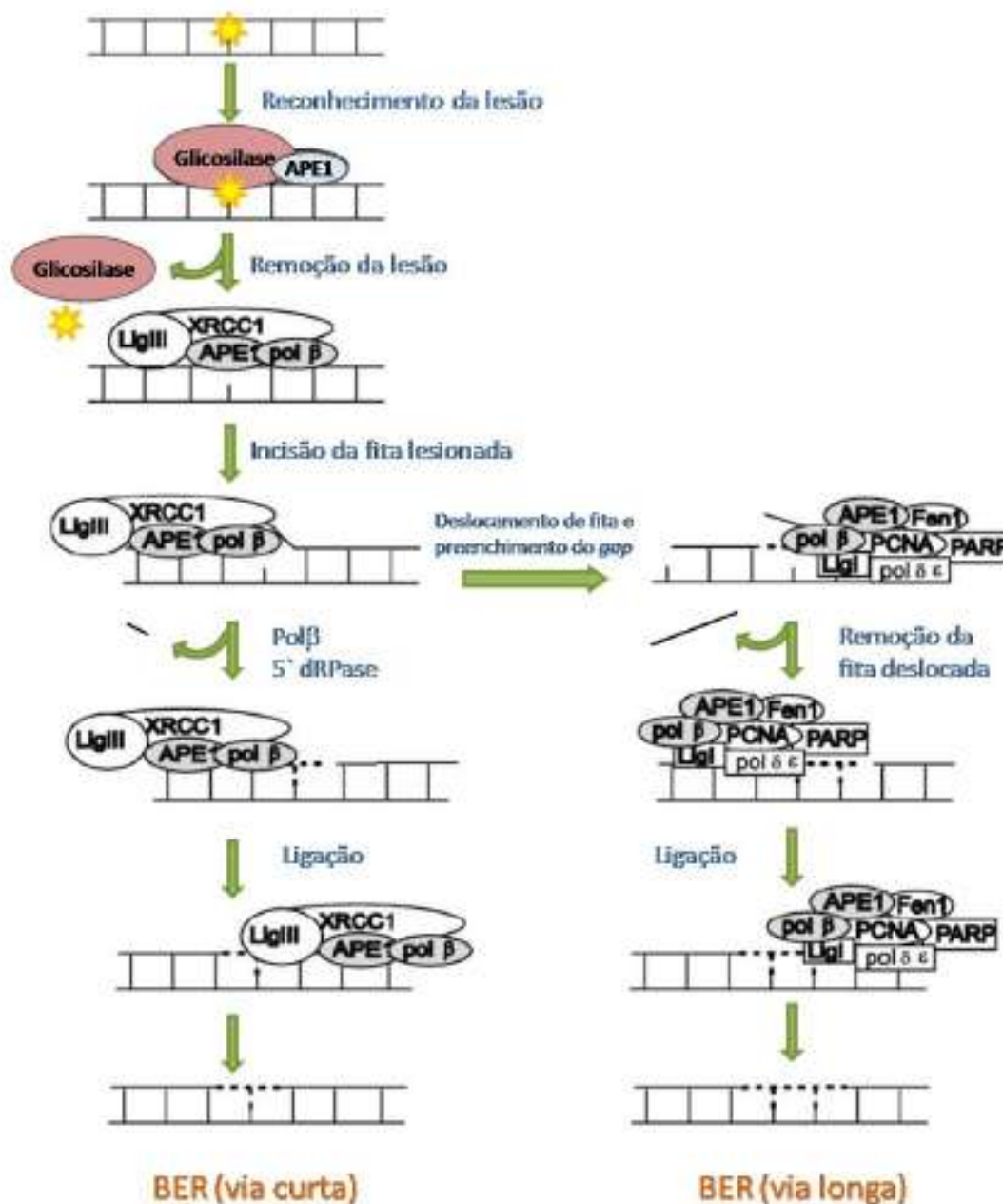
(A) A base oxidada 8-oxoG pode ser formada a partir da Guanina pela ação de ROS, e (B) esta base pode parear com Citosina na conformação *anti* ou executar um pareamento errôneo com Adenina na conformação *syn*.

estruturais permitem a passagem dessa lesão por DNA polimerases replicativas, e levam a uma maior propensão a erro, com a inserção de uma adenina no lugar de uma citosina frente a 8-oxoG. Quando essa lesão não é corretamente removida do DNA, podem ocorrer então mutações do tipo transverso G:C para T:A (David *et al.*, 2007). Além disso, quando ocorre a formação de muitas lesões 8-oxoG no DNA e as mesmas encontram-se muito próximas uma das outras, a capacidade de reparo da célula pode não ser suficiente. Isto pode ser letal para a célula, pois resulta na formação de intermediários que não puderam ser totalmente reparados e subsequentemente na formação de DSBs (Foti *et al.*, 2012).

### 1.3. O sistema de reparo por excisão de bases

O reparo por excisão de bases (BER) é a principal via de reparo de DNA para o processamento de lesões que modificam bases individuais, mas não causam grandes modificações na estrutura da dupla hélice. Essas modificações seriam resultantes de oxidação, alquilação e desaminação de bases, sendo que, a oxidação representa o principal fator endógeno de danos ao DNA, como dito anteriormente. Esta via pode ser resumida nos seguintes passos: reconhecimento e remoção da base modificada ou mal-pareada, excisão do sítio abásico (apurínico-apirimidínico, AP), preenchimento do *gap* de DNA e religamento da fita reparada (Figura 2) (revisado por Robertson *et al.*, 2009).

O passo de reconhecimento e remoção da base danificada é catalisado por uma DNA glicosilase. Esta deve ser específica para a base modificada a ser reparada, como por exemplo, OGG1 (8-oxoG DNA glicosilase) que reconhece bases 8-oxoG, e UDG (uracila DNA glicosilase) que remove bases uracila do DNA (Zharkov & Grollman, 2005). O sítio abásico (ouapurínico/apirimidínico, AP) gerado pela DNA glicosilase pode ser processado de duas maneiras diferentes: no caso de envolvimento de uma DNA glicosilase bifuncional, a atividade 3' AP liase intrínseca da enzima cliva o esqueleto de DNA a 3' do sítio AP; se a DNA glicosilase for monofuncional, uma enzima AP endonuclease catalisa a incisão da fita lesionada, deixando um terminal 3'-OH e um grupo desoxirribose-fosfato (5'-dRP) na outra extremidade (Baute & Depicker, 2008). A extremidade não convencional criada nesses dois casos precisa ser processada para formar uma extremidade 3'OH convencional e permitir a posterior síntese de DNA por uma DNA polimerase. A



**Figura 2: Via de reparo por excisão de bases (BER).**

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

extremidade 3' criada por glicosilases bifuncionais é removida pela atividade diesterase 3' de AP endonucleases (Izumi *et al.*, 2000), e a extremidade 5'-dRP gerada pela AP endonuclease após a ação de glicosilases monofuncionais é removida pela atividade 5'dRPase da DNA polimerase beta ( $Pol\beta$ ) (Matsumoto & Kim, 1995).

Após o processamento da extremidade 3' não convencional, a via pode seguir com o preenchimento do *gap* e religamento por uma de duas subvias diferentes: via curta (*short-patch BER*), mecanismo mais comum, onde apenas 1 nucleotídeo é substituído, ou via longa (*long-patch BER*), onde 2 a 13 nucleotídeos são substituídos. A via curta consiste na incorporação de nucleotídeos no DNA pela  $Pol\beta$  e ligação pela Ligase3 (LIG3), esta via tem os passos coordenados pela XRCC1 (Kubota *et al.*, 1996). Na via longa, foi relatado que a  $Pol\beta$  também incorpora o primeiro nucleotídeo (Podlutzky *et al.*, 2001), mas o alongamento e deslocamento da fita são catalisados pelas polimerases delta ( $Pol\delta$ ) ou épsilon ( $Pol\epsilon$ ) (Frosina *et al.*, 1996). Este processo cria um fragmento deslocado de 2 a 13 bases da fita anterior (denominado *flap*). A estrutura *flap* criada precisa ser removida pela enzima endonuclease FEN1 (*Flap structure-specific endonuclease 1*) para o posterior ligamento da fita recém-sintetizada pela ligase 1 (LIG1) (Kim *et al.*, 1998). A via longa do BER também tem o envolvimento das proteínas PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que interage e coordena as DNA polimerases e FEN1 (Gary *et al.*, 1999), além de PARP (poli ADP-ribose polimerase), que reconhece lesões no DNA, se liga a elas e estimula o deslocamento da fita sintetizando PAR (poly ADP-ribose) e facilitando o acesso da maquinaria de reparo ao local (D'Amours *et al.*, 1999).

O mecanismo que indica se o BER deverá seguir pela via curta ou longa em um evento de reparo ainda não foi completamente elucidado. Petermann e colaboradores (2003) sugeriram que a mudança entre a via curta ou longa do BER depende da concentração relativa de ATP próximo do sítio AP. Entretanto, Klungland & Lindahl (1997) mostraram que se o intermediário 5'dRP produzido pela atividade da AP endonuclease for eficientemente removido pela  $Pol\beta$ , o BER segue pelo mecanismo curto. No entanto, se o dRP não for removido a via segue pelo mecanismo longo, provavelmente para evitar a criação de um *nick* que não pode ser ligado por uma DNA ligase.

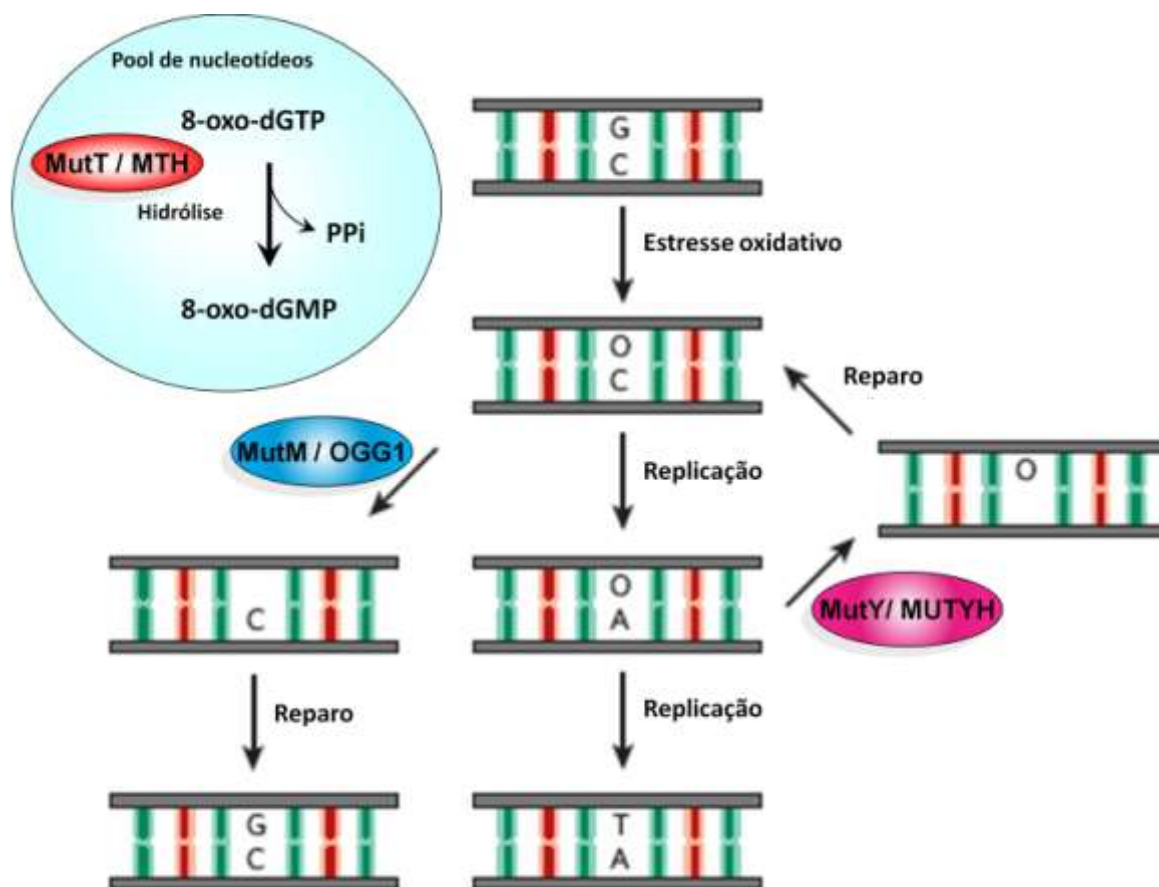
### 1.3.1. A via de reparo a 8-oxoguanina

A via de reparo a 8-oxoG (também conhecida como Sistema GO) é composta pelas enzimas MutM (também conhecida como Fpg), MutY e MutT em bactérias e as correspondentes em eucariotos OGG1, MUTYH e MTH1 (Michaels & Miller, 1992; Barnes & Lindahl, 2004; David *et al.*, 2007) (Figura 3). A enzima MutM de bactérias, ou 8-oxoguanina Glicosilase (OGG1) em eucariotos, é uma DNA glicosilase bifuncional que reconhece e remove especificamente a lesão 8-oxoG quando pareada a citosina. Após a remoção da base oxidada, o sítio AP formado será processado por outras enzimas da via do BER e o par G:C é reestabelecido (Boiteux *et al.*, 1987; van der Kemp *et al.*, 1996).

No entanto, se a remoção da 8-oxoG pela MutM (OGG1) não ocorrer e a replicação acontecer, pode ser formado um par incorreto 8-oxoG:A, considerando que DNA polimerases replicativas incorporam preferencialmente adenina frente a 8-oxoG (Hsu *et al.*, 2004). Então a glicosilase MutY (MUTYH) reconhece o par de bases resultante 8-oxoG:A e remove a adenina pareada erroneamente (Michaels *et al.*, 1990). O processamento subsequente do sítioapurínico por outras enzimas de reparo de DNA criam um par 8-oxoG:C (uma vez que a polimerase envolvida no reparo incorpora C frente a 8-oxoG, preferencialmente) que é substrato para MutM (OGG1) (Shibutani *et al.*, 1991).

Quando 8-oxo-dGTP formado no pool de nucleotídeos é erroneamente incorporado frente à adenina no molde de DNA, a ação da glicosilase MutY favorece a fixação da transverção AT → CG, pois remove a base correta do par 8-oxoG:A, a adenina. Por este motivo, torna-se essencial a eliminação de nucleotídeos oxidados, principalmente 8-oxo-dGTPs, do pool de nucleotídeos. A enzima MutT (MTH1), da superfamília das Nudix hidrolases, realiza esta função, hidrolizando 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP. Esta enzima remove a 8-oxo-dGTP do pool de nucleotídeos impedindo sua incorporação no DNA pelas DNA polimerases (Figura 3) (Maki & Sekiguchi, 1992; Sakumi *et al.*, 1993).

O sistema GO teve sua importância evidenciada pelo elevado fenótipo mutador apresentado por *E. coli* deficientes nos genes *mutM*, *mutY* e *mutT*. Foi demonstrado que as transversões GC→TA e AT→CG são até 800 vezes mais



**Figura 3: A via de reparo a 8-oxoguanina.**

A lesão 8-oxoG (O) pode causar transversões de G:C para T:A quando não removida do DNA, como demonstrado na via central da figura. As enzimas MutM, MutY e MutT (OGG1, MUTYH e MTH em eucariotos) compõem a via de reparo a esta lesão. A glicosilase OGG1 remove 8-oxoG do par 8-oxoG:C, e a MUTYH retira a adenina quando esta é inserida frente uma 8-oxoG após a replicação. Os passos subsequentes da via de reparo por excisão de bases estão resumidos como “Reparo”. A enzima MutT tem papel importante na prevenção da incorporação de 8-oxoG através da hidrólise de 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos (Adaptado de David *et al.*, 2007).



frequentes em bactérias que apresentam as deleções *mutM*- e *mutY*- quando comparadas às células selvagens (Michaels *et al.*, 1992). A frequência de mutações pode ser até 1000 vezes maior em relação às células selvagens quando a *E. coli* é mutante para a MutT (*mutT*-) (Akiyama *et al.*, 1987).

### 1.3.2. A superfamília Nudix hidrolase

Nudix hidrolase é uma superfamília de enzimas encontradas em mais de 250 espécies, incluindo vírus, bactérias, archae e eucariotos. Estas enzimas necessitam de um cátion divalente ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) para sua atividade e catalisam a hidrólise de **NU**cleosídeos **D**ifosfatos ligados a outras partes, **X** (Bessman *et al.*, 1996). Enzimas desta superfamília são caracterizadas por um motivo de 23 resíduos altamente conservados conhecido como *Nudix box*,  $GX_5EX_7REUXEEXGU$ , onde U são resíduos hidrofóbicos volumosos (Ile, Leu ou Val) e X pode ser qualquer resíduo. O *Nudix Box* forma um motivo estrutural loop –  $\alpha$ -hélice – loop que funciona como sítio calítico e de ligação a metal. Os substratos para as nudix hidrolases podem ser nucleosídeos trifosfatos intactos ou com danos oxidativos, açúcar-nucleotídeo, dinucleosídeos polifosfatos, RNA capeado e coenzimas dinucleotídeos. A especificidade do substrato é usada para definir famílias menores dentro desta superfamília. Em quase todos os casos estudados, a hidrólise do substrato catalisada ocorre por substituição nucleofílica no fósforo. Estas enzimas, portanto, realizam a remoção destes compostos, desempenhando papéis de proteção, regulação e sinalização no metabolismo (Mildvan *et al.*, 2005).

A enzima MutT de *E. coli* e seus homólogos (MTH, do inglês **MutT Homolog**) pertencem a superfamília de enzimas Nudix. Estas enzimas formam uma família menor de nucleosídeo-trifosfato pirofosfohidrolases, que catalisam a hidrólise de nucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos-trifosfatos (dNTP) formando desoxirribonucleotídeos-monofosfato (dNMP) e o pirofosfato inorgânico (PPi) (Fowler & Schaaper, 1997). O melhor substrato para MutT *in vitro* é a 8-oxo-dGTP, sendo assim, foi proposto que seu papel biológico é remover este nucleotídeo mutagênico impedindo sua incorporação errônea frente uma adenina durante a replicação do DNA (Maki *et al.*, 1992). Esta enzima já teve sua função e estrutura extensamente

caracterizadas, e talvez seja a mais estudada entre as Nudix hidrolases (Akiyama *et al.*, 1987; Fowler *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2004; Setoyama *et al.*, 2011).

Anteriormente, todas as enzimas que apresentavam o domínio Nudix eram incluídas na família MutT, pois as primeiras proteínas desta superfamília que foram caracterizadas participavam na prevenção de mutações no DNA, considerando o fenótipo apresentado pelos organismos depletados destas enzimas (Koonin, 1993). Posteriormente, o motivo Nudix foi identificado em enzimas com especificidade de substrato diferentes, não necessariamente relacionadas à prevenção de mutações, e então o nome MutT tornou-se específico para uma sub-família, e o nome Nudix foi adotado para identificar a superfamília (Bessman *et al.*, 1996).

#### **1.4. O reparo por erros de pareamento e o reparo de 8-oxoG**

Outra via de reparo de DNA que pode ter um papel na resposta a dano oxidativo no DNA é o reparo por erros de pareamento (MMR, do inglês *mismatch repair*). O MMR é uma via de reparo que corrige bases mal pareadas no DNA após a replicação, aumentando a fidelidade da replicação em aproximadamente 1000 vezes. Esta via tem papel importante na manutenção da integridade do genoma em todos os organismos vivos. Células com mutações em genes do MMR apresentam fenótipo mutatório caracterizado por altas taxas de mutações espontâneas e instabilidade de sequências de microsátélites (revisado por Hsieh & Yamane, 2008).

Esta via teve seus aspectos fundamentais altamente conservados através da evolução, apesar do número e natureza das proteínas envolvidas no mecanismo variarem em procariotos e eucariotos. Em geral, o MMR pós-replicativo opera em três passos: (i) reconhecimento da lesão de DNA, (ii) excisão da secção de DNA danificada e (iii) resíntese e ligação do DNA (revisado por Hsieh & Yamane, 2008).

Em *E. coli*, as proteínas MutS, MutL e MutH atuam no reconhecimento, ligação e clivagem da lesão (revisado por Schofield & Hsieh, 2003). Em eucariotos, o reconhecimento do erro de pareamento é realizado por heterodímeros formados pelos vários homólogos de MutS (denominados MSH1 a 6). Após este reconhecimento são recrutados os heterodímeros de proteínas homólogas a MutL (MLH1 a 3, PMS1 e 2). A excisão do DNA em eucariotos é executada principalmente

pela Exonuclease I (ExoI). Aparentemente as etapas seguintes tem o envolvimento de PCNA, DNA polimerase  $\delta/\epsilon$ , helicase I e DNA ligase I (revisado por Hsieh & Yamane, 2008).

Apesar do papel principal do sistema GO no controle da mutagênese por 8-oxoG, estudos sugerem cada vez mais que o MMR é uma importante via alternativa de controle dos níveis de 8-oxoG no DNA (revisado por Slupphaug *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2007). Foi demonstrado em *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae* que o MMR pode reconhecer e retirar 8-oxoG incorporada erroneamente ou a adenina mal pareada a 8-oxoG na molécula de DNA recém sintetizada (Boiteux *et al.*, 2002; Wyrzykowski & Volkert, 2003). Em mamíferos, foi observado que camundongos deficientes de MSH2 apresentam menor reparo para 8-oxoG (Russo *et al.*, 2007) e que o MMR participaria no reparo de 8-oxoG incorporada no DNA a partir do pool de nucleotídeos, e não proveniente da oxidação de guaninas no DNA (Colussi *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2004). A proteína MSH2 tem papel central no MMR, e o seu envolvimento no reparo a lesões 8-oxoG também foi evidenciado em *T. cruzi*, quando mostrou-se que parasitos deficientes para esta proteína apresentaram acúmulo desta lesão em seu kDNA após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Campos *et al.*, 2011).

### **1.5.O *Trypanosoma cruzi***

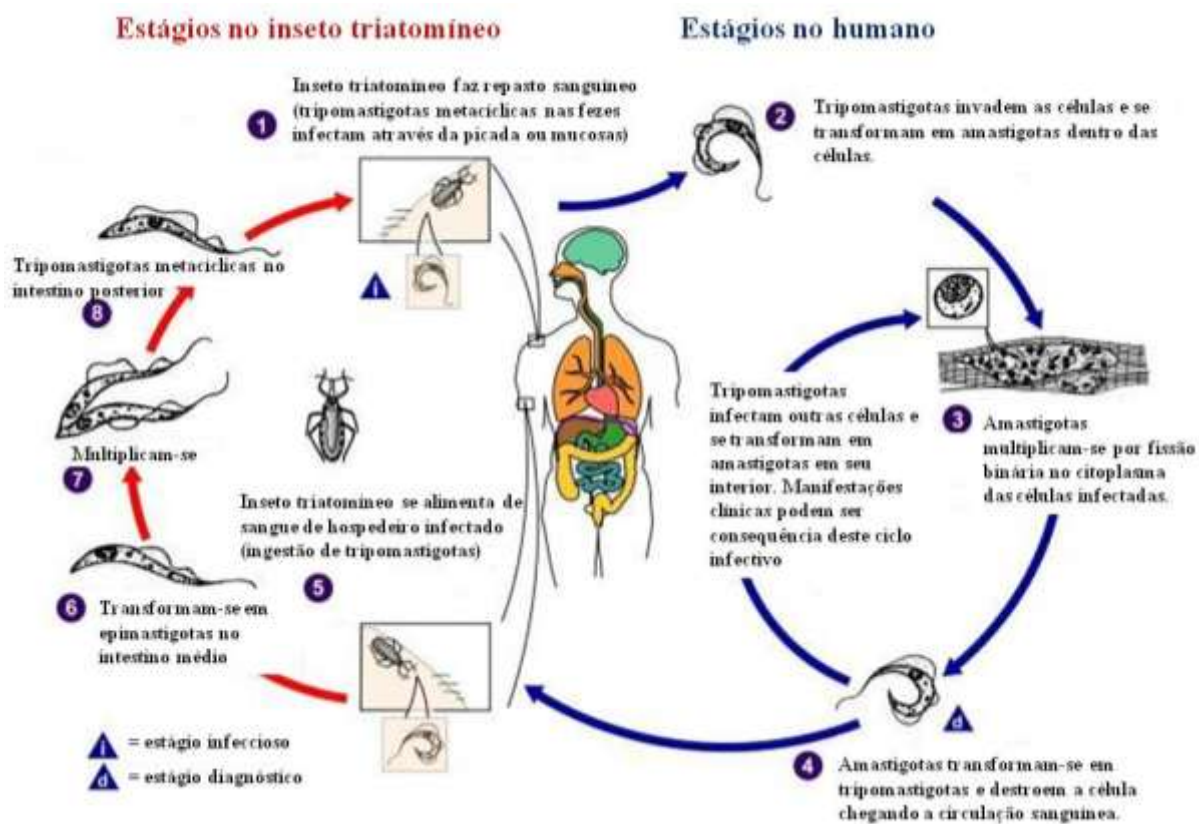
O foco deste trabalho é o parasito *Trypanosoma cruzi* e como o estresse oxidativo e os mecanismos de reparo de DNA podem afetar sua viabilidade celular. O *T. cruzi* é um protozoário parasito pertencente à ordem *Kinetoplastidae*. Este protozoário foi amplamente caracterizado pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, em 1909, quando o mesmo descobriu a tripanosomíase americana, mais tarde batizada com seu nome (Chagas, 1909). Atualmente, estima-se que 90 milhões de pessoas nas Américas do Sul e Central estão expostas a infecção, sendo que aproximadamente 15 milhões de pessoas apresentam-se infectadas pelo *T. cruzi* (Coura & Dias, 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é dividido em dois hospedeiros: um invertebrado (inseto vetor da família Reduviidae, sub-família Triatominae) e o hospedeiro

vertebrado (desde pequenos mamíferos até o homem). O hospedeiro humano pode se infectar pelo *T. cruzi* quando um inseto triatomíneo infectado realiza seu repasto sanguíneo e deposita fezes contendo formas infectantes do parasito próximo do local da picada. A infecção também ocorre por transfusão sanguínea, transmissão congênita, ingestão oral de alimentos contaminados com restos ou fezes do vetor e, em menor número, acidentes de laboratório. Durante o seu ciclo de vida (Figura 4), o *T. cruzi* pode se apresentar em várias formas morfológicas, sendo as principais: tripomastigotas, que são formas flageladas extracelulares não replicativas; amastigotas, formas intracelulares, com flagelo vestigial e replicativas; e epimastigotas, que são flageladas e replicativas (Brener, 1973; Tanowitz *et al.*, 1992; Rassi Jr *et al.*, 2010).

A infecção no homem causa a doença de Chagas que apresenta dois estágios: uma fase aguda, que pode durar entre 4 e 8 semanas, e uma fase crônica de tempo indeterminado. A fase aguda, na maioria dos casos, se manifesta após a infecção com sintomas brandos e não específicos, o que pode levar muitas vezes a erros na identificação da doença. Após as primeiras semanas da doença, a persistência da infecção leva a fase crônica. Nesta fase, 70 a 80% dos casos podem permanecer pela vida toda em uma forma assintomática, enquanto que 20 a 30% dos indivíduos podem, após alguns anos, desenvolver casos clínicos da doença, apresentando manifestações cardíacas, digestivas ou ambas (Bern *et al.*, 2007).

O tratamento da doença de Chagas começou nas décadas de 60 e 70 com o uso das drogas Nifurtimox e Benzonidazol. Estas drogas agem de maneiras diferentes através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos que afetam proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos do parasito. Porém, tanto o Nifurtimox quanto o Benzonidazol não são considerados ideais para o tratamento da doença de Chagas pelos seguintes motivos: apresentam sérios efeitos colaterais; não são eficazes na fase crônica da doença; precisam ser administrados por longos períodos sob supervisão médica; e cepas diferentes podem apresentar diferente suscetibilidade a essas drogas. Atualmente, vários tipos de drogas estão sendo estudadas como candidatas para o combate a doença de Chagas, estas drogas seriam principalmente: inibidores do metabolismo de trypanothiona; inibidores de cisteína protease; inibidores de fosfolídeos; inibidores do metabolismo de pirofosfato; inibidores da síntese de proteínas ou purinas; e



**Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.**

Modificado de CDC (Center for Disease Control and Prevention)

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

inibidores de ergosterol (revisado por Coura & De Castro, 2002; Apt, 2010; Maya *et al.*, 2010).

Muitos estudos já foram realizados para o entendimento da biologia deste parasito, no entanto, 104 anos após a sua descoberta por Carlos Chagas, muitos aspectos da interação entre o *T. cruzi* e as células de seu hospedeiro vertebrado durante a infecção ainda não foram elucidados. Além disso, a doença de Chagas continua sendo um importante problema de saúde na América Latina, pois ainda não há nenhum tratamento eficaz para a fase crônica da doença.

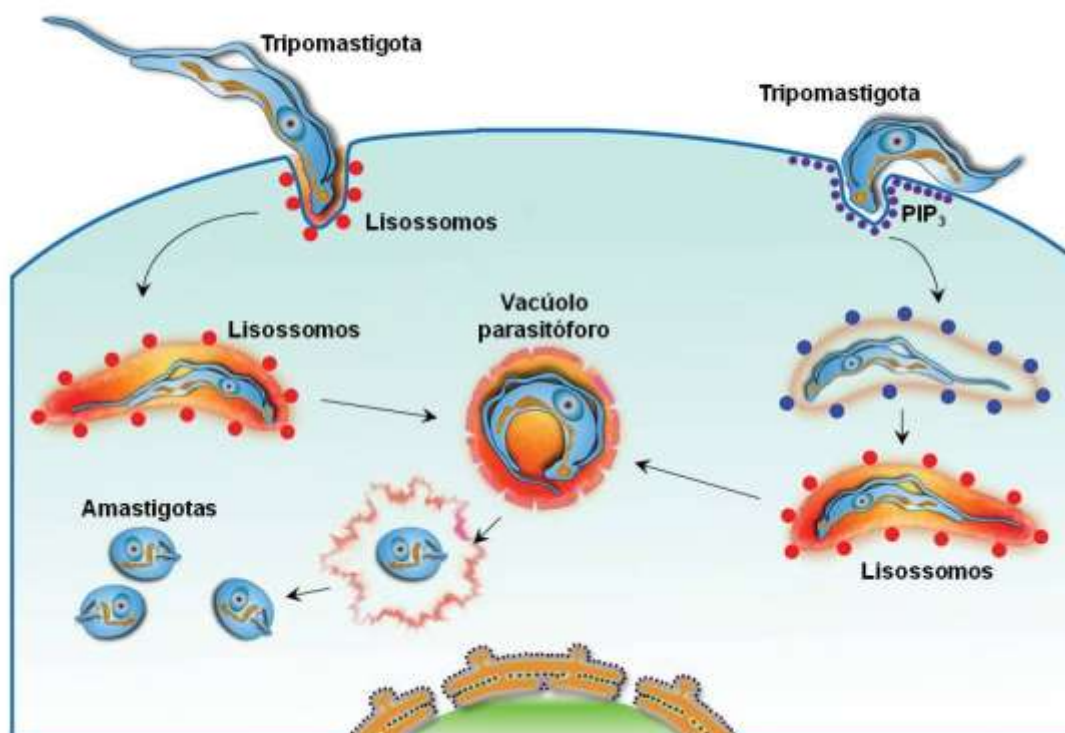
### **1.5.1. O processo de invasão celular e o ciclo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado**

O ciclo natural do parasito tem início no momento em que o inseto vetor elimina suas fezes contendo formas tripomastigotas metacíclicas, que podem penetrar no hospedeiro vertebrado pelo local da picada ou através da mucosa. O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro mamífero (Brenner, 1973). Ao contrário de outros agentes infecciosos que dependem de fagócitos profissionais para o sucesso da infecção, as tripomastigotas são capazes de invadir ativamente tanto células fagocíticas quanto células não fagocíticas. Dentre as células fagocíticas profissionais, os macrófagos residentes dos tecidos periféricos seriam o primeiro alvo do parasito no local da infecção inicial (Muñoz-Fernández *et al.*, 1992b). No entanto, estas células podem conter a infecção através do controle dos parasitos pela produção de espécies reativas de oxigênio (Bogdan & Röllinghoff, 1999), sendo assim, células não fagocíticas seriam o principal alvo deste parasito.

A invasão celular pelo *T. cruzi* ocorre por mecanismos independentes de filamentos de actina do hospedeiro, diferentemente dos mecanismos de endocitose e fagocitose da célula. Durante o processo de invasão celular, ocorre a ativação de cascatas de transdução de sinais tanto no parasito quanto na célula hospedeira, sendo que estas cascatas apresentam certa redundância que seria importante para amplificar o sinal e acelerar o processo de invasão (revisado por Caradonna & Burleigh, 2011; Fernandes & Andrews, 2012).

Sabe-se que a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira é um evento dependente da indução de uma sinalização intracelular na célula hospedeira desencadeada pelo parasito, a qual culmina com o recrutamento de lisossomos para a formação do vacúolo parasitóforo. Duas vias principais de internalização foram descritas (Figura 5) (revisado por Epting *et al.*, 2010; Sibley, 2011). A primeira via mostrava um rápido recrutamento de lisossomos para o local de adesão do parasito à célula hospedeira, através da liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular (Tardieux *et al.*, 1992, 1994; Moreno *et al.*, 1994). A sinalização para esta liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol teria várias origens, uma delas seria a liberação da protease cruzipaina pelo *T. cruzi*, desencadeada pela interação do parasito com a célula hospedeira. Esta protease atua em um cininogênio ligado a superfície da célula do hospedeiro gerando cininas que se ligam a um receptor  $\text{B}_2$  levando a ativação da fosfolipase C (PLC) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). A produção de  $\text{IP}_3$  leva a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático pela ligação deste produto a seu receptor no retículo (Scharfstein *et al.*, 2000; Villalta *et al.*, 2009). Além disso, acredita-se que a geração de um agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  pela oligopeptidase-B do parasito sinalizaria para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula hospedeira através da ativação da adenilato ciclase e PLC (Caler *et al.*, 1998). A elevação do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  levaria então a mobilização de lisossomos ao local de entrada do parasito, que se fundiriam ao vacúolo em formação. Estes lisossomos forneceriam membrana para a formação do vacúolo parasitóforo e o ambiente ácido formado por eles seria de extrema importância para o posterior escape do vacúolo pelo parasito e sua diferenciação (Andrews, 1994; Tomlinson *et al.*, 1995). Foi sugerido também que o movimento ativo dos tripomastigotas poderia criar pequenas rupturas locais na membrana, provocando o influxo de cálcio extracelular e conseqüentemente o recrutamento de lisossomos os quais seriam utilizados para o reparo da estrutura membranar (McNeil & Kirchhausen, 2005).

A segunda via descrita mostrava a ocorrência de um processo de invaginação da membrana, na qual a fusão lisossomal acontece internamente na célula hospedeira e não no ponto de adesão à superfície celular. Este processo envolve sinalização por fosfatidilinositol 3-cinases (revisado por Burleigh, 2005), onde fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato se acumula rapidamente na membrana plasmática em contato com o parasito (Todorov *et al.*, 2000). Foi reportado então que, uma parte dos parasitos internalizados apresentaria apenas marcação de membrana



**Figura 5: Processo de invasão e replicação intracelular do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado.** O Modelo indica dois possíveis mecanismos de invasão do parasito a célula do hospedeiro mamífero. A via dependente de lisossomos (esquerda) depende do recrutamento de lisossomos para o local da infecção através da liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular. A tripomastigota é então contida em vacúolo formado por membrana lisossomal. Alternativamente, tem-se a via independente de lisossomos (direita), na qual tripomastigotas penetram a célula por invaginações na membrana plasmática que acumulam  $PIP_3$ . Posteriormente, o parasito é contido em vacúolo que matura com a aquisição de marcadores lisossomais. Adaptado de De Souza *et al.*, 2010.



plasmática e não estariam ainda associados a lisossomos logo após a invasão (Woolsey *et al.*, 2003).

Posteriormente, foi demonstrado que a fusão lisossomal no ponto de adesão do parasito ou após a invaginação da membrana plasmática é evento essencial para o processo de infecção celular, uma vez que funciona como âncora para a retenção do *T. cruzi* no meio intracelular (Andrade & Andrews, 2004). Recentemente, Fernandes e colaboradores, mostraram que as duas vias na verdade fazem parte de um único processo no qual o recrutamento e fusão de lisossomos leva à liberação de uma esfingomielinase ácida lisossomal que induz um processo de endocitose compensatória. Esta endocitose compensatória culmina com a internalização do *T. cruzi* em um vacúolo contendo membrana lisossomal e porções de membrana plasmática. O vacúolo endocítico pré-formado continua a adquirir membrana lisossomal até que todo o parasito esteja envolto por esta membrana (Fernandes *et al.*, 2011).

As duas vias de entrada para o *T. cruzi* na célula hospedeira evidenciam uma diferença marcante deste parasito para outros patógenos de replicação intracelular: a fusão lisossomal é essencial para o sucesso da infecção. Sabe-se que, o mecanismo de escape do vacúolo parasitóforo é dependente do lisossomo e seu pH ácido (Andrews, 1994). Este ambiente seria favorável para a expressão e atuação de fatores do parasito, como o TcTOX, que são necessários para a lise da membrana vacuolar (Andrews *et al.*, 1990). Adicionalmente, o baixo pH é importante por desencadear a diferenciação da forma tripomastigota não replicativa para a forma amastigota, que é capaz de se multiplicar por divisão binária (Tomlinson *et al.*, 1995).

No citoplasma, o parasito se diferencia da forma tripomastigota para amastigota, aproximadamente 2 a 8 horas depois do escape do vacúolo. A amastigota passa então por um período de quiescência e, em seguida, volta ao ciclo celular e passa por nove rodadas de replicação antes de se diferenciar novamente na forma móvel tripomastigota, a qual é capaz de romper as células e iniciar um novo ciclo de infecção celular (revisado por Andrade & Andrews, 2005).

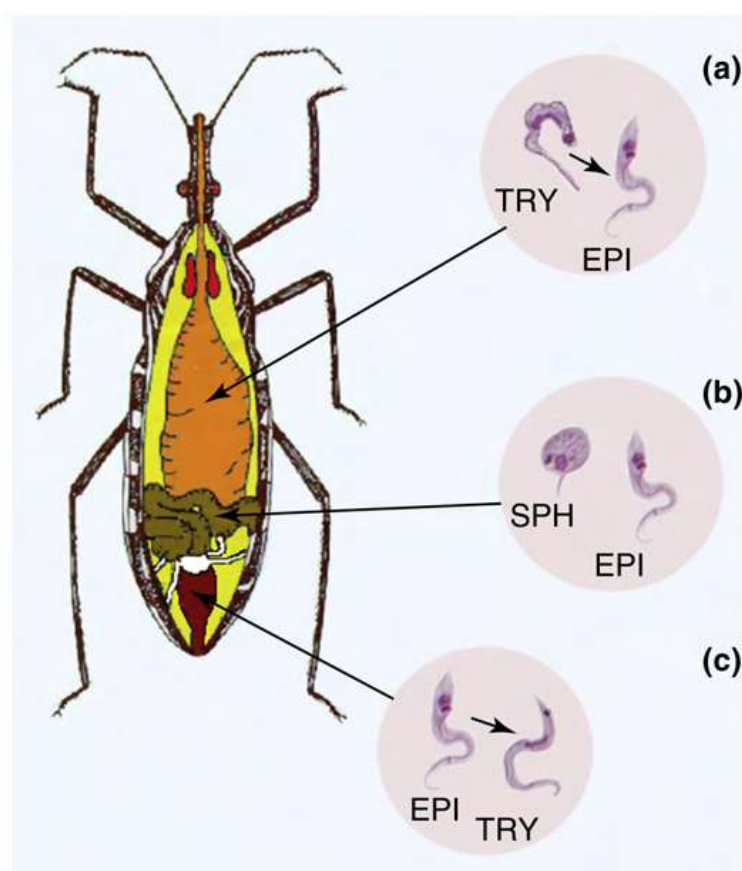
### 1.5.2. A passagem do parasito pelo triatomíneo

As formas tripomastigotas do parasito, que são liberadas na corrente sanguínea, podem ser ingeridas por um inseto triatomíneo em seu repasto sanguíneo. Estes barbeiros podem ingerir 6 a 12 vezes o seu peso corporal original em um evento de repasto. Depois disso, pode se seguir um período de inanição de até 12 meses, dependendo da espécie e condições climáticas. O sangue ingerido é estocado praticamente não digerido em uma ampla porção denominada intestino médio anterior. O sangue é conservado não coagulado por anticoagulantes produzidos nas glândulas salivares e intestino médio anterior, e é passado em pequenas porções para a parte posterior do intestino médio, a região absorptiva do mesmo (revisado por Kollien & Schaub, 2000).

Acreditava-se que o desenvolvimento do *T. cruzi* no vetor tinha início no intestino médio anterior, onde a maior parte das tripomastigotas sanguíneas iriam se diferenciar em epimastigotas replicativas (Figura 6). Porém, dados recentes indicam que os parasitos passam para a porção posterior do intestino médio nas primeiras 24 horas de infecção, e seu desenvolvimento e diferenciação só teria início nesta região (Ferreira *et al.*, dados não publicados). Na porção posterior do intestino médio e reto, as epimastigotas aderem na parede intestinal e se multiplicam por mitose repetidas vezes. As formas epimastigotas sofrem metaciclogênese e se transformam em tripomastigotas metacíclicas (infectantes mas não replicativas) na região do reto. Ambas as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas podem ser eliminadas nas fezes dos triatomíneos, porém somente a última pode infectar o hospedeiro mamífero (Garcia *et al.*, 2010).

### 1.5.3. O *T. cruzi* e o estresse oxidativo

Como foi descrito acima, o *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida, o que pode representar vários ambientes diferentes a que este parasito precisa enfrentar. O estresse oxidativo encontrado em todos estes ambientes é uma das principais ameaças para a viabilidade celular do parasito (Piacenza *et al.*, 2009a; Gupta *et al.*, 2009a; Rassi Jr *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2010).



**Figura 6: Desenvolvimento do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado.**

As formas tripomastigotas (TRY) são ingeridas durante repasto sanguíneo e, no estômago (a), se transformam em epimastigotas (EPI). No intestino médio posterior (b) os parasitos aderem a parede e se multiplicam, algumas formas esferomastigotas podem ser encontradas (SPH). Nas paredes do reto (c), as epimastigotas se replicam intensamente e se transformam em tripomastigotas metacíclicas, ambas as formas podem ser eliminadas na urina e fezes (Garcia *et al.*, 2010).

No local de entrada do parasito no mamífero, macrófagos residentes estão entre as primeiras células a serem invadidas pelo *T. cruzi*. Para o estabelecimento da infecção, o parasito precisa lidar com o ataque destas células fagocíticas profissionais da resposta imune inata. Estas células respondem à invasão com a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela NADPH oxidase (NADPHox), este pode espontaneamente formar  $H_2O_2$ . No entanto, esta resposta do macrófago pode não ser suficiente para matar o parasito internalizado no vacúolo. Se a célula fagocítica é ativada por citocinas pró-inflamatórias todo o poder oxidante citotóxico dos macrófagos será liberado, culminando com a morte do parasito (Kierszenbaum *et al.*, 1974; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992a).

Além disso, foi relatado por Gupta *et al.* (2009) que durante o processo de invasão e replicação do *T. cruzi* em cardiomiócitos de ratos adultos ocorre um aumento substancial de ROS no citoplasma das células infectadas. Essa produção de ROS nos cardiomiócitos seria provocada por uma série de eventos celulares que causam um distúrbio no potencial de membrana mitocondrial, comprometendo a atividade dos complexos respiratórios, levando a vazamento de elétrons e produção de superóxidos e radicais livres. Acredita-se que o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular desencadeado pela interação do parasito com a célula seria o evento inicial para provocar a despolarização da membrana mitocondrial. O distúrbio em questão seria provocado exclusivamente pela invasão ativa do parasito e não pôde ser induzido somente pela presença de antígenos do patógeno. Foi demonstrado também que a produção de ROS tem início com 2 horas pós-infecção e aumenta exponencialmente até 48 horas pós-infecção. Além disso, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que ROS mitocondrial, produzido em resposta à infecção, gerou danos no DNA e a ativação de PARP-1, levando a ativação do complexo de transcrição NF- $\kappa$ B, culminando com a expressão das citocinas inflamatórias  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  (Ba *et al.*, 2010). Torna-se evidente então, que durante o ciclo de infecção do *T. cruzi* na célula do hospedeiro vertebrado, o combate ao estresse oxidativo e suas consequências é de extrema importância para a manutenção da viabilidade do parasito.

Assim como acontece no hospedeiro vertebrado, os parasitos passam por várias situações fisiológicas estressantes no trato intestinal do barbeiro. Após a ingestão, estes entram em contato com enzimas das glândulas salivares e estômago do triatomíneo, como fatores hemolíticos e catepsinas, que podem afetar o *T. cruzi*

(Ratcliffe *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2010). O pH intestinal sofre mudanças após a ingestão de sangue, no intestino médio ocorre uma acidificação para a atuação de enzimas digestivas, enquanto que o reto muda o pH levemente ácido para o pH alcalino nas primeiras 24 horas após a alimentação. O estresse nutricional também é um fator limitante para o parasito, pois como o barbeiro pode passar por um longo período de inanição, isto pode afetar a densidade populacional do parasito no intestino do inseto. Adicionalmente, logo após um repasto, a água presente no sangue é excretada pelos túbulos de Malpighi causando dessecação e um forte aumento da osmolaridade do conteúdo intestinal nos primeiros dias (até 1000 mOsmol/kg, sendo que o valor de referência para o plasma sanguíneo humano é entre 275-295 mOsmol/kg) (Kollien *et al.*, 2000).

O sangue ingerido pelo triatomíneo contém altas concentrações de hemoglobina, proteína que constitui cerca de 60% do conteúdo proteico do sangue, e sua degradação no sistema digestivo destes insetos resulta na liberação de altas concentrações de heme (Graça-Souza *et al.*, 2006). O heme é um grupo prostético da hemoglobina, que é composto por um átomo de ferro contido no centro de um largo anel orgânico heterocíclico. Esta molécula é considerada tóxica devido a sua habilidade de gerar ROS através de uma reação do tipo Fenton e promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Aft & Mueller, 1983; Gutteridge & Smith, 1988).

O estresse oxidativo também está presente no intestino do inseto na forma de intermediários de nitrogênio, como o óxido nítrico, produzidos pelo mesmo em defesa ao parasito (Whitten *et al.*, 2007). Estas condições extremas a que o *T. cruzi* é exposto no barbeiro podem submeter o DNA do parasito a várias lesões, o que nos remete novamente a importância dos sistemas de reparo de DNA para o *T. cruzi*.

#### **1.5.4. Sistemas antioxidantes do *T. cruzi***

O *T. cruzi* pode contar com uma complexa maquinaria de defesa contra dano oxidativo para lidar com todos esses ambientes oxidantes a que é submetido durante seu ciclo de vida. Seu sistema antioxidante é baseado em vias interligadas

em seus compartimentos celulares nas quais os equivalentes redutores do NADPH são levados às enzimas através da tripanotiona (T(SH)<sub>2</sub>), um ditiol de baixo peso molecular que só está presente nos trypanosomatídeos (revisado por Flohé, 2012).

A síntese da T(SH)<sub>2</sub> é realizada pela tripanotiona sintetase (TS), e a tripanotiona redutase (TR), uma flavoenzima dependente de NADPH é responsável por mantê-la em sua forma reduzida. Os equivalentes redutores do NADPH são transferidos da T(SH)<sub>2</sub> para a triparedoxina (TXN), um doador de elétrons intermediário que por sua vez transfere os equivalentes redutores para as peroxidases, estas podem então reduzir os hidroperóxidos (Irigoín *et al.*, 2008). O *T. cruzi* possui 5 peroxidases que diferem entre si na localização subcelular e na especificidade de substrato (Piacenza *et al.*, 2009a; Piñeyro *et al.*, 2011).

Na mitocôndria do *T. cruzi* encontra-se a triparedoxina peroxidase mitocondrial (TcMPX) capaz de reduzir peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além de uma superóxido dismutase Ferro-dependente (SODA) que metaboliza o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Wilkinson *et al.*, 2006; Piacenza *et al.*, 2008). No retículo endoplasmático estão presentes duas peroxidases diferentes, a hemoperoxidase ascorbato-dependente (TcAPX) e a peroxidase glutationa-dependente II (GPX-II), que metabolizam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente (Wilkinson *et al.*, 2002c b). Finalmente, no citosol as enzimas triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPX), GPX-I e SODB efetuam a defesa antioxidante (Wilkinson *et al.*, 2002a; Piacenza *et al.*, 2012).

Várias evidências apontam para a importância desta rede antioxidante para a virulência do parasito (Finzi *et al.*, 2004; Peloso *et al.*, 2012; Piacenza *et al.*, 2012; Gadelha *et al.*, 2013). Apesar de toda essa defesa antioxidante, as macromoléculas do parasito, em particular o DNA, ainda podem sofrer dano oxidativo que pode ser deletério se não reparado.

#### **1.5.5. Sistemas de reparo de DNA em *T. cruzi***

O sequenciamento completo do genoma do *T. cruzi* possibilitou a identificação da maioria dos genes que codificam componentes da maquinaria de reparo de DNA neste parasito (El-Sayed *et al.*, 2005), sendo que muitos destes estão envolvidos no reparo a lesões oxidativas no DNA. Aparentemente, o *T. cruzi* é

capaz de catalisar a maioria das vias de reparo de DNA. Entretanto, somente alguns destes genes foram caracterizados experimentalmente, como revisado por Passos-Silva e colaboradores (2010b). O entendimento das vias de reparo em organismos patogênicos pode melhorar a compreensão da biologia desses organismos e auxiliar na obtenção de novos alvos para desenho de drogas.

Uma das características mais marcantes dos tripanosomatídeos é a presença de uma única mitocôndria que contém uma região densa denominada cinetoplasto. Nesta região encontra-se uma estrutura extremamente complexa onde está organizado o DNA mitocondrial do parasito, o kDNA. Esta densa rede de minicírculos e maxicírculos requer a participação de um grande número de enzimas para completar sua replicação, que ocorre antes da mitose (revisado por Jensen & Englund, 2012). A integridade do kDNA é de suma importância para a sobrevivência do parasito, mas este está sujeito a dano oxidativo gerado pela fosforilação oxidativa na mitocôndria. Sendo assim, um mecanismo eficiente de manutenção do kDNA é necessário para reparar e evitar lesões oxidativas no DNA mitocondrial. Várias enzimas de reparo de DNA que apresentam localização nuclear em mamíferos foram localizadas na mitocôndria em tripanosomatídeos (revisado por Passos-Silva *et al.*, 2010b).

Considerando a via do BER, principal mecanismo de reparo a lesões oxidativas no DNA, o *T. cruzi* apresenta os elementos necessários para realizar o reparo de diferentes lesões. Não se sabe se a via curta pode ser realizada no núcleo, pois homólogos para *LIG3*, *XRCC1* e *DNA Polβ* nuclear não foram identificados nesse parasito. No entanto, estes mesmos componentes são ausentes em plantas e foi demonstrado recentemente que o reparo de uracila e sítios abásicos em *Arabidopsis thaliana* pode ocorrer tanto pela inserção de um nucleotídeo (via curta) quanto pela síntese de um trecho longo de DNA (via longa) (Córdoba-Cañero *et al.*, 2009).

Dentre os genes de *T. cruzi* caracterizados para esta via, a Uracila DNA glicosilase (TcUNG) foi a primeira a ser estudada por Fárez-Vidal e colaboradores que demonstrou que sua atividade podia ser aumentada pela presença de uma AP endonuclease de *L. major*, sugerindo uma interação funcional entre estas enzimas (Fárez-Vidal *et al.*, 2001). Mais tarde foi demonstrado que a TcUNG é capaz de

complementar bactérias mutantes *ung*<sup>-</sup> e que sua atividade catalítica é similar a homóloga humana (Peña-Díaz *et al.*, 2004).

O homólogo da 8-oxoG DNA glicosilase de *T. cruzi* (TcOGG1) teve sua função caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa (Furtado *et al.*, 2012). Este gene foi capaz de complementar leveduras deficientes de OGG1 reduzindo sua taxa de mutação. Ensaios de imunolocalização mostraram que esta proteína localiza-se principalmente no núcleo, mas também pode ser encontrada na mitocôndria. Foi visto que a glicosilase TcOGG1, quando superexpressa, é capaz de diminuir o nível de 8-oxoG tanto no núcleo quanto na mitocôndria após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Furtado *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado em nosso laboratório, foi demonstrado que o gene Tc00.1047053511803.20 é um homólogo funcional de MutY (este foi denominado TcMYH) sendo capaz de complementar bactérias mutantes deficientes nesse gene, diminuindo sua taxa de mutação. Além disso, foi demonstrado que a proteína recombinante TcMYH remove a adenina pareada com 8-oxoG de um substrato fluorescente de 30mer *in vitro* (Kunrath-Lima, não publicado). A AP endonuclease de *T. cruzi* (TcAP) também foi caracterizada, e demonstrou ser capaz de complementar bactérias deficientes de AP endonuclease e aumentar sua resistência a agentes oxidantes (Pérez *et al.*, 1999).

A DNA polimerase beta de *T. cruzi* (TcPol $\beta$ ) foi caracterizada e apresentou atividade de polimerização de DNA e desoxiribose fosfato liase. A TcPol $\beta$  foi localizada no cinetoplasto do parasito, ao contrário das Pol $\beta$  de eucariotos superiores que se localizam no núcleo, evidenciando a importância do reparo do kDNA nesta estrutura do parasito (Lopes *et al.*, 2008). Posteriormente, observou-se que a TcPol $\beta$  localizava-se restritamente nos sítios antipodais do kDNA nas formas replicativas do parasito, e que esta proteína modifica sua localização subcelular de acordo com a fase do ciclo celular do parasito, podendo apresentar-se também difusa na mitocôndria e na região cinetoflagelar. Foi visto também que a superexpressão desta polimerase torna o parasito mais resistente a tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o reparo a 8-oxoG é mais eficiente (Schamber-Reis *et al.*, 2012).



A proteína PARP de *T. cruzi* que participa na via longa do BER também teve sua função caracterizada, e foi demonstrado que sua atividade aumenta na presença de quebras de fitas simples de DNA. Além disso, observou-se que agentes genotóxicos induzem a síntese de PAR no núcleo do parasito, indicando que esta enzima estaria envolvida na sinalização para o reparo neste compartimento (Villamil *et al.*, 2008).

Outras vias de reparo de DNA também podem atuar em resposta a dano oxidativo no DNA em *T. cruzi*. O MMR (como revisado anteriormente no item 1.4), a recombinação homóloga (HR) e a síntese translesão (TLS) podem contribuir de diferentes formas neste tipo de reparo (revisado por Russo *et al.*, 2007; Passos-Silva *et al.*, 2010b). A proteína TcMSH2 do MMR teve sua função bem caracterizada, e foi demonstrado que, ela é capaz de complementar funcionalmente mutantes de *T. brucei* deficientes para MSH2, revertendo sua sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Machado-Silva *et al.*, 2008). Este mesmo trabalho mostrou que a proteína pode atuar no reparo de lesões oxidativas de maneira independente do MMR, visto que a deleção de MLH1 (outro componente do MMR) não alterou a sensibilidade dos parasitos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, demonstrou-se que a deleção de um alelo de MSH2 em *T. cruzi* também torna este parasito mais sensível ao estresse oxidativo (Campos *et al.*, 2011). Além disso, a supressão da atividade de MMR com o uso de cádmio (agente que prejudica a interação de MSH2/MSH6 com MLH1) não influenciou na resposta ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acumulando mais um indício de que o reparo a dano oxidativo pela MSH2 pode ser independente de outros componentes do MMR (Campos *et al.*, 2011).

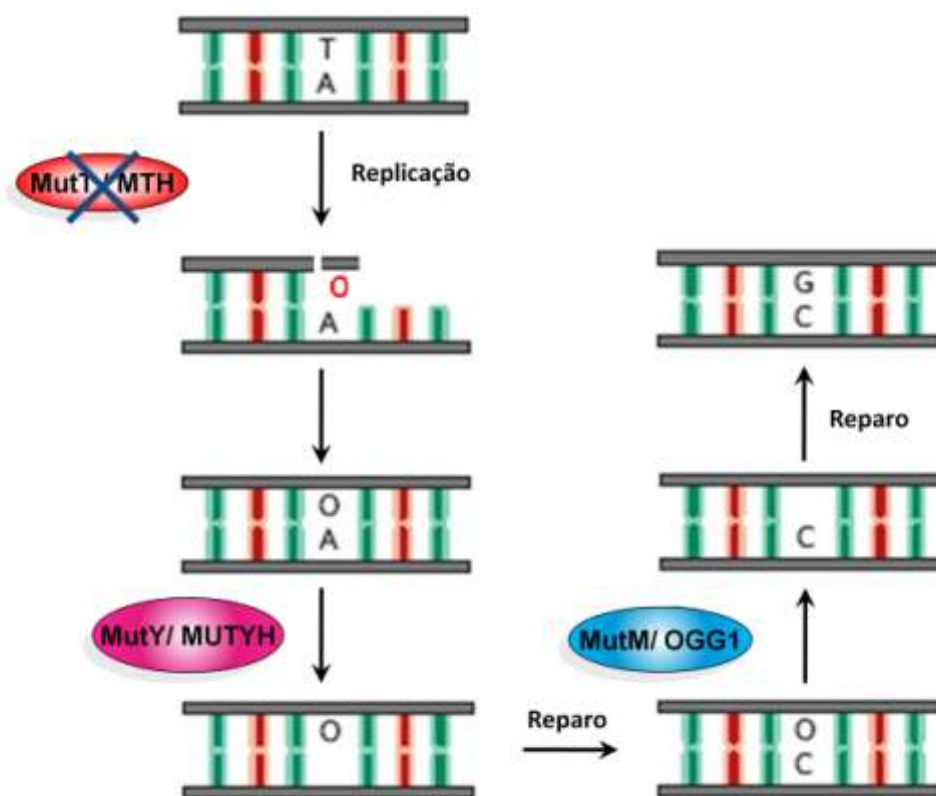
Por sua vez, a enzima TcRad51 da via de HR (Regis-da-Silva *et al.*, 2006) apresentou forte relação com a suscetibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois foi demonstrado que o nível de expressão desta proteína reflete na sensibilidade do parasito ao estresse oxidativo. A superexpressão de Rad51 em *T. cruzi* confere resistência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que a deleção de um alelo do mesmo gene aumenta a sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados aos parasitos selvagens (Passos-Silva & Machado, 2010a). As DNA Polimerases eta (TcPol<sub>η</sub>) e kappa (TcPol<sub>κ</sub>) de *T. cruzi* também tiveram sua função caracterizada, e ambas foram capazes de realizar a síntese translesão (TLS) *in vitro* através de bases 8-oxoG e aumentaram a resistência do parasito a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando superexpressas (Moura *et al.*, 2009; Rajão *et al.*, 2009).

O projeto genoma de *T. cruzi* não identificou nenhum homólogo para a enzima MutT do sistema GO de reparo. Entretanto, homólogos para as enzimas MutY e OGG1 foram encontrados. Uma situação como essa favorece a fixação de mutações do tipo transversão T:A para G:C, pois durante a replicação, a 8-oxoG livre no pool de nucleotídeos pode ser incorporada frente a uma adenina. Neste caso, uma enzima MutY pode reconhecer esta lesão e remover a Adenina, que seria a base correta, ao invés da 8-oxoG. Posteriormente, o reparo por excisão de bases com o auxílio da OGG1 poderia remover a 8-oxoG e estabelecer um par G:C onde antes havia um T:A (Figura 7). Então, com o intuito de investigar a importância da enzima MutT para este parasito, nosso grupo de pesquisa optou por transformar parasitos *T. cruzi* da cepa CL Brener com o gene *mutT* de *E. coli*, o qual já teve sua função bem caracterizada (Fowler *et al.*, 1997).

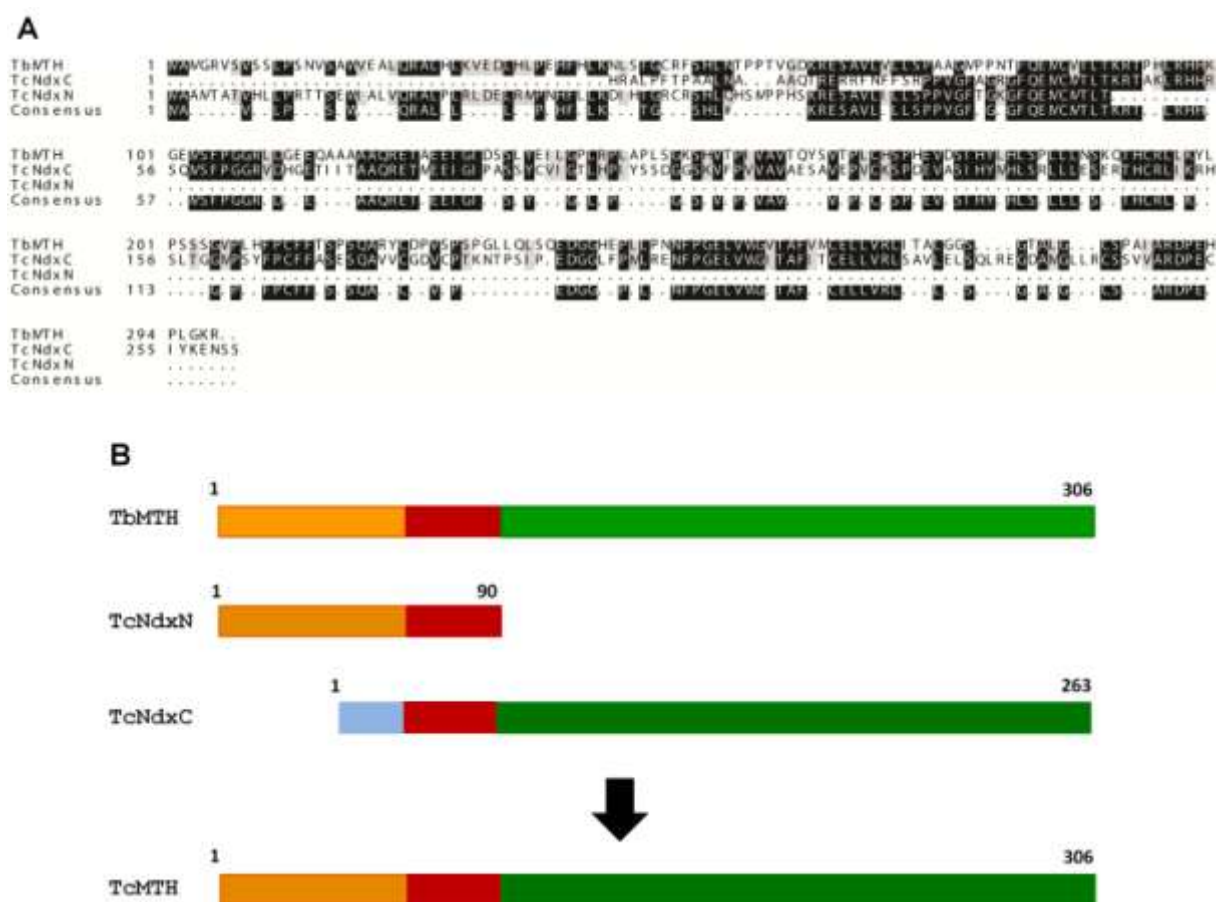
Posteriormente, através de uma busca mais detalhada no banco de dados de *T. cruzi* pelo domínio Nudix, que é uma curta sequência de aminoácidos conservada entre as enzimas MutT de *E. coli* e homólogas em outros organismos, nosso grupo de pesquisa encontrou um possível ortólogo a MutT em *T. cruzi* (este foi denominado TcMTH). Foram encontradas duas sequências anotadas como “possível Nudix hidrolase, incompleta” (Tc00.1047053510287.4, TcNdxN) e “possível Nudix hidrolase, pseudogene” (Tc00.1047053506581.69, TcNdxC) que apresentam, respectivamente, alta homologia com a região N-terminal e alta homologia com as porções média e C terminal do produto do alelo Tb927.10.4680, caracterizado como homólogo de *mutT* em *T. brucei* (Figura 8). Então, foi realizada uma reação de PCR com iniciadores para amplificar esse provável alelo e um fragmento de aproximadamente 900 pb foi amplificado a partir de DNA genômico de CL Brener, confirmando a existência do alelo em *T. cruzi* homólogo a MTH de *T. brucei* (Furtado & Machado, 2009).

A habilidade deste gene para complementar bactérias deficientes de MutT foi testada através de ensaios de mutação com rifampicina, e foi demonstrado que TcMTH foi capaz de reverter o fenótipo hipermutador das bactérias deficientes (Figura 9).

Então, neste projeto resolvemos trabalhar com parasitos *T. cruzi* que expressam a enzima MutT de *Escherichia coli*, e parasitos que superexpressam o

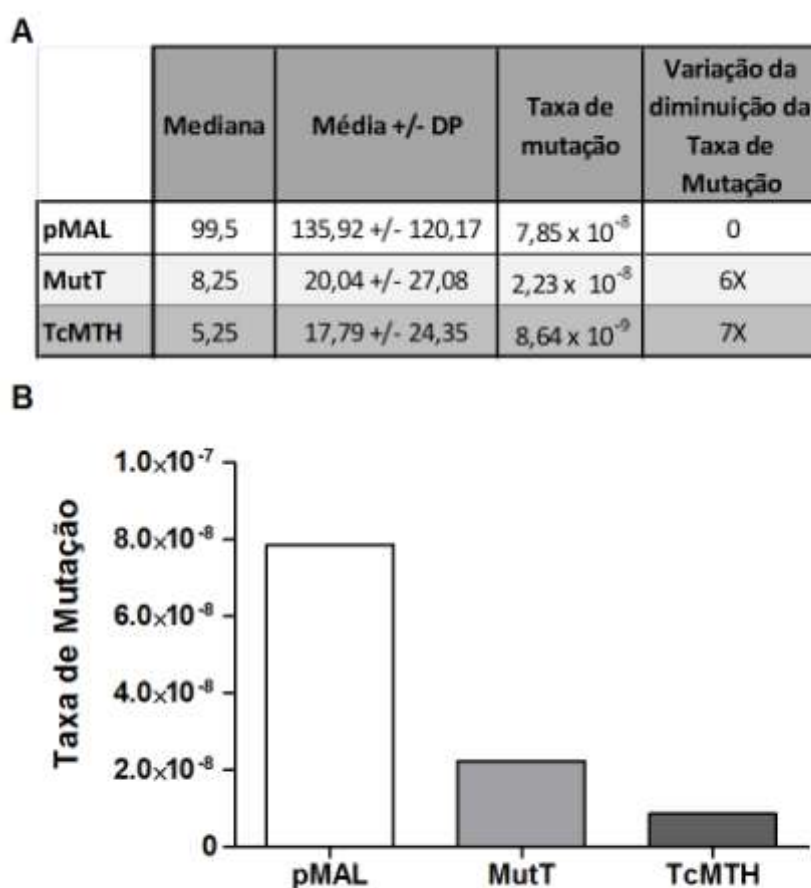


**Figura 7: Possível consequência da ausência de um homólogo de MutT em um organismo.** Em um evento de replicação do DNA, uma 8-oxo-dGTP (○) pode ser incorporada erroneamente frente a uma adenina. Este par incorreto seria reconhecido por uma glicosilase MUTYH que retira a adenina, ao invés da 8-oxoG que foi inserida incorretamente. Posteriormente, o BER com o auxílio da OGG1 estabelece um par G:C, levando a uma transversão de T:A para G:C.



**Figura 8: Possível ortólogo de MTH em *T. cruzi*.**

(A) Alinhamento entre a proteína MTH de *T. brucei* (TbMTH) e os polipeptídeos codificados pelos alelos Tc00.1047053510287.4 (TcNdxN) e Tc00.1047053506581.69 (TcNdxC) de *T. cruzi* (CL Brener). (B) O alinhamento sugere a existência de uma proteína em *T. cruzi* (TcMTH), homóloga à MTH de *T. brucei*, formada pela sobreposição dos dois polipeptídeos, excluindo a porção N terminal (em azul) de TcNdxC. O mesmo tom de cor indica que as regiões são homólogas (Furtado & Machado, 2009).



**Figura 9: Taxa de mutação de bactérias complementadas com TcMTH.**

Bactérias deficientes para MutT foram transformadas com o vetor de expressão pMAL vazio, pMAL\_MutT (revertendo a deleção do gene bacteriano) ou pMAL\_TcMTH, para investigar se o homólogo de *T. cruzi* é capaz de reverter o fenótipo hipermutador das bactérias deficientes. Tabela com os dados do teste de resistência a rifampicina (A). Gráfico representando a taxa de mutação para cada construção de plasmídeo calculado a partir do teste de resistência a rifampicina (B). (Repolês, não publicado).

candidato a homólogo de MutT em *T. cruzi*, TcMTH. Tendo em vista a relação da lesão 8-oxoG com o estresse oxidativo, a superexpressão de enzimas que participam do seu reparo pode contribuir para o entendimento da importância do estresse oxidativo para a viabilidade celular do parasito.

ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGGGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

## 2. Objetivos

GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCOGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTTGTTTCCCTATGCTGCGGGAAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

## 2.1. Objetivo Geral

Investigar a importância da lesão 8-oxo-dGTP para a viabilidade celular do *T. cruzi* durante o seu ciclo de vida, usando parasitos que superexpressam enzimas que degradam esse nucleotídeo.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a expressão heteróloga da enzima MutT de *E. coli* confere alguma vantagem ao *T. cruzi* no crescimento e resposta ao estresse oxidativo.
- Comparar os danos no DNA em parasitos controle e modificados com MutT.
- Investigar o efeito da expressão de MutT na infecção de células de mamíferos em experimentos de infecção celular.
- Avaliar se a expressão heteróloga do gene MutT influencia a expressão de enzimas antioxidantes do *T. cruzi*.
- Analisar a evolução da parasitemia de animais infectados com os parasitos selvagem e modificados com o gene MutT.
- Caracterizar a sequência do gene homólogo de MutT em *T. cruzi*, TcMTH.
- Avaliar a sobrevivência de parasitos superexpressores de TcMTH a estresse oxidativo.



ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

### 3. Metodologia

GCTCCAAAACGTACGGCAAAACTCCGTCATCATAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTCGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTGTTTCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

### 3.1. Superexpressão das proteínas TcMTH e MutT em *T. cruzi* CL Brener

#### 3.1.1. Amplificação e clonagem no vetor pGEM-T®

A amplificação do gene *mutT* de *E. coli* (linhagem AB1157, GeneID: 5590913), clonagem no vetor de expressão pROCK (DaRocha *et al.*, 2004) (Anexos), transfecção e seleção dos parasitos com esta construção foram realizados pela Dra. Carolina Furtado em sua tese de Doutorado (Furtado, 2009).

O fragmento de DNA codificador da proteína TcMTH foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi* CL Brener utilizando-se os iniciadores TCMTHXBA-F (5'- TCTAGAATGGCCGCGATGACTGCGAC -3') e TCMTHXHO-R (5'- CTCGAGTCAGCTGGAGTTTTTCCTTGT -3'), os quais possuem, respectivamente, sítios para as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I.

A amplificação foi feita por PCR (reação em cadeia da polimerase) em volume final de 50  $\mu$ L, contendo 0,2 pmol/ $\mu$ L dos iniciadores, 200  $\mu$ M de cada dNTP e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B (Tris-HCL 10 mM pH 8,4, KCl 50 mM, 0,1% Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM). No tubo da PCR foi adicionado 1 ng de DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador de acordo com o seguinte programa:

Primeira desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de:

- desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
- anelamento dos iniciadores a 55 °C por 1 minuto;
- extensão a 72 °C por 1 minuto;
- extensão final a 72 °C por 10 minutos;
- fim da reação a 4 °C.

Após a reação da PCR, 10  $\mu\text{L}$  dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (Tris base 40 mM pH 7,2, acetato de sódio 20 mM, sal tetrassódico de etilenodiaminatetracético (EDTA) 1 mM). A eletroforese foi realizada a 60 V por 40 minutos. Os fragmentos amplificados foram corados por exposição do gel a uma solução de brometo de etídio (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 15 minutos e visualizados em transluminador de ultravioleta de ondas curtas. Uma vez confirmada a amplificação do fragmento mediante a comparação com um padrão de peso molecular de DNA de 1 Kb (*1 Kb Plus DNA Ladder*), o amplicon foi purificado dos 40  $\mu\text{L}$  restantes do produto de PCR utilizando-se o kit *Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps* (Promega), conforme especificação do fabricante, e ressuspendido em um volume final de 20  $\mu\text{L}$  de água deionizada.

O amplicon gerado foi então clonado no vetor pGEM-T (Promega) conforme instruções do fabricante. A ligação foi realizada durante a noite a 4 °C. O plasmídeo gerado (pGEM-TcMTH) foi usado na transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes (60  $\mu\text{L}$ ). Para a transformação, as células incubadas com o plasmídeo foram submetidas a uma descarga elétrica de 3400 volts por 2,5 milissegundos em eletroporador (BioRad). Em seguida foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de meio 2xYT líquido (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura e 0,5 % NaCl) e as células foram incubadas por 45 minutos a 37 °C sob agitação (180 rpm). Uma alíquota das células transformadas foi plaqueada em placas de cultura contendo 2xYT ágar (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl e 1,5 % de ágar) suplementado com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Algumas colônias foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto através de PCR de colônias. Os clones selecionados foram isolados direto da placa (utilizando-se um palito estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. Cada reação continha 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (TCMTHXBA-F e TCMTHXHO-R), 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Foi também realizado um controle negativo (sem adição de DNA). As reações foram realizadas em termociclador utilizando o mesmo programa já descrito anteriormente.

Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular. Para obtenção do DNA plasmidial foram selecionados três clones positivos, os quais foram inoculados em tubos contendo 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A incubação foi feita por 16 horas a 37 °C sob agitação a 180 rpm. Os DNAs plasmidiais foram então purificados utilizando-se o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) conforme especificação do fabricante e dosados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA).

### 3.1.2. Sequenciamento do gene TcMTH

O sequenciamento de DNA plasmidiano foi realizado em ambas as direções, de acordo com o método descrito por Sanger *et al.* (1977), através do sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). Para isso, adicionou-se 200 ng de DNA plasmidiano purificado e 5 pmol de iniciador específico (*forward* ou *reverse*) a microtubos de 0,2 mL. As amostras foram encaminhadas a empresa Valid Biotechnology que procedeu com o sequenciamento e nos retornou as sequências obtidas.

### 3.1.3. Análise *in silico* da TcMTH

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram processadas para montagem de contigs, correção de bases ambíguas, remoção de sequências de iniciadores e vetores, e corte de regiões de baixa qualidade com o auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler (Heracle Biosoft, versão 3.2.5). A sequência do gene e da proteína TcMTH foi analisada usando as interfaces Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Corpet, 1988) e Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Foi realizada uma busca por motivos conservados na sequência de aminoácidos da proteína TcMTH através do site Conserved Domain Database and Search Service, v2.16 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) e do InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

### 3.1.4. Clonagem no vetor de expressão pROCK-NEO

A superexpressão do gene *TcMTH* foi obtida pelo vetor de expressão pROCK-GFP-NEO (DaRocha *et al.*, 2004) (Anexos). Este vetor permite a expressão estável de um gene de interesse em *T. cruzi* através da integração por recombinação homóloga no cluster de  $\alpha/\beta$ -tubulina presente no genoma do parasito. O processamento correto do transcrito é garantido pela presença de sequências regulatórias no vetor.

O plasmídeo recombinante pGEM-TcMTH foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I (Promega) para liberar o fragmento TcMTH, e o vetor pROCK-GFP-NEO foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I para retirar o fragmento GFP deixando as pontas livres para a ligação de TcMTH. As condições de digestão foram iguais para os dois vetores, sendo utilizados ~2 $\mu$ g de DNA dos vetores. As digestões foram feitas em tampão de digestão apropriado para cada enzima, na concentração especificada pelo fabricante, com 1 U de cada enzima e BSA 1  $\mu$ g/  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 37 °C durante a noite.

As digestões do vetor de superexpressão e do vetor pGEM-TcMTH foram visualizadas em gel de agarose 1% em tampão TAE, corado com brometo de etídio, utilizando-se, para comparação, os vetores pGEM-TcMTH e pROCK- GFP-NEO não digeridos. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio. O fragmento de interesse de 927 pb (TcMTH) proveniente do pGEM-TcMTH e o vetor pROCK digerido (8000 pb) foram puncionados do gel e purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, conforme especificação do fabricante, sendo então, ressuspensos em um volume final de 40  $\mu$ L de água MiliQ autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

A ligação do fragmento correspondente ao cDNA codificador para TcMTH, purificado na etapa anterior, ao vetor de superexpressão pROCK foi feita obedecendo-se a razão molar fragmento/vetor igual a 3:1. A ligação foi realizada em um volume final de 10  $\mu$ L contendo 6 unidades de T4 DNA ligase (GE Healthcare)

em tampão de ligação. Foram utilizados ~50 ng de vetor e ~1,8 µg do fragmento para a ligação. A reação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

O plasmídeo gerado (pROCK-TcMTH) foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes (60 µL). O protocolo para a transformação, a PCR de colônias e a miniprep foram realizados conforme descrito no item 3.1.1. A confirmação da clonagem do gene TcMTH no vetor de expressão pROCK foi realizada através de digestão com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I, seguindo mesmo protocolo descrito anteriormente.

Após a confirmação da digestão, foi realizada a extração do plasmídeo recombinante pROCK-TcMTH em larga escala com o kit *GenElute™ HP Plasmid Maxiprep* (Sigma-Aldrich) e cerca de 1 mg do plasmídeo de interesse foi obtido em alto grau de pureza a partir de 500 mL de cultura de bactérias em fase estacionária, sedimentadas por 10 min de centrifugação a 5000 g, seguindo as determinações do kit.

### **3.1.5. Transfecção e seleção dos parasitos superexpressores**

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Como preparação para a etapa de transfecção, 100 µg do vetor pROCK-TcMTH e do vetor pROCK-EcMutT foram linearizados com a enzima de restrição *Not*I, precipitados com isopropanol e solubilizados em 50µL de água miliQ estéril. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8,0, e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a uma concentração final de 1 x 10<sup>8</sup> células/mL. Em uma cubeta de eletroporação Gene Pulser de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de DNA de interesse. Em seguida foi aplicado o choque elétrico de dois pulsos de 0,3 kV e 500 µF, intervalados por 30 segundos. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo onde sofreram seleção, por cerca de 6 semanas, através do cultivo na presença de 200 µg/mL de G418.

### 3.2. Cultura dos parasitos epimastigotas

Neste trabalho foram utilizados parasitos *T. cruzi* da cepa CL Brener selvagem (WT) proveniente do laboratório do Prof. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os parasitos CL Brener foram transformados com o vetor pROCK\_NEO sem inserto (pROCK), com o vetor pROCK\_MutT\_HIGRO (MutT) ou com o vetor pROCK\_TcMTH\_NEO (TcMTH). Os parasitos nas formas epimastigotas foram cultivados a 28° C em meio LIT (*Liver infusion tryptose*, 0,5% de *liver digested neutralized*, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% KCl, 0,8% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 µg.mL<sup>-1</sup> de hemina, pH 7,3) esterilizado por filtração em filtro de 0,2 µm, suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFBi), mais 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL / 10 mg/mL) (Gibco™).

### 3.3. Extração de RNA e ensaio de RT PCR

O RNA total de parasitos epimastigotas das cepas pROCK e MutT foi extraído utilizando o reagente TRizol® (Invitrogen). Para cada extração foram utilizados 2 x 10<sup>8</sup> células de *T. cruzi* epimastigotas em fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 3000 g por 10 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lisadas pela adição de 1 mL de TRizol e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Ao lisado de células formado adicionou-se 200 µL de clorofórmio seguido de mais 3 min de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4 °C para separação da fase aquosa. À esta fase aquosa incolor separada adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico e a mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o RNA foi precipitado por centrifugação a 12000 g por 10 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (7500 g, 5 min, 4 °C). Após a secagem do precipitado, o RNA foi ressuscitado em 60 µL de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e dosado em NanoDrop. A integridade do RNA extraído foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído e corado com brometo de etídeo.

A fim de garantir uma boa qualidade dos RNAs a serem utilizados nos experimentos de RT-PCR, as amostras foram tratadas com DNase (Ambion – cat:AM1906) e em seguida purificadas com auxílio do kit *RNeasy MiniElute™ Cleanup* (Qiagen). Foram tratados 45 µg de RNA para cada amostra seguindo recomendações dos fabricantes da enzima DNase e do kit. As amostras de RNA livres de impurezas e contaminantes foram quantificadas novamente no NanoDrop e visualizadas em gel de agarose 1,2% desnaturante. Finalmente, o cDNA foi sintetizado a partir dos RNAs totais de *T. cruzi* usando o kit *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada uma reação de controle negativo para cada amostra de cDNA sintetizado, contendo todos os reagentes utilizados no kit, o RNA total, mas sem a enzima transcriptase reversa.

A reação de PCR para avaliar a expressão do gene MutT procedeu-se em seguida, utilizando-se 5 pMol dos iniciadores *RTmuttF* (5'-GTAGGTATTATTCGCAACGAGA -3') e *RTmuttR* (5'-TTTCACCCATTTCAATTTTACCG -3') específicos para um fragmento interno ao gene MutT de *E. coli*. O programa de PCR seguido foi o mesmo descrito no item 3.1.1, e o produto da PCR foi analisado em gel de de poliácridamida 6%, corado por nitrato de prata.

### 3.4. Curva de sobrevivência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com 0, 75, 100 e 125 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 min em PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio LIT sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e distribuídas em placas de 24 poços. Após 72 horas de incubação a 28 °C, a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer, na presença do corante vital eritrosina. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das culturas controle não tratadas crescidas sob as mesmas condições. Os ensaios foram feitos em triplicatas. Cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura à densidade de 1 x 10<sup>7</sup> células/mL. As placas eram mantidas vedadas durante o período de incubação.



### 3.5. Ensaio de QPCR

A fim de analisar o número de lesões no DNA de parasitos *T. cruzi* empregamos a técnica de QPCR. Os procedimentos de extração, quantificação, amplificação por QPCR e análise dos resultados foram realizados como descritos por Santos e colaboradores (2006). Culturas de parasitos em fase exponencial contendo  $1 \times 10^7$  células foram coletadas através de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras de células coletadas (pellets) foram guardadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do DNA.

#### 3.5.1. Extração de DNA de alto peso molecular

Para a extração do DNA genômico das células coletadas foi utilizado o kit *Genomic Tip* (QIAGEN®). Este *kit* permite a purificação de longos fragmentos de DNA (de até 150 kb) sem o uso de fenol ou clorofórmio (que danificam o DNA), possibilitando uma posterior amplificação de longos trechos de DNA. O protocolo utilizado neste trabalho é baseado no protocolo de extração de tecido – sugerido pelo fabricante – com algumas alterações. Após a eluição do DNA, a etapa de precipitação em isopropanol foi realizada incubando os tubos com o mesmo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após as etapas de lavagem com etanol 70%, as amostras de DNA ficaram dissolvendo em 50  $\mu\text{L}$  de TE por pelo menos 2 dias a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.2. Dosagem das amostras de DNA

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

505 e 525 nm. As amostras diluídas tiveram sua concentração corrigida – diluindo ou concentrando – de forma que a diferença de concentração entre a amostra mais concentrada e a menos concentrada fosse menor que 5%.

### 3.5.3. Amplificação por QPCR

Ensaio de quantificações de lesões são realizados comparando a amplificação de um fragmento longo de DNA de uma célula de interesse com a amplificação de uma amostra de célula definida como controle. Uma reação “branco”, sem DNA molde, também é amplificada visando descontar a presença de iniciadores e dNTP das outras reações. Iniciadores específicos foram utilizados para amplificar fragmentos longos (de aproximadamente 10 kb) e curtos (de aproximadamente 250 pb) dos genomas do núcleo e da mitocôndria do *T. cruzi*, e estão listados no quadro abaixo.

Quadro 1 – Iniciadores usados no ensaio de QPCR

Iniciadores	Sequência
QPCRNuc2F	5'-GCACACGGCTGCGAGTGACCATTCAACTTT-3'
QPCRNuc2R	5'-CCTCGCACATTTCTACCTTGTCCTTCAATGCCTGC-3'
QPCRNuc2Int	5'-TCGAGCAAGCTGACACTCGATGCAACCAAAG-3'
QPCRMitF	5'-TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG-3'
QPCRMitR	5'-TTGAAACTGCTTTCCCCAAACGCC-3'
QPCRMitInt	5'-CGCTCTGCCCCATAAAAAACCTT-3'

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

par de iniciadores QPCRNuc2Int e QPCRNuc2R. O fragmento mitocondrial curto foi amplificado com o par de iniciadores QPCRMitInt e QPCRMitR.

Todas as reações de amplificação foram feitas utilizando o kit *GeneAmp XL PCR* (Applied Biosystems), em reações do tipo *hot start*, utilizando as seguintes quantidades de reagentes para cada reação de 50 µL: 9,6 µL de ddH<sub>2</sub>O, 15 µL de 3,3x Buffer, 5 µL de BSA (1 mg/mL), 4 µL de dNTP (2.5 mM cada nucleotídeo), 2,4 µL de MgO(Ac)<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de iniciador *forward* (10 µM), 2 µL de iniciador *reverse* (10 µM). A DNA polimerase é adicionada depois (*hot start*), em seu devido tampão, e as quantidades para cada reação de 50 µL são: 0,5 µL de *rTth XL DNA Polymerase*, 3,13 µL de ddH<sub>2</sub>O e 1,36 µL de 3,3x Buffer.

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

Fragmentos longos (10 kb):

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

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

**Passo 3:** 94 °C por 1 minuto

**Passo 4:** 94 °C por 15 segundos

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

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

**Passo 7:** 72 °C por 10 minutos

**Passo 8:** 4 °C indefinidamente

Fragmentos curtos (250 pb):

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

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

**Passo 3:** 94 °C por 1 minuto

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

**Passo 5:** 72 °C por 45 segundos

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

**Passo 7:** 72 °C por 10 minutos

**Passo 8:** 4 °C indefinidamente

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

#### **3.5.4. Análise dos resultados**

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

### 3.6. Metaciclogênese *in vitro* dos parasitos

As cepas epimastigotas foram diferenciadas para a forma tripomastigota metacíclica a partir de protocolo para metaciclogênese *in vitro* descrito por Figueiredo e colaboradores (2000). Este procedimento foi criado a fim de mimetizar as condições encontradas pelo parasito no intestino do triatomíneo, que são favoráveis a metaciclogênese. As formas epimastigotas foram crescidas até atingirem fase estacionária, em seguida purificadas por centrifugação a 1500 g por 15 minutos a 10 °C e ressuspendidas em meio TAU (*Triatomine artificial urine*, 190 mM NaCl, 8 mM tampão fosfato, pH 6,0, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) a concentração de 5 x 10<sup>8</sup> c/mL. Após 2 horas de incubação, os parasitos foram diluídos em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 0,035% bicarbonato de sódio, 10 mM L-prolina, 50 mM sódio glutamato, 2 mM sódio L-aspartata e 10 mM glicose) para uma concentração de 5 x 10<sup>6</sup> c/mL e incubados por 6 dias a 28 °C em garrafas de culturas. Este meio e as condições de incubação, induzem a adesão dos parasitos ao fundo da garrafa, como observado no intestino do hospedeiro invertebrado, e provocam a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas que ficam livres no sobrenadante. Posteriormente, as células diferenciadas foram coletadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio DMEM para a infecção das culturas de células.

### 3.7. Cultura de células e parasitos tripomastigotas

Durante este trabalho, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura celular *in vitro*. Células LLC-MK<sub>2</sub>, isoladas de epitélio de revestimento de rim de macaco Rhesus e posteriormente imortalizadas (gentilmente cedidas pela Dra. Norma Andrews/ Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, USA), foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Switzerland) e meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco™) contendo 4,0 g/L de glicose, 4,0 mM de glutamina e suplementado com 10% de SFBi (Gibco™), mais 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL / 10 mg/mL) (Gibco™), além de bicarbonato de sódio na concentração de 3,7 g/L (DMEM 10%).

Sete dias após o plaqueamento das células foi realizado o repasse das mesmas. Uma das garrafas contendo uma monocamada com 75 a 90% de confluência era lavada 2 vezes com solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*, KCl 2,667 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,471 mM; NaCl 137,931 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 8,060 mM) e submetida à dissociação química por tripsina a 0,05% (Gibco™). As células dissociadas foram ressuspensas em meio DMEM 10% e repassadas, na proporção 1:20 (uma parte de células em suspensão para cada 20 partes de meio de cultura), para outras garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. Após uma semana de incubação em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, estas garrafas foram utilizadas para a infecção com *T. cruzi* ou para o repasse das células.

Para a infecção com o *T. cruzi* e manutenção do ciclo intracelular do parasito em células LLC-MK<sub>2</sub>, foram utilizados 4 x 10<sup>6</sup> tripomastigotas de cultura de células (TCTs) da cepa CL Brener de *T. cruzi*, transformadas ou não com o vetor de expressão pROCK, em meio DMEM contendo 2% SFBi e as mesmas concentrações de penicilina/estreptomicina e de glutamina utilizadas no meio contendo 10% de soro (DMEM 2%). As células foram expostas ao parasito por 48 horas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, lavadas e reincubadas no mesmo meio sem parasitos. O meio das células foi trocado a cada dois dias. No sétimo dia de infecção, o meio contendo as formas tripomastigotas foi coletado de cada garrafa, transferido para tubos de centrifuga de 50 mL e centrifugado a 447,60 g, por 10 minutos a 25 °C a fim de eliminar as formas amastigotas contaminantes e debris celulares, auxiliando assim a purificação das formas tripomastigotas. Após a centrifugação, os tubos foram transferidos para a incubadora a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 3-4 horas para permitir que as formas tripomastigotas, flageladas, subissem para o sobrenadante. Por fim, o sobrenadante destes tubos foi recolhido e as formas tripomastigotas purificadas foram contadas na porção central da câmara de Neubauer e utilizadas nos ensaios de infecção.

Linhagem de fibroblastos originalmente isolados de camundongos tipo selvagem e imortalizados (gentilmente cedidas pelo Dr. Paul Saftig/Kiel Universitat - Alemanha) foi mantida em meio de cultura DMEM 10%. Estas células foram repassadas a cada dois dias na proporção de 1:10, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Todas as culturas de células foram mantidas

em estufa úmida, a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> para possibilitar o tamponamento do meio de cultura.

### **3.8. Ensaio de infecção *in vitro***

Para as infecções experimentais, culturas de fibroblastos, foram quimicamente dissociadas por solução de tripsina 0,05% (Gibco™) a 37 °C e posteriormente ressuspendidas no meio em que foram cultivadas. As células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro) em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL. As células foram incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Para a infecção, as formas tripomastigotas das cepas WT, pROCK e MutT foram purificadas como descrito no item anterior e contadas em câmara de Neubauer. A concentração dos parasitos foi ajustada de modo a obter uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 50 parasitos por célula em todos os grupos. Os parasitos foram incubados com as células por 30 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e, em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS complementado com CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> (PBS+/+), que previne desprendimento das células da monocamada, para a retirada de tripomastigotas livres que não foram internalizadas. Após a lavagem, adicionou-se meio de cultura novo e as células infectadas foram novamente incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% em intervalos determinados de acordo com o objetivo do experimento. Para a determinação do crescimento intracelular dos parasitos, os tempos de incubação após a retirada dos parasitos foram de 30 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas. Para os experimentos de cinética de escape do vacúolo parasitóforo, as lamínulas foram fixadas com 30 minutos, 4, 8, 12, 16 e 24 horas de incubação após a lavagem dos parasitos. Os ensaios com tratamento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizados seguindo o mesmo protocolo do experimento para determinação do crescimento intracelular, porém, os parasitos foram tratados durante 3 horas com 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes da infecção. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos 2 vezes para a confirmação dos resultados.

### 3.9. Imunofluorescência

Após a fixação das lamínulas em paraformaldeído 4%, procedeu-se com a coloração das mesmas por método de imunofluorescência adaptado de protocolos previamente estabelecidos (Tardieux *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 2004). Para isso, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS+/+ e incubadas por 20 minutos em solução de PBS+/+ e 2% de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma®) para o bloqueio de ligações inespecíficas dos anticorpos. Em seguida, para distinguir as formas tripomastigotas extracelulares dos parasitos intracelulares, as lamínulas foram incubadas por 50 minutos com anticorpo policlonal anti *T. cruzi* (gentilmente cedido pela Profa. Rosa Maria Esteves Arantes, Departamento de Patologia, ICB – UFMG), feito em coelho, diluído na proporção de 1:500 em PBS+/+ 2% BSA. Após este período de incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS+/+ 2% BSA para a remoção do excesso de anticorpo não ligado. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-Fluor 546 (*Alexa-Fluor® 546 Goat anti-rabbit IgG* (H+L) 2 mg/mL - Invitrogen®), por 40 minutos em câmara úmida e escura, diluído 1:250 em PBS+/+ 2% BSA. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente por 3 vezes com PBS+/+ 2% BSA.

A fim de evidenciar os parasitos internalizados e associados ao vacúolo parasitóforo, foi realizada a permeabilização das células através do tratamento das lamínulas com solução de PBS+/+ 2% BSA contendo 0,5% saponina (*Saponin from quillaja bark*, Sigma®) por 20 minutos. Após a permeabilização, as lamínulas foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-LAMP1 (uma glicoproteína lisossomal) (Hybridoma Bank - 1D4B, gentilmente cedido pela Dra. Norma Andrews, Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, USA), por 50 minutos. Este anticorpo foi diluído na proporção de 1:50 em solução PBS+/+ 2% BSA/ 0,5% saponina. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com solução PBS+/+ 2% BSA/ 0,5% saponina e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de rato conjugado com Alexa-Fluor 488 (*Alexa-Fluor® 488 Goat anti-rat IgG* (H+L) 2 mg/mL - Invitrogen®). Neste passo, o tempo de incubação foi de 40 minutos e a diluição foi de 1:250 em solução PBS+/+ 2% BSA/ 0,5% saponina. Terminada



esta incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS+/-/ 2% BSA/ 0,5% saponina e 3 vezes com PBS+/-.

O DNA das células e parasitos foi marcado por 1 minuto de incubação com o corante DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen®) diluído 1:1000 em PBS+/-/. As lamínulas foram lavadas 4 vezes com PBS+/-/ para a retirada do excesso de DAPI. Ao fim da lavagem, realizou-se a montagem em lâminas de vidro com gel de montagem para fluorescência (*Slowfade® Antifade* kit – Invitrogen®) e selagem das mesmas com esmalte incolor.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Axioplan-2 (Zeiss®) pela objetiva de imersão (aumento de 63x, NA = 1,25). Foram analisados 10 a 15 campos aleatórios, por lamínula, totalizando um número mínimo de 250 células. Em cada campo, foi contado o número total de células e parasitos (filtro azul,  $\lambda_c = 365$  nm), o número de parasitos extracelulares (filtro vermelho,  $\lambda_c = 546$  nm) e o número de parasitos associados a lisossomos (filtro verde,  $\lambda_f = 450-490$  nm). A marcação realizada permitiu avaliar a eficiência da infecção de cada cepa através da razão parasitos intracelulares para cada 100 células, além do crescimento intracelular das cepas pelo número de parasitos intracelulares por célula infectada. Também foi determinada (quando necessário) a porcentagem de parasitos associados ao vacúolo parasitóforo pela co-localização com o marcador lisossomal LAMP1.

### **3.10. Análise da expressão de proteínas da rede antioxidante**

#### **3.10.1. Preparo de extratos proteicos**

Parasitos na forma epimastigota em concentrações entre  $1 - 2 \times 10^7$  células/mL foram incubados ou não (controle) com  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M), por 30 minutos em PBS. As células foram coletadas por centrifugação (3000 rpm, 10 min) e ressuspensas em 80  $\mu$ L de PBS/1mM  $MgCl_2$  e em mesmo volume de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Tween 20, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM  $Na_3VO_4$ , 1 mM NaF, 0.1 mM PMSF, aprotinina 1 $\mu$ g/mL; leupeptina 1 $\mu$ g/mL). As suspensões foram então sonicadas (Bandelin Sonoplus Homogenisatoren®) por 10

ciclos de 1 seg, com intervalo de 1 seg e 30% amperagem máxima. Os extratos foram incubados por 2 h no gelo e subsequentemente centrifugados (14000 rpm, 4 °C, 15 min). Separou-se o sobrenadante do pellet, e foi adicionado a cada extrato volume igual de tampão de amostra (100mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 0,02% azul de bromofenol, 20% glicerol, 200mM  $\beta$ -mercaptoetanol), sendo que para cada extrato foi separado uma amostra para dosagem da concentração proteica à qual não foi adicionado tampão. As amostras contendo tampão de amostras foram aquecidas em banho seco a 96 °C por 4 min. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry (Hartree, 1972) nos extratos sem tampão de amostra.

### 3.10.2. Ensaios de Western Blot

Para os ensaios de western blot, 30  $\mu$ g de cada extrato proteico foram separados por eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) (acrilamida 10%, Tris HCl pH 8,8 0,25 M, SDS 0,1%) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%). A eletroforese foi realizada a 200 volts por 1 hora no gelo. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) a 200 mA durante 30 minutos em sistema de transferência semi-seca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), utilizando-se tampão de transferência (Glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi bloqueada por incubação com solução de bloqueio (PBS, Tween 0,05%, leite desnatado em pó 5%) sob agitação por 1 h e em seguida lavada para incubação com os anticorpos.

Os anticorpos utilizados foram anticorpos policlonais de coelho para as principais proteínas da rede antioxidante de *T. cruzi*: as Tryparedoxina peroxidase citosólica (TcCPx) e mitocondrial (TcMPx). Estes anticorpos foram gentilmente cedidos pela Prof. Fernanda Ramos Gadelha, da UNICAMP. As membranas foram incubadas na presença dos anticorpos em questão por 2 horas sob agitação constante, respeitando suas respectivas diluições:  $\alpha$ -TcCPx (1:2000),  $\alpha$ -TcMPx (1:2500). Após três ciclos de lavagem de 15 min com PBS adicionado de 0,05% Tween 20 (PBS-T) as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugada à enzima peroxidase (Cell Signaling Technology®, diluído

1:5000) por 1 hora. Ao final da incubação, lavou-se as membranas três vezes com PBS. As bandas foram reveladas usando o kit para quimioluminescência *Super Signal Detection*<sup>®</sup> (Pierce). Ao final de cada revelação, as membranas foram tratadas pelo processo de *Stripping*, que consiste em incubar a membrana por 30 min em solução Glicina 25 mM, SDS 1%, pH 2, sob agitação, seguida de duas lavagens de 10 min em PBS. Este processo retira toda marcação de anticorpo realizada na membrana e permite que ela seja reutilizada em outras marcações. A revelação com o anticorpo anti  $\beta$ -tubulina (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology) assim como um gel réplica corado com coomassie foram utilizados para normalização da quantidade de proteínas aplicada no gel. As imagens das bandas foram analisadas pelo programa Scion Imaging<sup>®</sup> e normalizadas em relação ao gel SDS-PAGE controle.

### 3.11. Experimentos de infecção *in vivo*

Os experimentos de infecção *in vivo* foram realizados no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ). Os animais utilizados eram camundongos Suíços fêmeas, com 3 semanas de idade, cedidos pelo Biotério de Produção também do CPqRR. As formas tripomastigotas de cultura de tecido foram purificadas, seguindo mesmo procedimento descrito no item 3.7, contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio DMEM a fim de obter um inóculo de 5000 parasitas por animal. Os parasitos foram inoculados via intraperitoneal, em grupos de 5 animais para cada cepa. A parasitemia foi avaliada através da contagem das tripomastigotas em 5  $\mu$ L de sangue da veia caudal dos animais infectados. As contagens foram realizadas a partir do 3<sup>o</sup> dia de infecção em dias alternados, até a parasitemia se tornar indetectável ou estável em um nível muito baixo. O número de parasitos por mL de sangue foi calculado de acordo com protocolo descrito anteriormente (Brener, 1962). Este experimento foi repetido 3 vezes para chegar ao resultado apresentado. Todos os animais foram manipulados seguindo as normas de boas práticas animais, como definido pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ, Licença nº L-058/08).

### **3.12. Análise experimental**

Nos experimentos de infecção *in vitro*, a infectividade das cepas foi analisada pelo teste One-way ANOVA, enquanto que a cinética de escape de vacúolo e o crescimento intracelular foram avaliados pelo Two-way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Bonferroni, para comparação individual entre as cepas. As parasitemias dos animais infectados foram comparadas por teste *t* para amostras não pareadas. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.

ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

# 4. Resultados

GCTCACAAAACGTACGGCAAAACTCCGTCATCATAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAAGTCCGGATGAGGTCGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTTGTTTCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

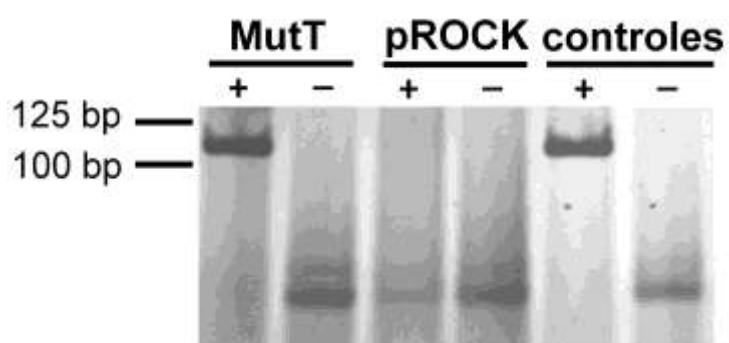
#### 4.1. Confirmação da expressão heteróloga de MutT em *T. cruzi*

A enzima MutT de *E. coli* é uma 8-oxo-dGTPase, que hidrolisa 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos a 8-oxo-dGMP, impedindo assim a incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA (Nakabeppu *et al.*, 2006). O sequenciamento do genoma completo da cepa CL Brener indicou a ausência de ORFs com homologia predita à MutT, embora ortólogos de MutY e MutM tenham sido identificados (El-Sayed *et al.*, 2005). Foi demonstrado anteriormente, que uma busca por homólogos funcionais de MutT, através do domínio conservado Nudix, apontou várias ORFs contendo possíveis Nudix hidrolases (Furtado & Machado, 2009). Dentre estas sequências, foi identificado um alelo com características que podem indicar um possível ortólogo da enzima MutT em *T. cruzi*. Entretanto, este candidato ainda estava em processo de caracterização pelo nosso grupo. Por este motivo, optamos por iniciar nosso trabalho com a cepa superexpressora da enzima MutT de *E. coli* transformada pela Dra. Carolina Furtado em sua tese de doutorado.

A enzima MutT de *E. coli* foi clonada no vetor de expressão pROCK e subsequentemente transfectada em epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi*. A expressão heteróloga do gene de *E. coli* nos parasitos pôde ser confirmada através da RT-PCR a partir do RNA total extraído dos parasitos transformados com MutT (Figura 10). O fragmento esperado de 112 pb do gene *mutT* foi amplificado a partir do cDNA de parasitos transformados com o gene de interesse e do controle positivo. O mesmo fragmento não pôde ser amplificado a partir da cultura de epimastigota transformada com o vetor pROCK vazio.

#### 4.2. A expressão heteróloga de MutT em *T. cruzi* não altera o crescimento das epimastigotas mas aumenta a sobrevivência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Confirmada a expressão heteróloga da MutT, partimos para a avaliação do comportamento do parasito na forma epimastigota *in vitro*. Primeiramente, a cepa superexpressora de MutT foi comparada com a cepa selvagem com relação ao seu



**Figura 10: Confirmação da expressão heteróloga da MutT por RT-PCR.**

O RNA total dos parasitos transfectados com o vetor *pROCK\_MutT* ou vetor vazio *pROCK* foi extraído e usado na RT-PCR. O fragmento da MutT com tamanho esperado de 112 bp foi amplificado dos parasitos transformados com o gene de interesse (MutT +) e controle positivo (DNA total de *E. coli*). MutT - e pROCK -: controle negativo da RT-PCR sem transcriptase reversa; controle -: controle da PCR sem DNA molde.

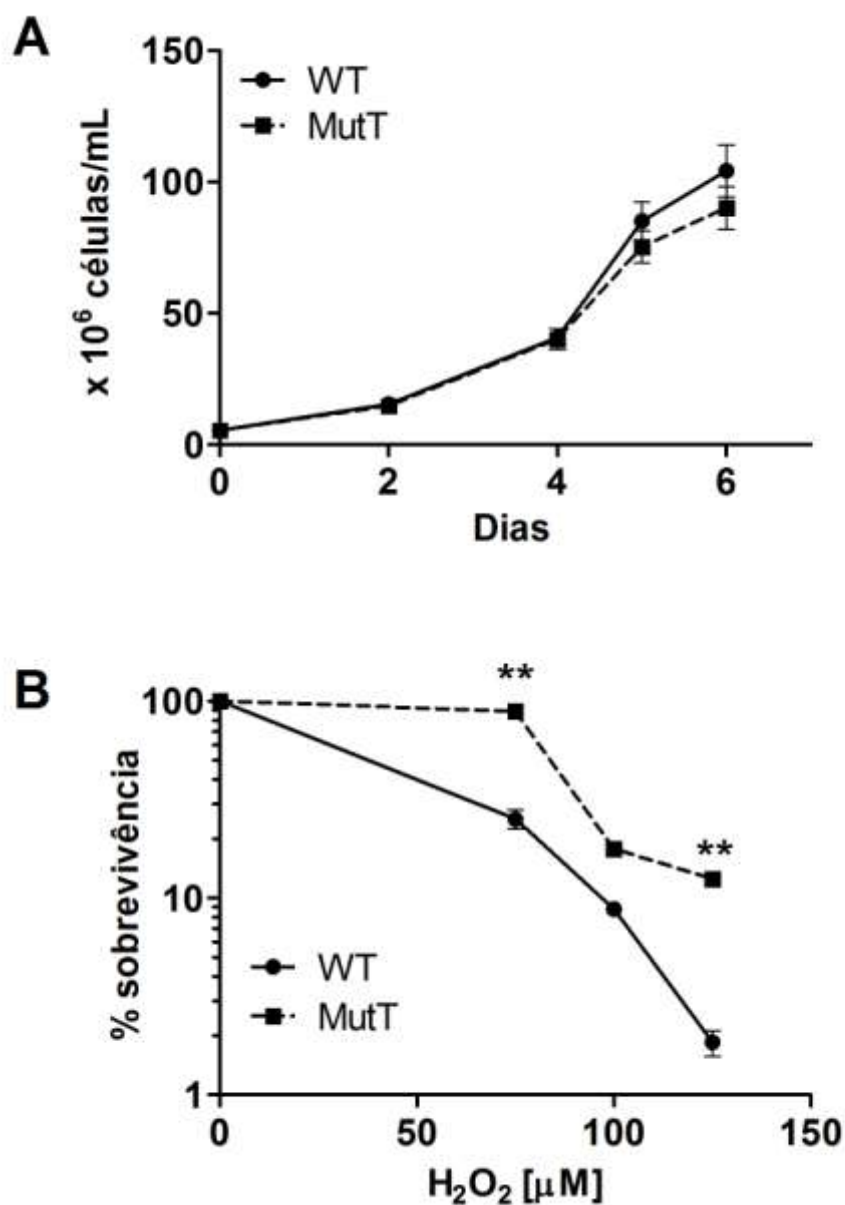
crescimento em condições normais. Foi visto que as células epimastigotas da cepa MutT crescem de maneira similar a selvagem, indicando que a expressão deste gene exógeno não influencia na replicação da célula nestas condições (Figura 11A).

Em seguida, para investigar se a expressão de MutT altera a resposta do *T. cruzi* ao estresse oxidativo, a sobrevivência frente ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da cepa superexpressora de MutT foi comparada com a cepa selvagem. Para isso, as culturas de epimastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a viabilidade das células foi avaliada depois de 3 dias. Os resultados mostraram que a cepa MutT é mais resistente ao dano oxidativo causado pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparada com a WT (Figura 11B). Na presença de 75 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 88% das células transformadas sobreviveram em contraste com a selvagem com apenas 25%. Após o tratamento com 125 µM, foi observado aproximadamente 12% de sobrevivência para MutT contra apenas 1,8% da WT.

### **4.3. Epimastigotas que expressam MutT apresentam menos lesões no DNA nuclear**

A técnica de análise de dano no DNA por PCR quantitativa (QPCR) foi empregada para comparar a extensão do dano no DNA no genoma das cepas de parasitos usados neste trabalho. Esta técnica baseia-se no princípio de que muitos tipos de lesões no DNA podem atrasar ou até mesmo bloquear a progressão da DNA polimerase (Santos *et al.*, 2006). Sendo assim, se quantidades iguais de DNA de amostras diferentes são amplificadas por QPCR em condições iguais, o DNA que possuir menos lesões vai apresentar uma amplificação maior do que o DNA mais danificado. A técnica de QPCR tem como vantagem uma alta sensibilidade, pois utiliza a metodologia de PCR longa com a amplificação de fragmentos de DNA de 10 kb ou mais. Isto permite detectar níveis muito baixos de lesões (aproximadamente 1 por 10<sup>5</sup> kb). Além disso, por ser um método baseado em PCR, é possível usar poucos nanogramas de DNA genômico total para analisar lesões no DNA de uma amostra. Este método mostrou-se de grande valor em identificar danos oxidativos no DNA mitocondrial e nuclear, e já foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa para a quantificação desses danos em *T. cruzi* (Santos *et al.*, 2006; Furtado *et al.*, 2012).





**Figura 11: Curvas de crescimento e sobrevivência em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de *T. cruzi*.**

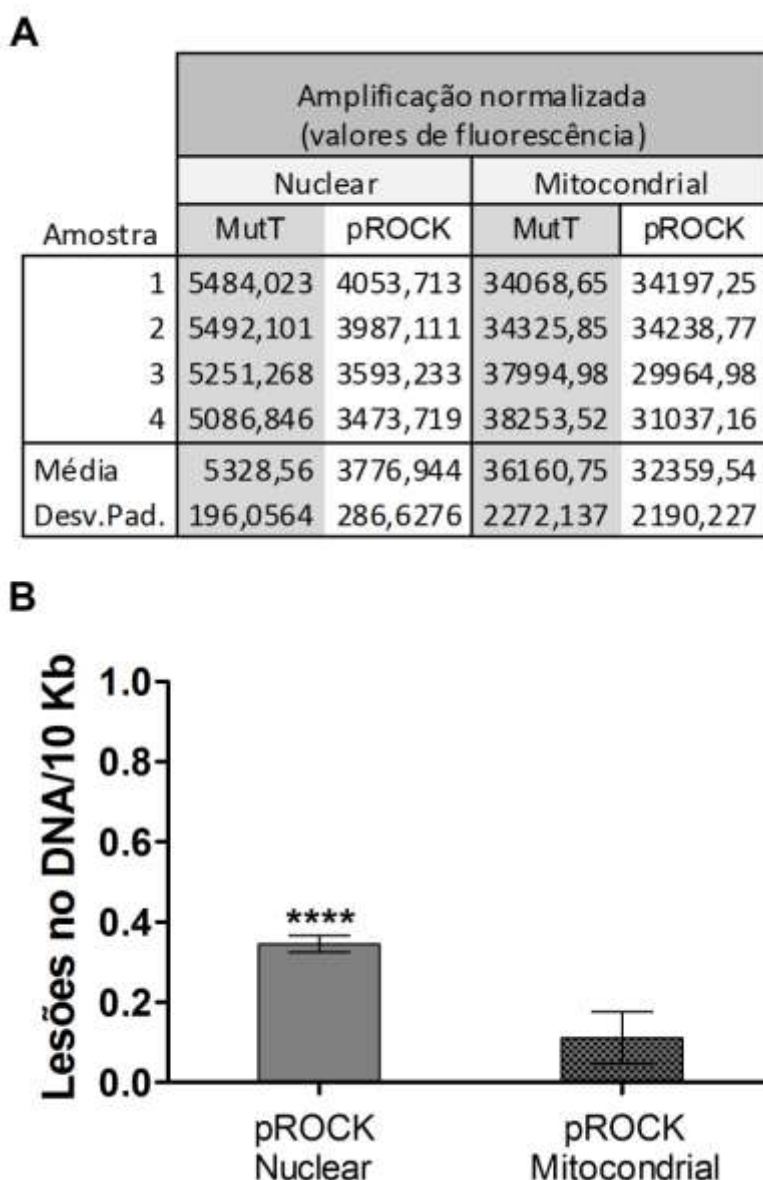
Parasitas na forma epimastigotas WT e MutT foram crescidos em meio LIT e monitorados por 6 dias até a fase estacionária (A). Para a curva de sobrevivência, WT e MutT foram submetidos a tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, crescidos em meio LIT por 3 dias e depois contados (B). Experimentos foram realizados em triplicatas. Porcentagem de sobrevivência foi medida em relação a células não tratadas. \*\* P<0,01, Teste *t* pareado.

Para este ensaio, foi realizado a extração de DNA de parasitos que expressam a MutT de *E. coli*, assim como parasitos transformados com o vetor pROCK vazio. A partir deste DNA extraído, realizou-se as amplificações dos fragmentos curtos (aproximadamente 250 pb, usados para normalizar o resultado de amplificação) e longos (aproximadamente 10 kb, no qual poderia ser encontrada alguma lesão que retardasse a amplificação). Como esperávamos que a cepa MutT apresentasse menos lesões no DNA do que a cepa pROCK, a primeira foi definida como célula controle e a amplificação obtida a partir do DNA das células pROCK foi comparada com este controle. Assim, o gráfico apresentado na Figura 12 mostra que as células MutT apresentaram menos lesões no seu DNA nuclear quando comparadas com a cepa pROCK. Foi observado que a cepa pROCK apresentou aproximadamente 0,34 lesões/10 kb a mais do que a cepa MutT (Teste T,  $P < 0,0001$ ). No entanto, o número de lesões no DNA mitocondrial da cepa pROCK não foi significativamente maior quando comparado a cepa MutT.

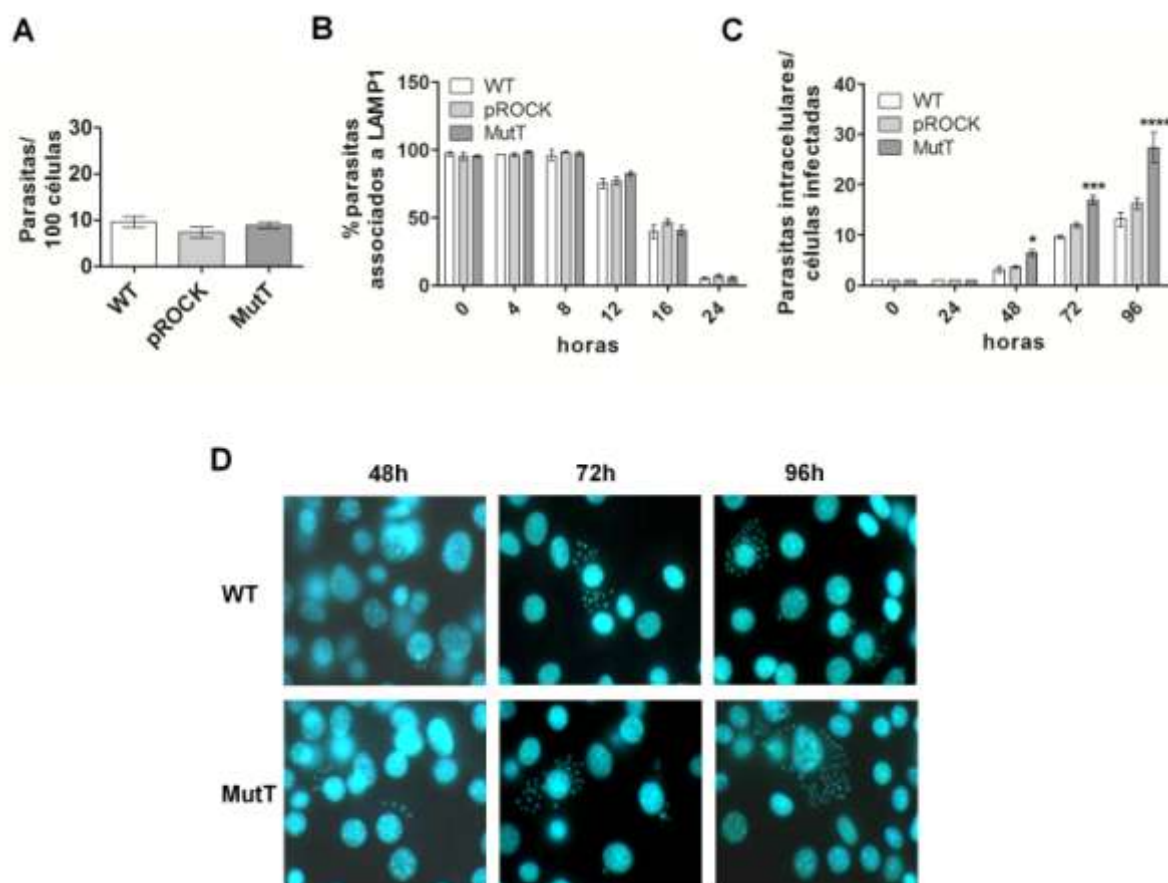
#### **4.4. A expressão heteróloga da MutT aumenta o crescimento intracelular *in vitro* do *T. cruzi***

Prosseguimos com a investigação da importância do estresse oxidativo para viabilidade celular do *T. cruzi* através de experimentos de infecção intracelular *in vitro* que permitem analisar as outras fases do ciclo de vida do parasito. No experimento de invasão celular observamos que a entrada dos parasitos da cepa MutT foi igual à dos controles, WT e pROCK (Figura 13A), indicando que a expressão heteróloga de MutT é indiferente para o processo de invasão (Oneway Anova, n.s.). Este efeito seria esperado, uma vez que a superexpressão de enzimas de reparo provavelmente não teria influência direta sobre a interação do parasito com a célula hospedeira, pois nesse período o parasito está na forma não replicativa e danos ao seu DNA não seriam facilmente percebidos.

Em seguida, analisamos o tráfego intracelular das 3 cepas (WT, pROCK e MutT). O gráfico deste experimento mostra que, até 8 horas pós infecção, 100% dos parasitos, independente da cepa, estão associados com marcadores lisossomais. Isto indica que até este período todos os parasitos encontram-se dentro do vacúolo



**Figura 12: Análise das lesões no DNA de parasitos pROCK comparados com MutT através de ensaio QPCR.** Primers específicos foram usados para amplificar os fragmentos grande e pequeno do DNA nuclear e mitocondrial. A amplificação normalizada das células pROCK foi comparada a MutT (A), e a amplificação relativa foi calculada. Estes valores foram utilizados para estimar a média do número de lesões por 10 kb do genoma em relação aos parasitos MutT (B). \*\*\*\* P value < 0,0001 Teste *t* não pareado.



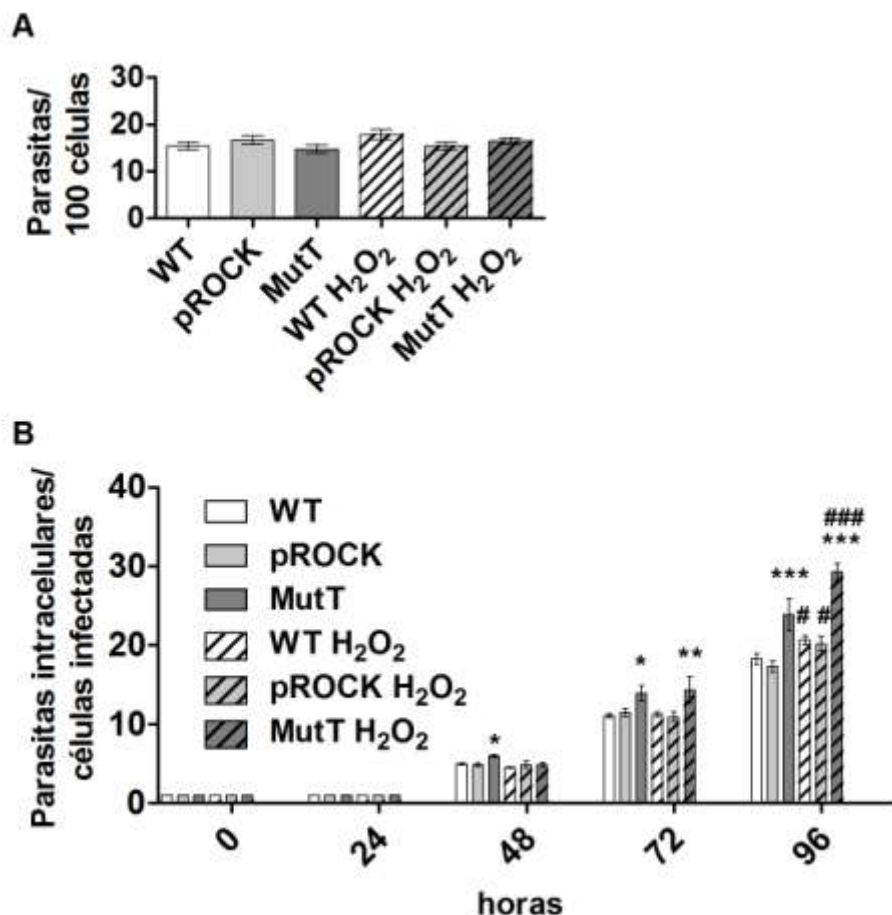
**Figura 13: Experimentos de infecção em fibroblastos.**

(A) Infectividade de parasitos WT, pROCK e MutT foi determinada pela contagem das tripomastigotas internalizadas por 100 células, logo após a exposição aos parasitos. (B) Cinética de escape do vacúolo parasitóforo foi determinada pela análise do número de parasitos que co-localizam com LAMP1, um marcador lisossomal, em intervalos de até 24 horas após a infecção. (C) Curva de crescimento intracelular dos parasitos foi realizada pela contagem de amastigotas intracelulares até 96 horas após a infecção. (D) Imagens representativas de fibroblastos murinos infectados com *T. cruzi* WT ou MutT a uma multiplicidade de infecção igual a 50. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,05$ .

parasitóforo. Após 8 horas de infecção há um crescente aumento de parasitos sem associação com marcadores lisossomais, indicando que após este período os parasitos começam a escapar do vacúolo parasitóforo para o citosol. A cinética de escape do vacúolo parasitóforo foi igual para as três cepas (Figura 13B; Anova de dois fatores, n.s.). Esse resultado indica que a expressão de MutT exógena também não leva a alterações no mecanismo de escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo. Este resultado também mostra que as 3 cepas passam pelas mesmas condições no momento de invasão e durante seu tráfego intracelular.

Como mencionado anteriormente, após o escape do vacúolo parasitóforo o *T. cruzi* transforma-se na forma amastigota replicativa e inicia seu processo de multiplicação intracelular. Análises da curva de crescimento intracelular para as três cepas mostraram que a cepa que expressa a enzima MutT de *E. coli* apresentou um crescimento maior do que as cepas controle, WT e pROCK (Figura 13C). O teste ANOVA de dois fatores mostrou que a diferença foi estatisticamente significativa (pós-teste de Bonferroni;  $P < 0,001$ ) a partir das 72 horas de infecção. A diferença torna-se ainda maior após 96 horas de infecção (Anova de dois fatores com pós-teste de Bonferroni;  $P < 0,0001$ ). Estes resultados mostram que a forma amastigota da cepa transformada apresenta um comportamento bem diferente da sua forma epimastigota mostrando um crescimento maior no interior da célula em relação aos controles. A figura 13D apresenta imagens representativas deste experimento de infecção, onde pode-se observar a formação de ninhos de amastigotas maiores nos fibroblastos infectados pela cepa MutT, em comparação com a cepa WT. Uma vez que já foi demonstrado que a infecção celular pode gerar um estresse oxidativo com produção de espécies reativas já com 24 horas de infecção (Gupta *et al.*, 2009a), os resultados acima sugerem que os parasitos MutT seriam mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pela infecção celular.

Para provar que a maior replicação observada para a cepa MutT era mesmo relacionada a uma maior resistência ao estresse oxidativo, realizamos uma segunda curva de crescimento intracelular na qual os parasitos passaram por um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e então foram submetidos a infecção seguindo o mesmo protocolo do primeiro experimento. Neste experimento, a infectividade do grupo tratado com  $H_2O_2$  foi igual a do grupo não tratado (Figura 14A, Oneway anova, n.s.). Na curva de crescimento intracelular (Figura 14B) podemos



**Figura 14: Experimento de infecção em fibroblastos com tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

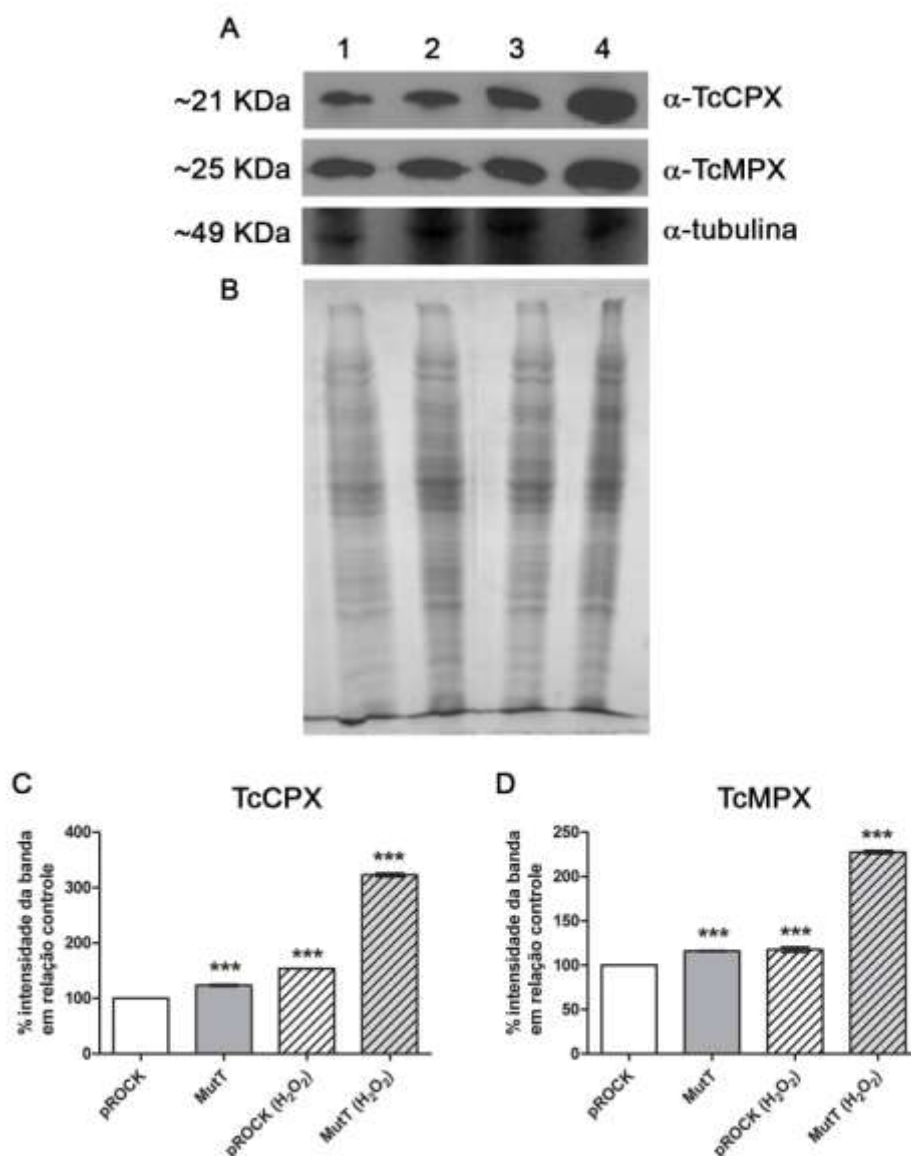
(A) Infectividade de parasitos WT, pROCK e MutT após tratamento foi determinada através do pré-tratamento das tripomastigotas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes do ensaio de invasão e contagem de tripomastigotas internalizadas por 100 células, logo após a exposição aos parasitos. (B) Curva de crescimento dos parasitos após tratamento com 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada pela contagem de amastigotas intracelulares até 96 horas após a infecção. O asterisco (\*) indica as diferenças significativas de parasitos MutT comparados aos controles, e o símbolo # refere-se às diferenças significativas do grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao grupo de parasitos não tratados. \*\*\* P < 0,001, \*\* P < 0,01, \* P < 0,05.

observar que o grupo que não foi tratado com  $H_2O_2$ , como esperado, apresentou o mesmo comportamento do primeiro experimento, onde a cepa MutT cresceu mais do que os controles após 72 horas de infecção. O perfil de infecção celular para o grupo tratado com  $H_2O_2$  apresentou, em geral, o mesmo comportamento do grupo não tratado com até 72 horas de infecção, onde os parasitos superexpressores de MutT apresentaram uma maior taxa de multiplicação intracelular em relação aos seus respectivos controles. No entanto, após 96 horas de infecção todos os parasitos (WT, pROCK e MutT) que foram tratados com  $H_2O_2$  apresentaram crescimento significativamente maior do que seus respectivos pares que não sofreram pré-tratamento. Importante ressaltar que, após 96 horas de infecção, a diferença encontrada entre os parasitos MutT tratados e não tratados foi significativamente maior (Anova de dois fatores com pós-teste de Bonferroni,  $P < 0,001$ ) do que aquela encontrada entre os pares WT e pROCK tratados e não tratados. Este resultado sugere uma recuperação melhor destas células frente ao dano oxidativo causado ao seu DNA pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.

#### **4.5. Enzimas antioxidantes têm seus níveis influenciados pela expressão de MutT**

Como a cepa MutT apresentou um crescimento ainda maior após o tratamento com estresse oxidativo, nos questionamos o que poderia ocasionar este comportamento. Resolvemos então investigar se a expressão heteróloga da enzima MutT poderia de alguma forma influenciar o sistema antioxidante do parasito através de ensaios de Western blot utilizando anticorpos para as tryparedoxinas peroxidases citosólica e mitocondrial (TcCPx e TcMPx). Para isso, extratos de proteínas totais das cepas pROCK e MutT foram produzidos a partir de epimastigotas em fase exponencial de crescimento, tratadas ou não com  $H_2O_2$ . As proteínas foram resolvidas por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 15B), transferidas para membrana de PVDF e reveladas com os anticorpos referidos acima (Figura 15A).

A densitometria das bandas obtidas no Western blot revelou que os parasitos MutT apresentaram níveis um pouco maiores de TcCPX (Figura 15C) e TcMPX (Figura 15D) quando comparados com o controle pROCK (Oneway Anova, pós-teste de Bonferroni,  $P < 0,001$ ). Após o tratamento com  $H_2O_2$  os parasitos MutT



**Figura 15: Análise da expressão das enzimas TcCPX e TcMPX nos parasitos pROCK e MutT.** Extratos de proteínas de *T. cruzi* foram preparados e resolvidos por SDS-PAGE (30 µg de proteína por canaleta). (A) Análise de western blot de TcCPX, TcMPX e β-tubulina de parasitos não tratados das cepas pROCK (1) e MutT (2), ou parasitos tratados com 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das cepas pROCK (3) e MutT (4). Um gel SDS-PAGE corado com coomassie assim como a β-tubulina foram usados como controle para a quantidade de proteínas aplicada no gel (B). A figura mostra o melhor representante de 3 experimentos independentes. A intensidade do sinal obtida para cada enzima estudada no controle pROCK não tratado foi definida como 100% e os níveis de enzimas dos outros parasitos foram avaliados como porcentagem em relação a esse controle. Os resultados foram expressos em gráficos para cada enzima: TcCPx (C) e TcMPx (D). O teste estatístico One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi empregado para análise dos dados. O símbolo asterisco (\*) mostra as diferenças significativas em relação ao controle pROCK não tratado (\*\*\*) P < 0,001).



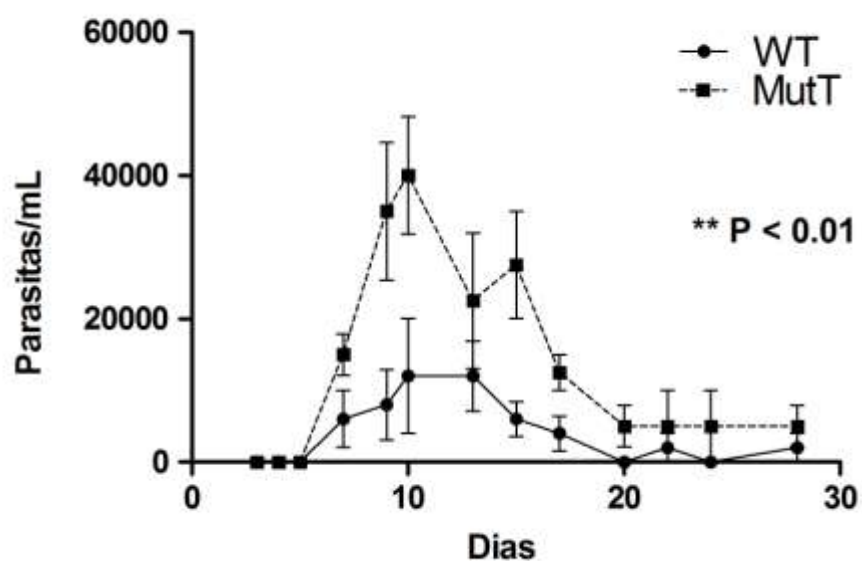
mostraram um forte aumento na expressão destas peroxidases, com níveis cerca de 3x maior da TcCPX e 2x maior para a TcMPX ( $P < 0,001$ ). A cepa pROCK tratada por  $H_2O_2$  apresentou um pequeno aumento na expressão da TcCPX e TcMPX ( $P < 0,001$ ).

De modo geral, os resultados indicam que parasitos MutT aumentam os níveis de proteínas antioxidantes após o tratamento oxidativo para índices muito maiores do que os níveis observados nos parasitos da cepa controle pROCK que passaram ou não pelo tratamento com  $H_2O_2$ .

#### **4.6. A multiplicação dos parasitos *in vivo* é aumentada pela expressão da MutT de *E. coli***

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos em cultura de células, optamos por infectar e avaliar a parasitemia de camundongos suíços. Grupos de 6 animais com 3 semanas de idade foram infectados com 5000 TCTs das cepas WT ou MutT via intraperitoneal. A avaliação da parasitemia por até 28 dias pós-infecção, revelou que os animais infectados com a cepa MutT apresentaram níveis de parasitemia mais altos e estatisticamente significativos quando comparados com os animais infectados com parasitos WT (Figura 16; teste T pareado,  $P < 0,01$ ). Esta diferença mostrou-se mais marcante após 7 dias de infecção, e os animais infectados com MutT sustentaram níveis de parasitemia maiores por um período de tempo mais longo em relação aos camundongos infectados com WT.

Este resultado corrobora com o observado nas culturas de células, que mostraram que a superexpressão da MutT favorece um crescimento mais pronunciado das amastigotas no interior da célula hospedeira. Esta maior replicação pode promover a liberação de um número maior de formas tripomastigotas do parasito no sangue do hospedeiro, e assim um nível mais alto de parasitemia.



**Figura 16: Parasitemia dos animais infectados com parasitos WT ou MutT.**

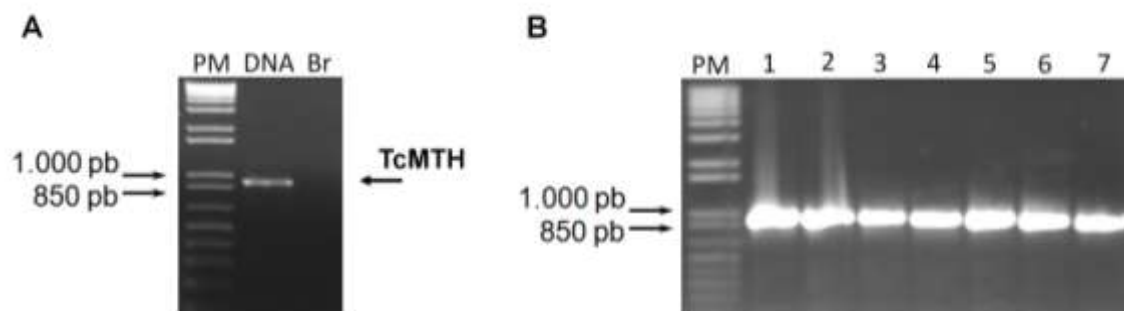
Camundongos suíços fêmeas com 3 semanas de idade foram infectados intraperitonealmente com 5000 TCTs e a parasitemia foi avaliada por até 28 dias pós-infecção. Diferença estatística encontrada entre as duas curvas por teste *t* está representada no gráfico.

#### 4.7. Sequenciamento e análise *in silico* do gene TcMTH

Em sua tese de doutorado, a aluna Carolina Furtado identificou um possível homólogo de MutT em *T. cruzi*. Este gene foi encontrado através de uma busca detalhada no banco de dados TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010) por sequências com homologia ao domínio Nudix. Observou-se que haviam duas sequências anotadas como “possíveis Nudix hidrolases” que apresentavam homologia com a MTH de *T. brucei*. Como estas sequências se sobrepunham em uma região, foi sugerido que as sequências na verdade compunham uma só sequência de um gene homólogo ao gene TbMTH (Fig. 8). Felizmente, foi possível amplificar este fragmento proposto, com aproximadamente 900 pb a partir de DNA genômico de CL Brener. Este gene foi capaz de complementar bactérias *mutT*<sup>-</sup> revertendo seu fenótipo hipermutatório. Isto confirmou a hipótese levantada da existência de um alelo em *T. cruzi* homólogo a MutT de *E. coli* (Furtado & Machado, 2009).

Dando continuidade a caracterização desta provável TcMTH, resolvemos sequenciar o gene em questão e realizar a caracterização *in silico* de sua sequência proteica. O primeiro passo foi a amplificação de TcMTH a partir de DNA genômico de CL Brener com os iniciadores TCMTHXBA-F e TCMTHXHO-R (Figura 17A). Em seguida, o fragmento amplificado e purificado foi ligado ao vetor pGEM-T e usado para transformar bactérias eletrocompetentes DH5 $\alpha$ . Foi realizada uma PCR de colônias para verificar quais clones apresentavam o plasmídeo com o fragmento de interesse (pGEM-TcMTH) (Figura 17B). A partir dos resultados da PCR de colônias foram selecionados 3 clones positivos que foram submetidos à extração do DNA plasmidial.

O cDNA da TcMTH foi sequenciado de ambas as extremidades a partir de iniciadores que se anelam nas extremidades da região clonada no vetor pGEM-T. As várias sequências parciais obtidas pelo sequenciamento foram combinadas para a predição da sequência completa do gene TcMTH. Estas sequências foram analisadas com o auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler v3.2.5 (Heracle Biosoft), que faz a montagem automática do contig, corrige erros e retira



**Figura 17: Amplificação e clonagem de TcMTH.** Imagens de géis de agarose 1 % corados com brometo de etídio, mostrando: (A) fragmento de TcMTH amplificado por PCR a partir de 1 ng de DNA genômico de CL Brener; (B) PCR de colônia de 7 clones de bactérias transformadas com o plasmídeo pGEM-TcMTH. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder. Br: Controle negativo da reação, sem a presença de DNA.

sequências de vetores. A sequência completa do gene TcMTH foi montada utilizando o contig obtido e as sequências já depositadas no TriTrypDB (Tc00.1047053510287.4; Tc00.1047053506581.69).

A figura 18 mostra a sequência de nucleotídeos predita para o gene TcMTH (GenBank KC630985) alinhada com as sequências referidas acima. O alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína TcMTH e seus homólogos mostra o motivo Nudix de 23 resíduos conservado entre essas proteínas, assim como os resíduos que formam o sítio ativo e de interação com o íon  $Mg^{2+}$  (Fig. 19).

#### 4.8. Obtenção de parasitos que superexpressam o gene TcMTH

Em seguida, partimos para o estudo de sua função no próprio parasito. Como a deleção de um gene é um processo muito difícil em *T. cruzi*, resolvemos utilizar o recurso da superexpressão do gene neste parasito, que também nos permite inferir a função de um gene de interesse através do fenótipo observado. Então, a superexpressão foi obtida através da clonagem de TcMTH no vetor pROCK-GFP-NEO (DaRocha *et al.*, 2004), capaz de promover a superexpressão em *T. cruzi* sob a regulação de um promotor para transcrição de RNA ribossômico.

O plasmídeo recombinante pGEM-TcMTH, obtido no item anterior, foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I para a liberação do inserto de interesse (Figura 20A). Após a digestão e purificação do inserto TcMTH, realizou-se a ligação ao vetor pROCK-NEO previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A confirmação da clonagem foi verificada através de PCR de colônias (Figura 20B). Nesta etapa foi selecionado um clone positivo para a extração do plasmídeo recombinante pROCK-TcMTH-NEO que foi, posteriormente, submetido a digestão com as enzimas *Xba* I e *Xho* I para confirmação da clonagem de TcMTH no vetor pROCK (Figura 20C).

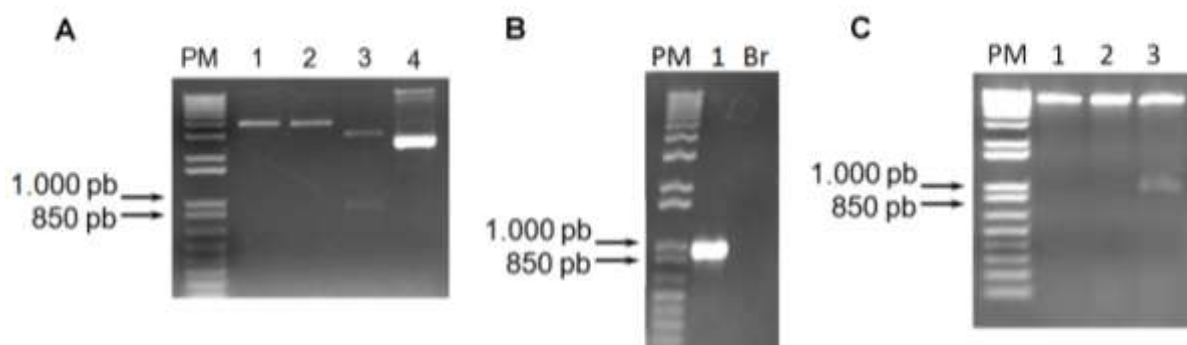
Obtida a confirmação pela digestão, foi realizada a transfecção de parasitos *T. cruzi* CL Brener com o plasmídeo pROCK-TcMTH-NEO. A seleção de parasitos superexpressores seguiu-se por 6 semanas com o uso da droga G418.



TcMTH	1	WAAMTATPHLLPRTTSEVIALVQRALPIRLDELRMNDFHLKDFHLCRCRSHLQHSMPPHSKRESAVLHLSHPVDFTGK
TbMTH	1	WANGQVSVSSLPSTNVSAWVEALQRALHKKVEDLHLDFHFLKLNLSLTCGRFSLHNTPTVGDRESAVLVLSPAAGMPPN
EcMutT	1	WRKLLQIAGGETRN-----
hMTH1	1	WGMSTLTYTLVILVLDQ-----
TcMTH	81	GFQEMCMELTKRTAKLRHRSQMSFPGKVDHGETLAAAARETMEETGIPASSVEVIGTNDIYSFDGSKVEFVAVVA
TbMTH	81	TFQEMCVFLTKRTPHLRHHKGEVSEFGGLDGEQAAAAARETAEETGIDSSVEILGPRRLAPLSGKSHVTDVAVT
EcMutT	14	---ENNETFTTRMADAHMINKLEFPGGRLMGEIPEQAVVRELQEEVGIIP-----
hMTH1	15	---PQRVLLGMRKRGFGACRWNGFGGKVDHGETTEDDARRELOEEGLTVDALHKVLC-----
TcMTH	161	ESAVEPVENSPVEVASTHYMLSRLLLESERTHCRIRKRHSLTGGMPSYFPCFPAEESQAVVGDVCHTKNTPSIPLEDG
TbMTH	161	QYSVTPLEHSPHEVDSIHYLHLSPLLLNSKOTHGRILKYIPSSSGVPLHFPCEFISPSQARYCDPVSISPGLLQLSQEDG
EcMutT	63	-----QHESLFEKLEVEFPDRHITLWFVLES-----
hMTH1	69	-----QVVEFVGEPELVDVHVFTDSIQGTPVES-----DEM
TcMTH	240	QLLNPRIENFPGELVWGLTAFTECELLVRLSAVIELSRSERDAMGLLRSSVVAIDPDCIYKENS
TbMTH	241	CHPELLPNFPGELVWGVTAFTMCELLVRLITALGGSGTALG-----CSPATARDPEHPLGKR--
EcMutT	91	EGEPMGKLGCTGEIWS-----VGLNADLPPAN-----EPVLANLKKL-----
hMTH1	102	RPLVFLQDQIPIKDMPPDDS YWFPLLLQKKKFHG YFKGQD-----TLLDYTLREVDTV---

**Figura 19: A proteína TcMTH e seus ortólogos em outros organismos.**

Alinhamento das seqüências de aminoácidos predita para as proteínas MutT homólogas de *T. cruzi* (TcMTH), *T. brucei* (TbMTH), *E. coli* (EcMutT) e humanos (hMTH1). O retângulo vermelho mostra a região conservada do motivo Nudix. Os asteriscos (\*) indicam os resíduos que compõem o sítio catalítico, e o símbolo # aponta para o local de interação com o cátion metálico.



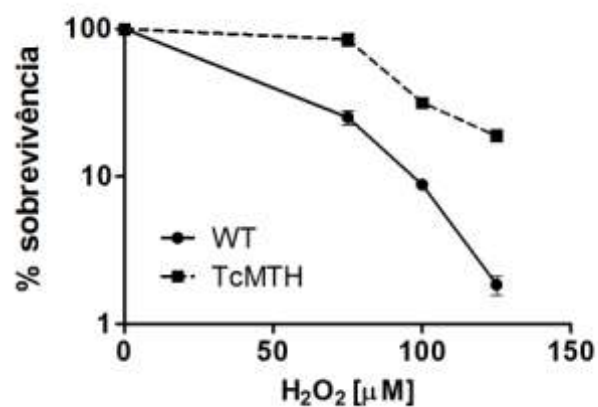
**Figura 20: Clonagem de TcMTH no vetor de expressão pROCK.**

Imagens de géis de agarose 1 % corados com brometo de etídio, mostrando: (A) digestão do vetor pGEM-TcMTH para obtenção do inserto TcMTH (1: pGEM-TcMTH digerido com a enzima *Xba*I. 2: pGEM-TcMTH digerido com a enzima *Xho*I. 3: pGEM-TcMTH digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I. 4: pGEM-TcMTH não digerido); (B) PCR de colônia de 1 clone de bactéria transformada com o plasmídeo pROCK-TcMTH; (C) Digestão do vetor pROCK-TcMTH para confirmação da clonagem (1: pROCK -TcMTH digerido com a enzima *Xba*I. 2: pROCK-TcMTH digerido com a enzima *Xho*I. 3: pROCK-TcMTH digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I). PM: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder. Br: Controle negativo da reação, sem a presença de DNA.



#### **4.9. A superexpressão de TcMTH aumenta a sobrevivência dos parasitos a tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

As células transfectadas e selecionadas por G418 tiveram seu fenótipo testado através de tratamento com estresse oxidativo. Para isso, estes parasitos foram submetidos a tratamento com 0, 75, 100 e 125 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conforme indicado pela figura 21, a superexpressão de TcMTH conferiu à população transfectada uma excepcional resistência ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparada à cultura selvagem. Este resultado sugere que a TcMTH pode ser o homólogo de MutT em *T. cruzi* pois esta foi capaz de atuar melhorando a resistência do parasito ao dano oxidativo causado em seu DNA, assim como ocorreu com a expressão heteróloga de MutT. Além disso, sugere que a citotoxicidade causada pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *T. cruzi* é parcialmente devida a 8-oxoG incorporada no DNA durante a replicação.



**Figura 21:** Curva de sobrevivência em  $H_2O_2$  de *T. cruzi*.

WT e TcMTH foram submetidos a diferentes concentrações de  $H_2O_2$ , crescidos em meio LIT por 3 dias e depois contados. Experimentos foram realizados em triplicatas. Porcentagem de sobrevivência foi medida em relação a células não tratadas.

ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

## 5. Discussão

GCACAAACGTAAGGCAAACACCGTCAATCATTAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTGTTTCCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

Este trabalho teve como foco avaliar a influência do estresse oxidativo e da atividade de 8-oxo-dGTPase na viabilidade celular do parasito *T. cruzi*. Vários estudos demonstraram a importância do combate ao estresse oxidativo e suas consequências para a manutenção da viabilidade celular do parasito durante seu ciclo de vida (Piacenza *et al.*, 2009a, 2012; Gupta *et al.*, 2009a; Ba *et al.*, 2010).

As formas tripomastigotas do *T. cruzi*, durante a penetração em um hospedeiro mamífero, estão susceptíveis ao ataque de macrófagos residentes, células que podem produzir ROS pelo seu sistema de NADPH oxidase (Muñoz-Fernández *et al.*, 1992a; Cardoni *et al.*, 1997). No tecido cardíaco, a invasão de cardiomiócitos por *T. cruzi* pode causar disfunção mitocondrial, o que também provoca a geração de ROS no citoplasma desta célula hospedeira (Gupta *et al.*, 2009a). Além desse ambiente oxidativo encontrado no interior da célula infectada, as amastigotas são confrontadas com ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) produzidas por células do infiltrado inflamatório do sistema imune inato (Machado *et al.*, 2000; Zacks *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2009b). O *T. cruzi* também é exposto a um ambiente oxidativo no interior do hospedeiro invertebrado. Neste, o parasito enfrenta as ROS produzidas pela degradação da hemoglobina (Paes *et al.*, 2001), ou a produção de RNS por mecanismos de defesa do hospedeiro (Whitten *et al.*, 2007).

Considerando todos esses ambientes oxidativos diferentes, com os quais o parasito precisa lidar, espera-se que sejam incorporadas lesões oxidativas no DNA deste organismo, que são uma das consequências do estresse oxidativo. Além disso, pelo fato da lesão 8-oxoG ser a mais abundante dentre as lesões oxidativas, supõe-se que uma enzima com atividade de 8-oxo-dGTPase seja de grande importância para a estabilidade genômica e viabilidade celular do *T. cruzi*.

No início deste estudo um homólogo para a enzima MutT, que seria a enzima responsável pela atividade de 8-oxo-dGTP pirofosfohidrolase, não havia sido encontrado no genoma do *T. cruzi*, mesmo após o seu sequenciamento completo (El-Sayed *et al.*, 2005). A enzima MutT de *E. coli* realiza a hidrólise de 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP no pool de nucleotídeos, prevenindo a incorporação deste nucleotídeo oxidado no DNA (Nakabeppu *et al.*, 2006). O *T. cruzi* apresenta os outros elementos da via de reparo a 8-oxoG, que são as glicosilases TcOGG1 e TcMUTYH (Passos-Silva *et al.*, 2010b; Furtado *et al.*, 2012). A presença de MUTYH na via de reparo do

parasito tornaria a atividade da MutT ainda mais essencial para prevenir mutações, visto que a MUTYH reconhece o par 8-oxoG:A e pode remover uma adenina correta frente a uma 8-oxoG erroneamente incorporada, causando uma mutação de transversão do tipo A:T para C:G (Tsuzuki *et al.*, 2007).

Seguindo esta premissa, criamos uma cepa de parasitos *T. cruzi* que expressa o mRNA de MutT de *E. coli* (MutT) (Figura 10). A cepa MutT mostrou um comportamento similar aos parasitos selvagens (WT) na curva de crescimento das formas epimastigotas em meio LIT (Figura 11A). Este resultado não foi totalmente inesperado visto que, ao contrário do trato digestivo do hospedeiro invertebrado, o meio de cultura não contém fontes de estresse oxidativo, tais como radicais livres provenientes da degradação do grupo heme. Sendo assim, nestas condições, o sistema de reparo a dano oxidativo no DNA intrínseco do parasito pode ser suficiente para permitir um crescimento satisfatório. No entanto, quando realizamos uma curva de sobrevivência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio LIT, a cepa MutT mostrou maior resistência ao tratamento oxidante realizado quando comparada a cepa WT (Figura 11B).

Este tipo de comportamento também foi observado em outras cepas modificadas de *T. cruzi* por nosso grupo de pesquisa. Parasitos que superexpressavam proteínas envolvidas no reparo de DNA de *T. cruzi*, tais como as DNA Polimerases eta, kappa e beta (TcPol $\eta$ , TcPol $\kappa$  e TcPol $\beta$ , respectivamente), além da glicosilase TcOGG1, também apresentavam crescimento igual ao controle em condições controladas de cultivo *in vitro* sem estresse, mas mostravam diferenças marcantes quando submetidas a estresse genotóxico (Moura *et al.*, 2009; Rajão *et al.*, 2009; Schamber-Reis *et al.*, 2012; Furtado *et al.*, 2012).

A análise de danos no DNA por QPCR demonstrou que os parasitos que expressam a MutT bacteriana apresentaram menos lesões no DNA nuclear quando comparados ao controle pROCK (Figura 12). Esse resultado, somado a resistência ao estresse oxidativo observada na curva de sobrevivência, indica que a expressão exógena de MutT permite um melhor controle da incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA do *T. cruzi*. Dessa forma, a cepa MutT estaria prevenindo melhor lesões que poderiam se originar da incorporação da 8-oxoG, o que enfatiza a importância da hidrólise de 8-oxo-dGTP para a viabilidade do parasito.

A relevância da sanitização de nucleotídeos oxidados da célula foi demonstrada também por outros autores em bactérias (Foti *et al.*, 2012). Havia sido demonstrado que muitas classes de antibióticos bactericidas atuam por uma via comum que produz radicais hidroxila e que, depois de submetidas ao antibiótico, bactérias *E. coli* mantêm um nível constante de MutT (Kohanski *et al.*, 2007). Foti e colaboradores (2012) então demonstraram que a superexpressão da DNA polimerase DinB (DNA Pol IV), que realiza síntese translesão, leva a uma maior incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA e, como consequência, maior letalidade das células. Assim como Uchida e colaboradores (2008), eles também sugeriram que essa letalidade provavelmente seria em decorrência da maior formação de quebras de fita dupla no DNA (DSBs). Estas DSBs estariam sendo formadas pelo fato de uma maior incorporação de 8-oxo-dG levar a formação de pares 8-oxoG:C e 8-oxoG:A em grande proximidade. A atuação das enzimas de reparo MutM e MutY nestas lesões muito próximas em fitas opostas pode potencialmente levar a DSBs letais para a célula. Além disso, a participação da 8-oxoG na letalidade causada pelos antibióticos foi demonstrada pela superexpressão de MutT em *E. coli* e da deleção de DNA polimerases que incorporam nucleotídeos oxidados. Ambos os casos resultaram em aumento da resistência das bactérias ao antibiótico, reforçando a necessidade de sanitização de 8-oxodGTP da célula para impedir sua incorporação no DNA (Foti *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou recentemente em *T. cruzi* que a atuação da glicosilase OGG1 (homóloga a MutM de bactérias) em excesso pode levar a morte da célula (Furtado *et al.*, 2012). Assim como Foti e colaboradores (2012) que mostraram que o reparo de lesões 8-oxoG em grande proximidade na fita de DNA pode ser letal para *E. coli*, a superexpressão da 8-oxoGuanina DNA Glicosilase (TcOGG1) em *T. cruzi* tornou este parasito mais sensível ao tratamento por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente pela geração de sítios AP que não puderam ser processados pelo parasito (Furtado *et al.*, 2012).

O número de lesões observado no DNA mitocondrial dos parasitos MutT não foi considerado significativamente menor do que o controle pROCK (Figura 12). Em experimentos de QPCR para análise de dano no DNA após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nosso grupo observou que os níveis de danos encontrados no DNA mitocondrial são consideravelmente menores do que os níveis encontrados no DNA nuclear (Furtado

*et al.*, 2012). No entanto, essas lesões no DNA mitocondrial persistem por mais tempo e aumentam após 10 horas de tratamento. Acreditamos que este comportamento seja provavelmente em decorrência da perda de função mitocondrial causada pelo tratamento oxidativo como foi observado anteriormente em humanos (Santos *et al.*, 2003).

O contraste entre o maior número de lesões encontradas no núcleo, e a menor quantidade de danos encontrados na mitocôndria pode ser explicado pelo fato do núcleo não apresentar nenhuma enzima responsável pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. A mitocôndria por sua vez apresenta peroxiredoxinas e superóxido dismutases que podem neutralizar íons superóxidos, óxido nítrico,  $H_2O_2$  e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), prevenindo assim algumas lesões oxidativas no kDNA (Piacenza *et al.*, 2009a).

Como o número de lesões no DNA mitocondrial das cepas pROCK e MutT não apresentou diferença significativa (Figura 12), acreditamos que o controle de nucleotídeos oxidados no pool pela enzima MutT seja mais relevante para a manutenção da integridade do DNA nuclear do que para o DNA mitocondrial. A importância do kDNA para a replicação do parasito é evidenciada pelo fato deste ser replicado antes do DNA nuclear, se esta não for bem sucedida o ciclo celular não pode prosseguir com a mitose (Woodward & Gull, 1990; Jensen *et al.*, 2012). Por este motivo, o reparo do DNA mitocondrial pode ser mais eficiente do que o reparo nuclear. De fato os tripanosomatídeos apresentam um número maior de enzimas de reparo com localização mitocondrial do que os mamíferos (revisto por Passos-Silva *et al.*, 2010b).

A infectividade dos parasitos que expressam MutT foi comparada com as cepas controle (WT e pROCK) em fibroblastos murinos. Nossos resultados mostram que as três cepas testadas apresentaram comportamento semelhante para invasão, sendo que o número de tripomastigotas intracelulares observadas após 30 min de infecção foi muito próximo entre as cepas (Figura 13A). Além disso, a cinética de escape do vacúolo parasitóforo também foi igual para as três cepas (Figura 13B). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que nas primeiras 24 horas de infecção os parasitos ainda se encontram na forma não replicativa tripomastigota ou estão em processo de transformação na forma amastigota. O alvo para a enzima

MutT, 8-oxo-dGTP, não seria incorporado no DNA até o parasito se diferenciar em uma forma replicativa e ocorrer síntese de nova molécula de DNA. Sendo assim, o efeito da expressão heteróloga de MutT em *T. cruzi* não pôde ser evidenciado como um fenótipo aparente na forma tripomastigota.

O passo de invasão da célula hospedeira no ciclo do parasito envolve a interação entre moléculas da membrana do parasito e do hospedeiro, assim como a ativação de vias de transdução de sinal em ambos os organismos (revisado por Alves & Mortara, 2009). Esta interação entre o parasito e a célula hospedeira, promove a ativação de vias de liberação de cálcio na célula que iniciam o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito (Andrade *et al.*, 2005; Epting *et al.*, 2010). Estes lisossomos forneceriam a membrana para a formação do vacúolo parasitóforo, compartimento em que a tripomastigota permanece nas primeiras horas de infecção. O escape do vacúolo pela tripomastigota tem a participação de enzimas trans-sialidase/neuraminidases que removem ácido siálico da membrana, tornando-a vulnerável a ação do peptídeo Tc-Tox. Este peptídeo aparentemente promove fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo pela formação de poros (revisado por De Souza *et al.*, 2010). Geralmente, a tripomastigota se diferencia na forma replicativa amastigota após atingir o citoplasma da célula hospedeira (2-8 horas de infecção), mas a amastigota passa por um período de quiescência antes de retomar o ciclo celular, e só inicia a replicação com aproximadamente 48 horas (Alves & Colli, 2007). Portanto, durante todo este período, não há replicação do DNA, tampouco poderia haver incorporação de nucleotídeos 8-oxo-dGTP com potencial mutagênico.

No entanto, após a diferenciação dos parasitos na forma amastigota e o início da multiplicação, os parasitos MutT mostraram taxas de replicação mais rápidas quando comparados às cepas controle (Figura 13C). Esta diferença foi evidente após 48 horas de infecção, quando os parasitos já iniciaram a multiplicação intracelular, e tornou-se ainda maior com 72 e 96 horas de infecção. Parasitos MutT na forma replicativa amastigota mostraram então um comportamento diferente da forma replicativa epimastigota pois apresetaram crescimento maior do que os controles. Acreditamos que essa diferença observada no crescimento se deva ao fato do ambiente intracelular, mesmo que *in vitro*, apresentar mais ROS do que o meio LIT em que as epimastigotas foram cultivadas.



Esta hipótese pode ser confirmada pelos achados de Gupta e colaboradores (2009a), que evidenciaram um aumento exponencial na produção de ROS em células infectadas por *T. cruzi* até 48 horas pós-infecção. Os resultados destes pesquisadores mostram que a elevação do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provocada pela interação do parasito com a célula hospedeira desencadeiam não somente a internalização da tripomastigota, mas também alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Estas alterações provocariam o comprometimento da atividade dos complexos respiratórios, levando a vazamento de elétrons e produção de superóxidos. A oxidação da membrana mitocondrial ocasionada por estes compostos seria um segundo estímulo para afetar a eficiência da cadeia respiratória. Posteriormente, foi demonstrado também que as ROS produzidas na mitocôndria através desse processo atingem o citoplasma e causam danos aos componentes da célula hospedeira, como a formação de lesões oxidativas 8-oxoG no DNA, estes danos provavelmente se estendem ao *T. cruzi* (Ba *et al.*, 2010). Apesar deste processo não ser uma resposta da célula em defesa a infecção pelo parasito, foi evidenciado também que citocinas pró-inflamatórias aumentam a produção de ROS nestas células (Gupta *et al.*, 2009a). Sendo assim, podemos afirmar que todo o processo de replicação intracelular do *T. cruzi* é acompanhado de liberação de ROS pela célula. Isto poderia justificar o melhor desempenho da cepa MutT neste processo, considerando que estes parasitos mostraram maior resistência a estresse oxidativo em curvas de sobrevivência a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Com o intuito de demonstrar que a replicação diferencial observada para os parasitos MutT está mesmo relacionada a maior resistência ao estresse oxidativo, submetemos estes parasitos a outro experimento de infecção *in vitro*. Neste segundo experimento, a cepa MutT e seus controles passaram por um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio antes da infecção. Os resultados obtidos neste experimento mostraram que o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi indiferente para a infectividade dos parasitos, pois o número de células infectadas no grupo tratado foi similar ao grupo não tratado (Figura 14A). Novamente a MutT na forma tripomastigota não apresentou nenhum fenótipo diferente dos controles, mesmo após ser submetida a estresse oxidativo. Porém, ao analisar a curva de crescimento intracelular dos parasitos tratados com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pode-se notar que após 96 horas de infecção o crescimento do grupo de parasitos tratados foi ligeiramente maior do que

o crescimento do grupo não tratado. Notou-se também que a cepa MutT tratada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destacou-se ainda mais em relação as outras pois apresentou crescimento maior do que a própria cepa MutT não tratada (Figura 14B). Este comportamento da MutT indica que esta cepa apresentou uma melhor recuperação nos danos causados ao DNA pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.

O aumento no crescimento dos parasitos do grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no experimento de infecção é uma reação ao estresse oxidativo que já foi observada anteriormente em outros trabalhos. Finzi e colaboradores (2004) observaram que o tratamento de formas epimastigotas de *T. cruzi* com baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5-30 µM) estimulou a proliferação celular destes parasitos. Além disso, foi visto que um pré-tratamento com dose não letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µM) tornou estes parasitos mais resistentes a um tratamento posterior com doses maiores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes autores demonstraram que este comportamento do *T. cruzi* deveu-se a uma resposta adaptativa do parasito às condições de estresse oxidativo. Aparentemente, o parasito aumenta a expressão de enzimas da via antioxidante, como a peroxidase TcCPX, que lhe permitem responder melhor ao tratamento oxidante.

Em outro trabalho do mesmo grupo, foi observado que formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* quando tratadas com concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também modulam a expressão das peroxidases MPX e CPX de maneira dependente da concentração (Gadelha *et al.*, 2013). A expressão da enzima TcCPX apresentou um aumento após tratamento com 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mas diminuiu nas concentrações maiores (20-50 µM). Esta redução foi acompanhada por um aumento concomitante da concentração extracelular da enzima, sugerindo que o parasito aumenta a expressão da mesma, mas secreta a enzima para o meio extracelular. A enzima mitocondrial (TcMPX) por sua vez, mostrou concentrações intracelulares mais elevadas do que a citosólica (TcCPX) mas não foi detectada no sobrenadante. Adicionalmente, eles demonstraram que a expressão dessas enzimas antioxidantes é maior na forma tripomastigota do parasito do que na forma epimastigota (Gadelha *et al.*, 2013). Nogueira e colaboradores (2011) demonstraram recentemente que baixos níveis de ROS produzidos por heme em epimastigotas de *T. cruzi* favorecem a proliferação deste parasito através de uma via similar a Ca<sup>2+</sup> calmodulina kinase II (CaMKII). Adicionalmente, foi visto que atividade antioxidante de urato e GSH inibiu a produção de ROS pelo heme e, conseqüentemente, a proliferação do parasito.

Respostas adaptativas a condições de estresse oxidativo também foram descritas em bactérias (Demple & Halbrook, 1983), leveduras (Davies *et al.*, 1995) e células de mamíferos (Wiese *et al.*, 1995). Mas a enorme diferença observada no crescimento intracelular dos parasitos que expressam MutT sugere que, além da vantagem demonstrada no reparo do dano oxidativo no DNA, existe alguma modulação diferencial na via antioxidante destes parasitos.

A fim de esclarecer esta questão, analisamos a expressão das enzimas antioxidantes das cepas de *T. cruzi* usadas neste trabalho através de experimentos de western blotting. Nossos resultados mostraram que após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os parasitos da cepa MutT apresentaram níveis das enzimas peroxidases TcCPX e TcMPX muito maiores do que as células não tratadas e do que o controle pROCK tratado (Figura 15). Este resultado salienta que a expressão heteróloga da MutT de *E. coli* pode influenciar na expressão de enzimas da via antioxidante de *T. cruzi*.

A importância das peroxidases para a virulência do parasito já foi evidenciada por outros autores (Piñeyro *et al.*, 2008, 2011; Piacenza *et al.*, 2008, 2012). Piacenza e colaboradores (2008) mostraram que parasitos que superexpressam TcCPX, TcMPX ou TcAPX são mais resistentes ao estresse oxidativo. Já Piñeyro e colaboradores (2008) observaram que parasitos que superexpressavam peroxiredoxinas apresentaram maior infectividade em relação aos controles. Além disso, existe um aumento na expressão destas enzimas durante o processo de metaciclologênese do parasito, provavelmente uma pré-adaptação para enfrentar o ambiente oxidativo encontrado no hospedeiro vertebrado (Piacenza *et al.*, 2009b). Neste experimento em questão, são estas enzimas que lidam diretamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao que os parasitos foram submetidos. Dessa forma, o aumento da expressão das peroxidases na cepa MutT após o tratamento poderia explicar a resposta do parasito ao tratamento no experimento de infecção em fibroblastos, no qual os parasitos MutT tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraram crescimento maior do que os parasitos MutT que não sofreram tratamento (Figura 14B).

Nossa hipótese para o comportamento diferencial da cepa MutT é que a formação do produto da degradação da 8-oxo-dGTP, a 8-oxo-dGMP, poderia servir como um sinal para uma resposta adaptativa do parasito ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo infligido pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levaria a formação de 8-oxo-

dGTP em excesso, este nucleotídeo seria então hidrolisado pela MutT heteróloga. O produto desta reação, 8-oxo-dGMP, ou outro metabólito secundário deste processo, poderia atuar como um segundo mensageiro para a célula, indicando a presença de estresse oxidativo e tornando o parasito mais apto para agir em resposta a isso.

A participação da 8-oxoG e componentes da sua via de reparo também foi observada em outras vias de sinalização ou transdução de sinal de células humanas (Boldogh *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a base 8-oxoG retirada do DNA pela glicosilase OGG1 liga-se de novo a enzima em um sítio diferente do substrato, mas com alta afinidade. A OGG1 ligada a base oxidada interage com a proteína GTPase Ras. Esta interação catalisa a troca do nucleotídeo GDP ligado a Ras por um GTP, ativando a proteína GTPase para atuar em sua via de transdução de sinal que aumenta a expressão de genes de resposta a estresse. A OGG1 neste caso, além de seu papel na proteção do DNA ao dano oxidativo, atua como um fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF, do inglês *Guanine nucleotide Exchange Factor*) e participa na sinalização que modula a expressão de enzimas que previnem a incorporação de 8-oxoG no DNA, como a MTH1 (Boldogh *et al.*, 2012).

Em seguida, voltamos a analisar a infectividade dos parasitos, porém em experimentos de infecção *in vivo*. Foram infectados dois grupos de cinco camundongos suíços cada com parasitos da cepa selvagem ou da cepa modificada MutT, e a parasitemia destes animais foi avaliada por até 28 dias. Os resultados dos experimentos de infecção *in vivo* confirmaram os dados obtidos em infecção em cultura, mostrando que os parasitos MutT também replicam mais rapidamente em modelos animais (Figura 16). Os experimentos de infecção *in vitro* mostraram que a expressão heteróloga de MutT favorece o crescimento pronunciado das amastigotas dentro da célula hospedeira. Esta maior replicação intracelular observada em cultura poderia ter sido refletida na liberação substancial de tripomastigotas na corrente sanguínea dos animais infectados, como demonstrado pela parasitemia mais alta encontrada nos camundongos infectados por MutT.

Piacenza e colaboradores (2009b) demonstraram que cepas de *T. cruzi* de linhagens diferentes apresentavam diferentes graus de virulência, que seria refletido na parasitemia desenvolvida em animais infectados. Estes autores observaram que há uma correlação direta entre o nível de expressão das enzimas antioxidantes

TcCPX, TcMPX e TcTS (trypanothiona sintetase) e a parasitemia desenvolvida nos camundongos infectados com os diferentes isolados. Considerando as modificações observadas na expressão de proteínas antioxidantes dos parasitos MutT submetidos ao tratamento oxidante, podemos sugerir que durante a infecção em animais o choque oxidativo encontrado no início da infecção poderia servir para modular a expressão destas enzimas da mesma forma. Sendo assim, a parasitemia mais alta observada nos camundongos infectados pela cepa MutT seria um resultado do melhor reparo no dano oxidativo no DNA e também da resposta adaptativa das enzimas antioxidantes.

De modo geral, as evidências apresentadas sugerem que a expressão heteróloga da MutT de *E. coli* em *T. cruzi* permite que os parasitos lidem de maneira mais eficiente com nucleotídeos oxidados em ambas as formas amastigotas e epimastigotas. No entanto, estes resultados não negam a possibilidade de uma atividade *MutT-like* em *T. cruzi*. De fato, estudos anteriores mostram que apesar da ação de várias enzimas e vias metabólicas no controle dos efeitos do estresse oxidativo, as defesas celulares podem ser insuficientes em situações de estresse intenso, como em um tratamento com peróxido de hidrogênio (Rai *et al.*, 2009). Porém, estas defesas podem ser amplificadas pela expressão de um ou mais destes elementos em níveis maiores. Assim, a maior eficiência de resposta ao estresse oxidativo apresentada pelos parasitos recombinantes pode ser uma consequência de níveis altos de expressão heteróloga de MutT em células que seriam desprovidas de atividade 8-oxo-dGTPase ou, células que apresentam baixos níveis desta atividade, mas suficientes na ausência de estresse oxidativo.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa descobriu um candidato a homólogo de MutT em *T. cruzi*, que não foi anotado no projeto genoma do parasito (El-Sayed *et al.*, 2005). Esta possível TcMTH ainda não foi totalmente caracterizada, mas foi observado que este gene é capaz de complementar bactérias deficientes de *mutT*, diminuindo sua frequência de mutação (Fig. 9).

Neste trabalho realizamos a caracterização *in silico* da sequência da TcMTH. O gene foi sequenciado e o contig obtido no sequenciamento sugere que ocorreu um possível erro de montagem e anotação no banco de dados. As sequências Tc00.1047053510287.4 e Tc00.1047053506581.69 depositadas no TriTrypDB e

anotadas como “possível Nudix hidrolase, incompleta” e “possível Nudix hidrolase, pseudogene”, respectivamente, aparentemente compõem a porção inicial e a porção média e final de um único gene, o gene TcMTH como mostra o alinhamento na Figura 18. A análise da sequência de aminoácidos da TcMTH mostrou que ela tem homologia com as sequências de MutT de *E. coli*, da MTH humana e de *T. brucei*. Foi possível ainda identificar o motivo *Nudix box*, uma curta sequência de 23 aminoácidos muito conservada na superfamília das proteínas Nudix hidrolases. Esta análise também apontou os aminoácidos que compõem o sítio catalítico da enzima, bem como o sítio de interação com o cátion metálico bivalente (Figura 19).

A presença destes elementos é um forte indício para atribuir esta sequência a uma enzima da superfamília Nudix hidrolase (Mildvan *et al.*, 2005). Porém, esta superfamília é composta por uma enorme variedade de enzimas com grande versatilidade catalítica ilustrada pela diversidade de substratos que caracterizam cada subfamília. No entanto, como o candidato a homólogo de MutT de *T. cruzi* foi capaz de complementar bactérias deficientes para esta enzima de *E. coli*, diminuindo sua frequência de mutação (Figura 9), acreditamos que este gene é realmente um representante da subfamília MutT pirofosfohidrolase.

Após a caracterização *in silico* do gene, decidimos estudar a influência da TcMTH em *T. cruzi*. Para isso, clonamos o gene em questão em vetor de expressão para *T. cruzi* (pROCK-NEO-GFP, DaRocha *et al.*, 2004) e selecionamos formas epimastigotas superexpressoras de TcMTH. Em seguida, o fenótipo dos parasitos superexpressores foi comparado aos parasitos do tipo selvagem em ensaios de sobrevivência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A curva de sobrevivência destes parasitos mostrou que, assim como os parasitos que expressam a MutT de *E. coli*, os superexpressores de TcMTH foram mais resistentes ao tratamento oxidativo a que foram submetidos (Figura 21). O resultado obtido sugere que os parasitos recombinantes recuperaram-se melhor do estresse oxidativo por apresentar um reparo mais eficiente para dano oxidativo no seu DNA. Este comportamento também sugere que o gene que está sendo caracterizado trata-se de um homólogo da MutT, pois a sua superexpressão em parasitos *T. cruzi* alcançou o mesmo efeito que a expressão heteróloga da MutT de *E. coli*.

Podemos assumir, portanto, que o *T. cruzi* é provido de uma atividade 8-oxo-dGTP pirofosfohidrolase, apesar de estudos mais específicos acerca da função da proteína serem necessários. Com isto em mente, especulamos que esta atividade, ou até mesmo o nível de expressão desta proteína seja baixo, tendo em vista a sensibilidade dos parasitos tipo selvagem ao tratamento oxidativo.

A persistência de nucleotídeos oxidados no pool de nucleotídeos como consequência desta baixa atividade poderia aumentar a frequência de 8-oxoG no DNA. Isto poderia ser compensado modulando a atividade de outras enzimas associadas na via de reparo a 8-oxoG, como a TcOGG1, ou outras glicosilases alternativas. Um outro exemplo seria a enzima Nei glicosilase, que foi reportada agindo em lesões oxidativas (incluindo 8-oxoG) durante a transcrição e/ou replicação (Hazra *et al.*, 2007). O genoma do *T. cruzi* apresenta uma sequência (Tc00.1047053506357.80) de uma NEIL glicosilase hipotética, ainda não caracterizada, que poderia compensar a baixa atividade de MutT 8-oxopirofosfohidrolase no parasito.

O MMR também foi descrito como uma via de reparo que pode participar no controle da incorporação de 8-oxoG no DNA (revisado por Russo *et al.*, 2007). Esta via poderia evitar que pares 8-oxoG:A formados após a replicação pela incorporação de 8-oxoG frente a adenina fossem reparados pela enzima MUTYH. A glicosilase MUTYH retiraria a adenina frente a 8-oxoG, fixando a mutação de T:A para G:C (Vidmar & Cupples, 1993). O MMR permite identificar mal-pareamentos pós-replicação e consegue discriminar a base errada recém incorporada, evitando este problema (Hsieh & Yamane, 2008). Acredita-se que elementos desta via tenham envolvimento no reparo a lesões 8-oxoG em *T. cruzi* pois foi demonstrado que parasitos deficientes para a proteína MSH2 são mais sensíveis ao estresse oxidativo e acumulam 8-oxoG no kDNA após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Campos *et al.*, 2011).

Uma outra alternativa para o *T. cruzi* contornar os efeitos da baixa atividade de 8-oxo-dGTPase e da incorporação de 8-oxoG no DNA seriam os mecanismos de síntese translesão. Estes processos permitem que o parasito não interrompa a replicação de seu DNA quando uma lesão como a 8-oxoG é encontrada, realizando a passagem por esta lesão de maneira propensa ou não a erros. Isto pode ser mais vantajoso para o organismo, mesmo sujeito ao surgimento de mutações, pois uma

parada na replicação pode resultar na morte da célula. A DNA polimerase nuclear TcPol $\eta$  e a DNA polimerase TcPol $\kappa$  mitocondrial tiveram suas funções caracterizadas em nosso laboratório e foi demonstrado que são capazes de ultrapassar 8-oxoG de maneira livre de erro. Além disso, parasitos que superexpressam TcPol $\eta$  ou TcPol $\kappa$  apresentaram maior resistência ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moura *et al.*, 2009; Rajão *et al.*, 2009).

Mesmo com todas estas alternativas para contornar os efeitos deletérios dos danos oxidativos no DNA, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a atividade de MutT 8-oxo-dGTP pirofosfohidrolase pode ser crucial para garantir a eficiência da replicação do parasito. Em suma, nós demonstramos que modificar os níveis de expressão de um elemento do sistema de reparo a 8-oxoG pode influenciar a viabilidade celular do parasito em ambas as formas replicativas do parasito. Demonstramos também que as vias antioxidantes e de reparo de DNA a dano oxidativo podem estar intimamente ligadas, pois a expressão de enzima de reparo a base oxidada modificou a expressão de enzimas antioxidantes do parasito. O aprofundamento no estudo destas vias pode revelar possíveis variações e especializações no sistema de reparo de DNA e resposta a danos oxidativos desta espécie, que pode indicar um caminho para o desenvolvimento de drogas contra a doença de Chagas.



ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

## 6. Conclusões e Perspectivas

GCTCACAAAACGTACGGCAAAC TCCGTCATCATAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTTGTTTCCTATGCTGCGGGAAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

## Conclusões

- A expressão heteróloga de MutT torna epimastigotas mais resistentes ao estresse oxidativo e diminui lesões no DNA nuclear.
- Além disso, a presença da MutT de *E. coli* causou um aumento na expressão de enzimas antioxidantes nesta forma do parasito.
- A cepa de *T. cruzi* que superexpressa a enzima MutT replica mais rápido na célula hospedeira do que a selvagem e o controle transformado com o vetor vazio.
- Esta replicação mais rápida não é causada por um escape diferencial do vacúolo parasitóforo.
- Melhor fitness para combater o estresse oxidativo pode ser a causa para maior crescimento da cepa MutT sendo que a mesma demonstrou recuperação mais rápida após o tratamento com água oxigenada, e foi visto que epimastigotas superexpressoras de MutT apresentaram maior expressão de enzimas antioxidantes.
- Mesmo comportamento foi observado em infecção *in vivo*.
- O *T. cruzi* apresenta um gene possível homólogo funcional de MutT.
- Superexpressão da TcMTH também conferiu maior resistência ao estresse oxidativo aos parasitos.

## Perspectivas

- Realizar experimentos de infecção no hospedeiro invertebrado através de alimentação artificial e em camundongos infectados com as cepas modificadas criadas neste trabalho.
- Avaliar o desenvolvimento dos parasitos recombinantes no intestino do barbeiro e a recuperação de parasitos nas fezes do mesmo.

ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

## 7. Bibliografia

GCTCCACAAAACGTAACGGCAAACCTCCGTCATCATAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATACACCAGTCAATTCCAGAGGACGG  
TGGGTGTTTCCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTGCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA

- Aft R.L. & Mueller G.C. (1983) Hemin-mediated DNA strand scission. **J Biol Chem** 258: 12069–72.
- Akiyama M., Horiuchi T. & Sekiguchi M. (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the mutT mutator of Escherichia coli that causes A:T to C:G transversion. **Mol Gen Genet** 206: 9–16.
- Alves M.J.M. & Colli W. (2007) Trypanosoma cruzi: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life** 59: 274–9.
- Alves M.J.M. & Mortara R.A. (2009) A century of research: what have we learned about the interaction of Trypanosoma cruzi with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104 Suppl: 76–88.
- Andrade L.O. & Andrews N.W. (2004) Lysosomal fusion is essential for the retention of Trypanosoma cruzi inside host cells. **J Exp Med** 200: 1135–43.
- Andrade L.O. & Andrews N.W. (2005) The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol** 3: 819–23.
- Andrews N.W. (1994) From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of Trypanosoma cruzi. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]** 27: 471–5.
- Andrews N.W., Abrams C.K., Slatin S.L. & Griffiths G. (1990) A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell** 61: 1277–87.
- Apt W. (2010) Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Des Devel Ther** 4: 243–53.
- Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B.P., Carrington M., *et al.* (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res** 38: D457–62.
- Ba X., Gupta S., Davidson M. & Garg N.J. (2010) Trypanosoma cruzi induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. **J Biol Chem** 285: 11596–606.
- Barnes D.E. & Lindahl T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet** 38: 445–76.
- Baute J. & Depicker A. (2008) Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 43: 239–76.
- Bern C., Montgomery S.P., Herwaldt B.L., Rassi A., Marin-Neto J.A., Dantas R.O., *et al.* (2007) Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA** 298: 2171–81.

- Bessman M.J., Frick D.N. & O'Handley S.F. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. **J Biol Chem** 271: 25059–62.
- Betteridge D.J. (2000) What is oxidative stress? **Metabolism** 49: 3–8.
- Bogdan C. & Röllinghoff M. (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology today (Personal ed.)** 15: 22–8.
- Boiteux S., Gellon L. & Guibourt N. (2002) Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. **Free Radic Biol Med** 32: 1244–53.
- Boiteux S., O'Connor T.R. & Laval J. (1987) Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. **EMBO J** 6: 3177–83.
- Boldogh I., Hajas G., Aguilera-Aguirre L., Hegde M.L., Radak Z., Bacsi A., *et al.* (2012) Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. **J Biol Chem** 287: 20769–73.
- Brener Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol** 27: 347–382.
- Brener Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 4: 389–96.
- Burleigh B. a (2005) Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Sci STKE** 2005: pe36.
- Cadenas E. & Davies K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med** 29: 222–30.
- Caler E. V, Vaena de Avalos S., Haynes P.A., Andrews N.W. & Burleigh B.A. (1998) Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J** 17: 4975–86.
- Campos P.C., Silva V.G., Furtado C., Machado-Silva A., Darocha W.D., Peloso E.D.F., *et al.* (2011) *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Mol Biochem Parasitol** 176: 8–16.
- Caradonna K.L. & Burleigh B.A. (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol** 76: 33–61.
- Cardoni R.L., Antunez M.I., Morales C. & Nantes I.R. (1997) Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg** 56: 329–34.

- Chagas C. (1909) Nova tripanozomíaze humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1: 159–218.
- Colussi C., Parlanti E., Degan P., Aquilina G., Barnes D., Macpherson P., *et al.* (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. **Curr Biol** 12: 912–8.
- Córdoba-Cañero D., Morales-Ruiz T., Roldán-Arjona T. & Ariza R.R. (2009) Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. **Plant J** 60: 716–28.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res** 16: 10881–90.
- Coura J.R. & De Castro S.L. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97: 3–24.
- Coura J.R. & Dias J.C.P. (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104 Suppl: 31–40.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. & Poirier G.G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem J** 342: 249–68.
- DaRocha W.D., Silva R.A., Bartholomeu D.C., Pires S.F., Freitas J.M., Macedo A.M., *et al.* (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res** 92: 113–20.
- David S.S., O'Shea V.L. & Kundu S. (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature** 447: 941–50.
- Davies J.M., Lowry C. V & Davies K.J. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Arch Biochem Biophys** 317: 1–6.
- Demple B. & Halbrook J. (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. **Nature** 304: 466–8.
- Dizdaroglu M. (1991) Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic Biol Med** 10: 225–42.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A.-N., *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309: 409–15.
- Epting C.L., Coates B.M. & Engman D.M. (2010) Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol** 126: 283–91.
- Fárez-Vidal M.E., Gallego C., Ruiz-Pérez L.M. & González-Pacanowska D. (2001) Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. **Nucleic Acids Res** 29: 1549–55.

- Fernandes M.C. & Andrews N.W. (2012) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev** 36: 734–47.
- Fernandes M.C., Cortez M., Flannery A.R., Tam C., Mortara R. a & Andrews N.W. (2011) *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **J Exp Med** 208: 909–21.
- Figueiredo R.C., Rosa D.S. & Soares M.J. (2000) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J Parasitol** 86: 1213–8.
- Finkel T. & Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 408: 239–47.
- Finzi J.K., Chiavegatto C.W.M., Corat K.F., Lopez J.A., Cabrera O.G., Mielniczki-Pereira A.A., *et al.* (2004) *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol Biochem Parasitol** 133: 37–43.
- Flohé L. (2012) The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnol Adv** 30: 294–301.
- Foti J.J., Devadoss B., Winkler J. a., Collins J.J. & Walker G.C. (2012) Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. **Science** 336: 315–319.
- Fowler R.G. & Schaaper R.M. (1997) The role of the mutT gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. **FEMS Microbiol Rev** 21: 43–54.
- Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., *et al.* (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. **J Biol Chem** 271: 9573–8.
- Furtado C., Kunrath-Lima M., Rajão M.A., Mendes I.C., De Moura M.B., Campos P.C., *et al.* (2012) Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE** 7: e42484.
- Furtado C. & Machado C.R. (2009) *Reparo de DNA em dois patógenos humanos: caracterização do gene IMP4 de Schistosoma mansoni e estudos acerca do MMR, sistema GO e taxa de mutação em Trypanosoma cruzi.* ICB - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gadelha F.R., Gonçalves C.C., Mattos E.C., Alves M.J.M., Piñeyro M.D., Robello C., *et al.* (2013) Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. **Exp Parasitol** 133: 287–293.
- Garcia E.S., Genta F.A., De Azambuja P. & Schaub G.A. (2010) Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol** 26: 499–505.

- Gary R., Kim K., Cornelius H.L., Park M.S. & Matsumoto Y. (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. **J Biol Chem** 274: 4354–63.
- Graça-Souza A. V, Maya-Monteiro C., Paiva-Silva G.O., Braz G.R.C., Paes M.C., Sorgine M.H.F., *et al.* (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochem Mol Biol** 36: 322–35.
- Gupta S., Bhatia V., Wen J., Wu Y., Huang M.-H. & Garg N.J. (2009a) Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free Radic Biol Med** 47: 1414–21.
- Gupta S., Wen J.-J. & Garg N.J. (2009b) Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdiscip Perspect Infect Dis** 2009: 190354.
- Gutteridge J.M. & Smith a (1988) Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. **Biochem J** 256: 861–5.
- Hartree E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem** 48: 422–7.
- Hazra T.K., Das A., Das S., Choudhury S., Kow Y.W. & Roy R. (2007) Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. **DNA Repair** 6: 470–80.
- Hoeijmakers J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** 411: 366–74.
- Hsieh P. & Yamane K. (2008) DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev** 129: 391–407.
- Hsu G.W., Ober M., Carell T. & Beese L.S. (2004) Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. **Nature** 431: 217–21.
- Irigoin F., Cibils L., Comini M.A., Wilkinson S.R., Flohé L. & Radi R. (2008) Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med** 45: 733–42.
- Izumi T., Hazra T.K., Boldogh I., Tomkinson A.E., Park M.S., Ikeda S., *et al.* (2000) Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. **Carcinogenesis** 21: 1329–34.
- Jensen R.E. & Englund P.T. (2012) Network news: the replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol** 66: 473–91.
- Van der Kemp P.A., Thomas D., Barbey R., De Oliveira R. & Boiteux S. (1996) Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-



- oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93: 5197–202.
- Kierszenbaum F., Knecht E., Budzko D.B. & Pizzimenti M.C. (1974) Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology** 112: 1839–44.
- Kim K., Biade S. & Matsumoto Y. (1998) Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. **J Biol Chem** 273: 8842–8.
- Klaunig J.E. & Kamendulis L.M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 44: 239–67.
- Klungland A. & Lindahl T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). **EMBO J** 16: 3341–8.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A. & Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell** 130: 797–810.
- Kollien A.H. & Schaub G.A. (2000) The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today** 16: 381–7.
- Koonin E. V. (1993) A highly conserved sequence motif defining the family of MutT-related proteins from eubacteria, eukaryotes and viruses. **Nucleic Acids Research** 21: 4847–4847.
- Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E. & Lindahl T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. **EMBO J** 15: 6662–70.
- Lindahl T. & Wood R.D. (1999) Quality control by DNA repair. **Science** 286: 1897–905.
- Van Loon B., Markkanen E. & Hübscher U. (2010) Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair** 9: 604–16.
- Lopes D.D.O., Schamber-Reis B.L.F., Regis-da-Silva C.G., Rajão M.A., Darocha W.D., Macedo A.M., *et al.* (2008) Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA Repair** 7: 1882–92.
- Machado F.S., Martins G. a, Aliberti J.C., Mestriner F.L., Cunha F.Q. & Silva J.S. (2000) *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation** 102: 3003–8.

- Machado-Silva A., Teixeira S.M.R., Franco G.R., Macedo A.M., Pena S.D.J., McCulloch R., *et al.* (2008) Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. **Gene** 411: 19–26.
- Maki H. & Sekiguchi M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature** 355: 273–5.
- Matsumoto Y. & Kim K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. **Science** 269: 699–702.
- Maya J.D., Orellana M., Ferreira J., Kemmerling U., López-Muñoz R. & Morello A. (2010) Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biol Res** 43: 323–31.
- Maynard S., Schurman S.H., Harboe C., De Souza-Pinto N.C. & Bohr V. a (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis** 30: 2–10.
- McNeil P.L. & Kirchhausen T. (2005) An emergency response team for membrane repair. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 499–505.
- Michaels M.L. & Miller J.H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **J Bacteriol** 174: 6321–5.
- Michaels M.L., Pham L., Nghiem Y., Cruz C. & Miller J.H. (1990) MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. **Nucleic Acids Res** 18: 3841–5.
- Mildvan a S., Xia Z., Azurmendi H.F., Saraswat V., Legler P.M., Massiah M. a, *et al.* (2005) Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. **Arch Biochem Biophys** 433: 129–43.
- Moreno S.N., Silva J., Vercesi A.E. & Docampo R. (1994) Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **J Exp Med** 180: 1535–40.
- Moura M.B. De, Schamber-reis B.L.F., Gomes D., Silva P., Rajão M.A., Macedo A.M., *et al.* (2009) Cloning and Characterization of DNA Polymerase eta from *Trypanosoma cruzi*: Roles for Translesion Bypass of Oxidative Damage. **Environ Mol Mutagen** 50: 375–386.
- Muñoz-Fernández M.A., Fernández M.A. & Fresno M. (1992a) Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol Lett** 33: 35–40.
- Muñoz-Fernández M.A., Fernández M.A. & Fresno M. (1992b) Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for

- the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol** 22: 301–7.
- Nakabeppu Y., Kajitani K., Sakamoto K., Yamaguchi H. & Tsuchimoto D. (2006) MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, prevents the cytotoxicity and neurotoxicity of oxidized purine nucleotides. **DNA Repair** 5: 761–72.
- Nakamura T., Doi T., Sekiguchi M. & Yamagata Y. (2004) Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* MutT in binary and ternary complex forms. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 60: 1641–3.
- Neeley W.L. & Essigmann J.M. (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. **Chem Res Toxicol** 19: 491–505.
- Nogueira F.B., Krieger M.A., Nirdé P., Goldenberg S., Romanha A.J. & Murta S.M.F. (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: 119–32.
- Nogueira N.P.D.A., De Souza C.F., Saraiva F.M.D.S., Sultano P.E., Dalmau S.R., Bruno R.E., *et al.* (2011) Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. **PLoS One** 6: e25935.
- Novo E. & Parola M. (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis Tissue Repair** 1: 5.
- Paes M.C., Oliveira M.B. & Oliveira P.L. (2001) Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol** 48: 63–71.
- Passos-Silva D.G. & Machado C.R. (2010a) *Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA*. ICB - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Passos-Silva D.G., Rajão M.A., Aguiar P.H.N., Vieira-da-Rocha J.P., Machado C.R. & Furtado C. (2010b) Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **J Nucleic Acids** 2010: 1–14.
- Peloso E.D.F., Gonçalves C.C., Silva T.M., Ribeiro L.H.G., Piñeyro M.D., Robello C., *et al.* (2012) Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Arch Biochem Biophys** 520: 117–22.
- Peña-Díaz J., Akbari M., Sundheim O., Farez-Vidal M.E., Andersen S., Sneve R., *et al.* (2004) *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. **J Mol Biol** 342: 787–99.

- Pérez J., Gallego C., Bernier-Villamor V., Camacho A., González-Pacanowska D. & Ruiz-Pérez L.M. (1999) Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae leishmania major and Trypanosoma cruzi confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient Escherichia coli. **Nucleic Acids Res** 27: 771–7.
- Petermann E., Ziegler M. & Oei S.L. (2003) ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. **DNA Repair** 2: 1101–14.
- Piacenza L., Alvarez M.N., Peluffo G. & Radi R. (2009a) Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. **Curr Opin Microbiol** 12: 415–21.
- Piacenza L., Peluffo G., Alvarez M.N., Kelly J.M., Wilkinson S.R. & Radi R. (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J** 410: 359–68.
- Piacenza L., Peluffo G., Alvarez M.N., Martínez A. & Radi R. (2012) Trypanosoma cruzi Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxid Redox Signal** XX.
- Piacenza L., Zago M.P., Peluffo G., Alvarez M.N., Basombrio M. a & Radi R. (2009b) Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. **Int J Parasitol** 39: 1455–64.
- Piñeyro M.D., Arcari T., Robello C., Radi R. & Trujillo M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys** 507: 287–95.
- Piñeyro M.D., Parodi-Talice A., Arcari T. & Robello C. (2008) Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene** 408: 45–50.
- Podlutzky A.J., Dianova I.I., Podust V.N., Bohr V.A. & Dianov G.L. (2001) Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. **EMBO J** 20: 1477–82.
- Rai P., Onder T.T., Young J.J., McFaline J.L., Pang B., Dedon P.C., *et al.* (2009) Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106: 169–74.
- Rajão M.A., Passos-Silva D.G., DaRocha W.D., Franco G.R., Macedo A.M., Pena S.D.J., *et al.* (2009) DNA polymerase kappa from Trypanosoma cruzi localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. **Mol Microbiol** 71: 185–97.
- Rassi Jr A., Rassi A. & Marin-Neto J.A. (2010) Chagas disease. **The Lancet** 375: 1388–1402.

- Ratcliffe N.A., Nigam Y., Mello C.B., Garcia E.S. & Azambuja P. (1996) Trypanosoma cruzi and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol** 83: 83–93.
- Regis-da-Silva C.G., Freitas J.M., Passos-Silva D.G., Furtado C., Augusto-Pinto L., Pereira M.T., *et al.* (2006) Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol** 149: 191–200.
- Robertson a B., Klungland A., Rognes T. & Leiros I. (2009) Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci** 66: 981–93.
- Russo M.T., Blasi M.F., Chiera F., Fortini P., Degan P., Macpherson P., *et al.* (2004) The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. **Mol Cell Biol** 24: 465–74.
- Russo M.T., De Luca G., Degan P. & Bignami M. (2007) Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. **Mutat Res** 614: 69–76.
- Sakumi K., Furuichi M., Tsuzuki T., Kakuma T., Kawabata S., Maki H., *et al.* (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. **J Biol Chem** 268: 23524–30.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 74: 5463–7.
- Santos J.H., Hunakova L., Chen Y., Bortner C. & Van Houten B. (2003) Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. **J Biol Chem** 278: 1728–34.
- Santos J.H., Meyer J.N., Mandavilli B.S. & Van Houten B. (2006) Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. **Methods Mol Biol** 314: 183–99.
- Schamber-Reis B.L.F., Nardelli S., Régis-Silva C.G., Campos P.C., Cerqueira P.G., Lima S.A., *et al.* (2012) DNA polymerase beta from Trypanosoma cruzi is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. **Mol Biochem Parasitol** 183: 122–131.
- Scharfstein J., Schmitz V., Morandi V., Capella M.M., Lima A.P., Morrot A., *et al.* (2000) Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **J Exp Med** 192: 1289–300.
- Schofield M.J. & Hsieh P. (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annu Rev Microbiol** 57: 579–608.

- Setoyama D., Ito R., Takagi Y. & Sekiguchi M. (2011) Molecular actions of *Escherichia coli* MutT for control of spontaneous mutagenesis. **Mutat Res** 707: 9–14.
- Shibutani S., Takeshita M. & Grollman A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature** 349: 431–4.
- Sibley L.D. (2011) Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev** 240: 72–91.
- Slupphaug G., Kavli B. & Krokan H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res** 531: 231–51.
- De Souza W., De Carvalho T.M.U. & Barrias E.S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol** 2010: 1–19.
- Tanowitz H.B., Kirchhoff L. V, Simon D., Morris S. a, Weiss L.M. & Wittner M. (1992) Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev** 5: 400–19.
- Tardieux I., Nathanson M.H. & Andrews N.W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. **J Exp Med** 179: 1017–22.
- Tardieux I., Webster P., Ravesloot J., Boron W., Lunn J.A., Heuser J.E., *et al.* (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell** 71: 1117–30.
- Todorov A.G., Einicker-Lamas M., De Castro S.L., Oliveira M.M. & Guilherme A. (2000) Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. **J Biol Chem** 275: 32182–6.
- Tomlinson S., Vandekerckhove F., Frevert U. & Nussenzweig V. (1995) The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology** 110: 547–54.
- Tsuzuki T., Nakatsu Y. & Nakabeppu Y. (2007) Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. **Cancer Sci** 98: 465–70.
- Uchida K., Furukohri A., Shinozaki Y., Mori T., Ogawara D., Kanaya S., *et al.* (2008) Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal. **Mol Microbiol** 70: 608–22.
- Vidmar J.J. & Cupples C.G. (1993) MutY repair is mutagenic in mutT- strains of *Escherichia coli*. **Can J Microbiol** 39: 892–4.
- Villalta F., Scharfstein J., Ashton A.W., Tyler K.M., Guan F., Mukherjee S., *et al.* (2009) Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. **Parasitol Res** 104: 1251–60.

- Villamil S.H.F., Baltanás R., Alonso G.D., Vilchez Larrea S.C., Torres H.N. & Flawiá M.M. (2008) TcPARP: A DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol** 38: 277–87.
- Whitten M., Sun F., Tew I., Schaub G., Soukou C., Nappi A., *et al.* (2007) Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochem Mol Biol** 37: 440–52.
- Wiese A.G., Pacifici R.E. & Davies K.J. (1995) Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. **Arch Biochem Biophys** 318: 231–40.
- Wilkinson S.R., Meyer D.J., Taylor M.C., Bromley E. V, Miles M.A. & Kelly J.M. (2002a) The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem** 277: 17062–71.
- Wilkinson S.R., Obado S.O., Mauricio I.L. & Kelly J.M. (2002b) *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 13453–8.
- Wilkinson S.R., Prathalingam S.R., Taylor M.C., Ahmed A., Horn D. & Kelly J.M. (2006) Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med** 40: 198–209.
- Wilkinson S.R., Taylor M.C., Touitha S., Mauricio I.L., Meyer D.J. & Kelly J.M. (2002c) TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochem J** 364: 787–94.
- Winterbourn C.C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat Chem Biol** 4: 278–86.
- Woodward R. & Gull K. (1990) Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci** 95 ( Pt 1): 49–57.
- Woolsey A.M., Sunwoo L., Petersen C. a, Brachmann S.M., Cantley L.C. & Burleigh B. a (2003) Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J Cell Sci** 116: 3611–22.
- Wyrzykowski J. & Volkert M.R. (2003) The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. **J Bacteriol** 185: 1701–4.
- Zacks M. a, Wen J.-J., Vyatkina G., Bhatia V. & Garg N.J. (2005) An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77: 695–715.

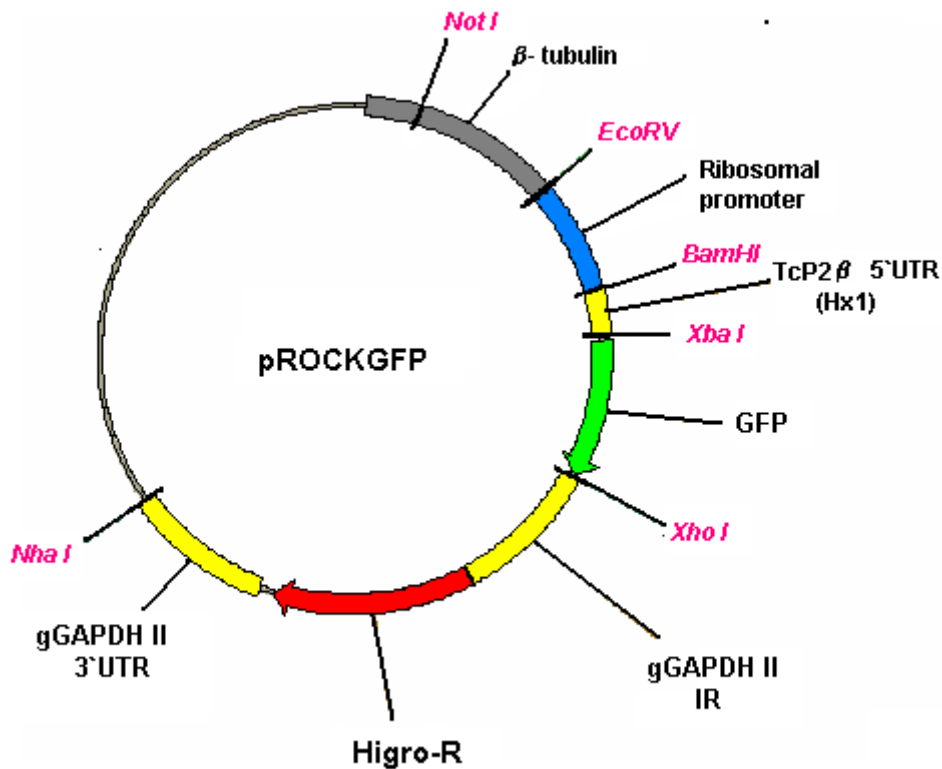
Zharkov D.O. & Grollman A.P. (2005) The DNA trackwalkers: principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases. **Mutat Res** 577: 24–54.



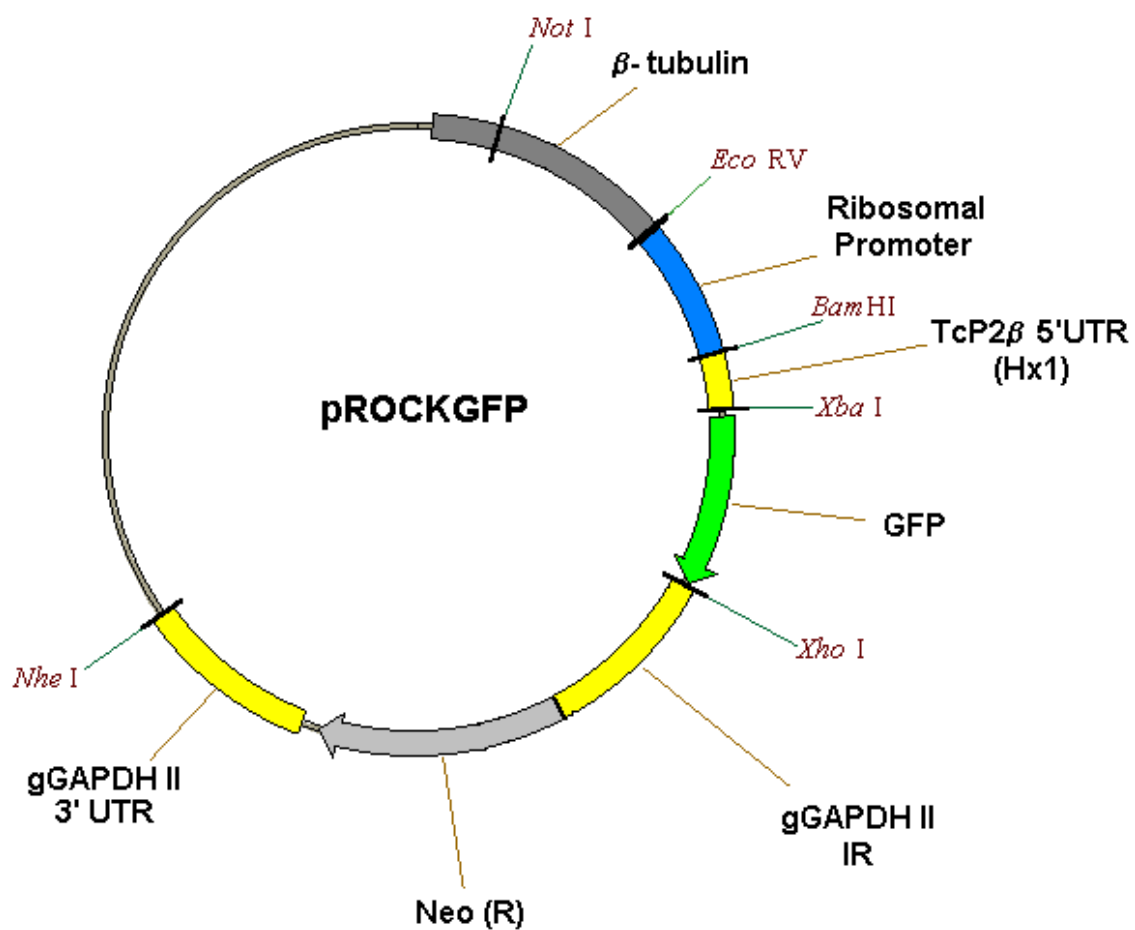
ATGGCCGCGATGACTGCGACGGTCCATTTGTTGCCGCG  
CACACATCTGAATGGATTGCGCTGGTGCAAAGGGCGC  
TTCCACTGCGACTGGATGAATTGCGCATGCCTAACCAT  
TTTCTTTTGAAGGACATCCACACAGGGGCGTTGCCGTT  
ACACCTGCACGCATTCAATGCCGCCGCACAGTAAACGC

## 8. Anexos

GCTCACAAAACGTACGGCAAACCTCCGTTCATCATAGGA  
GTCAGATGTCATTTCCAGGAGGGAGGGTGGATCATGGC  
GAGACGATTATAACCGCCGCTCAGCGCGAAACCATGGA  
GGAAATAGGCATCCCTGCATCGTCCTATTGTGTCATTG  
GCACACTGCATCCGATTTATTCTTCTGACGGCGGATCC  
AAGGTGTTTCCCGTGGTTGCTGTCGCCGAATCCGCTGT  
AGAGCCGGTTTGCAAAGTCCGGATGAGGTCGCTTCTA  
TTCATTACATGCACCTGTCCCGTCTGCTTCTGGAGTCT  
GAGCGAACACACTGTCGTCTTATTAAGGGCACTCTTT  
AACAGGTGGTATGCCAAGTTACTTTCCTTGTTTTTTTG  
CTAGTGAATCGCAGGCTGTGGTCTGCCGGTCCGATGTTT  
GCCCCACAAAAATAACACCAGTCAATTCAGAGGACGG  
TGGGTTGTTTCCTATGCTGCGGGAAAATTTCCCTGGTG  
AACTCGTCTGGGGAAATAACCGCATTATTACATGCGAA  
CTTTTAGTGCGTCTTTCGCGCGTCTGGAGTTGAGTCA  
ACTCCGTGAAGGAGACGCGATGGGTTTGCTGAGGTGCA  
GTTCTGTTGTTGCTCGCGACCCAGAGTGTATTTACAAG  
GAAAACCTCCAGCTGA



**ANEXO 1: Mapa circular do vetor pROCK\_HIGRO.** Desenho esquemático do vetor pROCK\_HIGRO, utilizado para expressão permanente em *T. cruzi* de um gene de interesse. O vetor possui o promotor de rRNA, que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de Hx1 (derivada da região 5'UTR de TcP2 $\beta$ ), um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por trans-splicing. Além disso, possui as regiões intergênicas e 3'UTR do gene GAPDH, sinais para trans-splicing e poliadenilação do transcrito de Higro-R, que confere resistência a higromicina. A linearização do vetor com *Not I* permite a integração do vetor, através de recombinação homóloga, no locus de  $\beta$ -tubulina do DNA genômico do parasito. (Adaptado de DAROCHA et al., 2004).



**ANEXO 2: Mapa circular do vetor pROCK\_NEO.** Desenho esquemático do vetor pROCK\_NEO, utilizado para expressão permanente em *T. cruzi* de um gene de interesse. O vetor possui as mesmas características do pROCK\_HIGRO, porém o gene de resistência NEO confere resistência a Neomicina (Adaptado de DAROCHA et al., 2004).