

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

João Pedro Vieira da Rocha

**ESTUDOS SOBRE O REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS E A  
RESPOSTA A DANOS NO DNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS**

Belo Horizonte

Dezembro de 2013

João Pedro Vieira da Rocha

**ESTUDOS SOBRE O REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS E A  
RESPOSTA A DANOS NO DNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS**

**Versão Final**

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

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Santuza Maria Ribeiro  
Teixeira

Co-orientador no exterior: Dr. Richard  
McCulloch

Belo Horizonte

Dezembro de 2013

043 Rocha, João Pedro Vieira da.  
Estudos sobre o reparo por excisão de nucleotídeos e a resposta a danos no DNA em tripanossomatídeos [manuscrito] / João Pedro Vieira da Rocha. - 2013.

207 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado. Coorientadores: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira e Prof. Dr. Richard McCulloch.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Reparo do DNA. 2. Trypanosomatina. 3. Metabolismo. 4. Trypanosoma brucei brucei. I. Machado, Carlos Renato. II. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. III. McCulloch, Richard. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



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

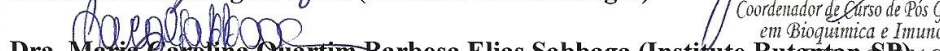


**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JOÃO PEDRO VIEIRA DA ROCHA.**  
 Aos dezenove dias do mês de dezembro de 2013 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudos sobre o reparo por excisão de nucleotídeos e a resposta a danos no DNA em tripanossomatídeos", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. João Trindade Marques (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Andrea Rodrigues Ávila (Instituto Carlos Chagas), aprovado; Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga (Instituto Butantan-SP), aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Co-Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2013.

  
 Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)

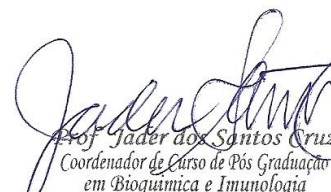
  
 Dr. João Trindade Marques (UFMG)

  
 Dra. Andrea Rodrigues Ávila (Instituto Carlos Chagas)

  
 Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga (Instituto Butantan-SP)

  
 Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Co-Orientadora (UFMG)

  
 Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)

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



## Agradecimentos

Ao meu orientador, o Nem, por todos os anos de orientação, desde a iniciação científica até o doutorado, pela dedicação, paciência, empolgação, criatividade e constante presença durante a realização deste e de outros trabalhos.

À Santuza M. R. Teixeira, pela co-orientação, ajuda em vários experimentos e pelo suporte oferecido em seu laboratório.

Ao Richard McCulloch, pela co-orientação durante o doutorado sanduíche, pela grande disponibilidade e boa vontade em discutir experimentos e resultados.

Aos demais professores do LGB, Andrea M. Macedo, Glória R. Franco e Sérgio D. J. Pena, por todos os ensinamentos, que muito contribuíram para a minha formação científica.

À Neuza R. Antunes, pelo suporte técnico ao LGB, por manter sempre tudo em ordem e pela grande disponibilidade em resolver os problemas do laboratório.

Ao grupo de reparo, desde os antigos membros até os mais novos, pela agradável convivência, cumplicidade e por toda a ajuda.

Aos demais integrantes do LGB, antigos e atuais, pela ótima convivência durante todo esse tempo e pelas contribuições dadas ao meu trabalho.

À equipe do Welcome Trust Centre for Molecular Parasitology, especialmente ao grupo do Richard, pela agradável convivência durante o doutorado sanduíche e pela ajuda durante vários experimentos.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Doenças Parasitárias, pela ajuda prestada durante alguns experimentos.

À Juliana B. F. Garcia e à Angela K. Cruz, pela colaboração durante os experimentos com AsfI.

À Marcela G. Drummond, pela ajuda com as validações dos knockdowns por real-time.

A todos os membros do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, pela excelente formação a que tive acesso.

À Secretaria do programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Celise M. F. Costa, pela boa vontade em resolver os assuntos de ordem burocrática.

Às agências de incentivo à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste projeto.

Aos meus amigos, que me acompanharam durante todo o processo, nas horas boas e nas mais tensas também!

A toda a minha família e aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo constante durante todo o curso.

À minha mãe, que mesmo não estando mais conosco, ajudou a despertar em mim o gosto pelos estudos e pela ciência.

Especialmente ao meu pai, pois a sua ajuda foi fundamental para a finalização desta tese. A sua curiosidade, devoção aos estudos e hobbies pouco ortodoxos (para um belo-horizontino, pelo menos) certamente foram fatores decisivos para a minha inspiração, no momento da escolha pela profissão de cientista.

Muito obrigado a todos!

## Sumário

Prelúdio.....	18
Capítulo 1: A resposta a danos no DNA, em <i>T. brucei</i> , é diferencialmente regulada ao longo do seu ciclo de vida.....	22
1.1 Introdução.....	22
1.1.1 Reparo de DNA em <i>T. brucei</i> .....	24
1.1.1.1 Reparo por excisão de bases (BER).....	25
1.1.1.2 Reparo de quebras duplas (DSBR).....	27
1.1.1.3 Síntese translesão.....	32
1.1.2 Outros processos relacionados à sobrevivência celular e manutenção da estabilidade genômica.....	33
1.1.3 Por que estudar a DDR de tripanossomatídeos?.....	36
1.2 Objetivos.....	38
1.2.1 Objetivo Geral.....	38
1.2.2 Objetivos específicos.....	38
1.3 Material e Métodos.....	39
1.3.1 Cultivo dos parasitos.....	39
1.3.2 Curvas de crescimento das formas procíclica e sanguícola do <i>Trypanosoma brucei</i> , após o tratamento com agentes genotóxicos.....	39
1.3.3 Quantificação das frequências de lesões, nos genomas nuclear e mitocondrial, das formas sanguícola e procíclica do <i>Trypanosoma brucei</i> , através da técnica de PCR quantitativa.....	40
1.3.3.1 Tratamento dos parasitos com os agentes genotóxicos cisplatina e UVC.....	41
1.3.3.2 Extração do DNA genômico dos parasitos.....	41
1.3.3.3 Dosagem do DNA genômico.....	43
1.3.3.4 Reações de PCR.....	43
1.3.3.4.1 Desenho dos iniciadores.....	43
1.3.3.4.2 As reações de PCR.....	44
1.3.3.4.3 Análise quantitativa das amplificações.....	45
1.4 Resultados.....	46

1.4.1 Comparação da resposta a danos no DNA entre as formas procíclica e sanguícola do <i>T. brucei</i> .....	46
1.4.1.1 Os tratamentos com radiação ultravioleta e cisplatina.....	47
1.4.1.2 Os tratamentos com peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e metilmetanosulfonato (MMS).....	60
1.5 Discussão.....	77
1.6 Perspectivas.....	90
Capítulo 2: Caracterização do NER em <i>T. brucei</i> : especialização do reparo acoplado à transcrição em função da transcrição multigênica.....	91
2.1 Introdução.....	91
2.2 Objetivos.....	99
2.2.1 Objetivo geral.....	99
2.2.2 Objetivos específicos.....	99
2.3 Material e Métodos.....	100
2.3.1 Cultivo dos parasitos.....	100
2.3.2 RNAi.....	100
2.3.3 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	107
2.3.4 Tratamento com agentes genotóxicos das linhagens de <i>T. brucei</i> silenciadas para os genes do NER.....	107
2.3.5 Modelagem comparativa e análise <i>in silico</i> das interações proteína-DNA.....	108
2.3.6 Imunofluorescência.....	109
2.3.7 Quantificação das frequências de lesões no genoma nuclear da forma sanguícola do <i>T. brucei</i> através da técnica de PCR quantitativa.....	110
2.4 Resultados.....	111
2.4.1 Identificação dos ortólogos putativos do NER em <i>T. brucei</i> .....	111
2.4.2 Silenciamento da expressão dos mRNAs dos genes preditos para o NER em <i>T. brucei</i> por RNAi.....	122
2.4.3 Crescimento da forma sanguícola do <i>T. brucei</i> , após indução de RNAi, contra os transcritos das proteínas preditas do NER.....	124
2.4.4 As proteínas TbCSB e TbXPBz estão envolvidas na recuperação de danos no DNA gerados após irradiação com UV.....	126
2.4.5 Lesões induzidas por UV praticamente não são reparadas nos tripanossomatídeos.....	128
2.4.6 TbCSB, TbXPBz e TbXPG participam do TC-NER de lesões induzidas por cisplatina.....	131
2.4.7 Avaliação da expressão de mRNAs, derivados de uma unidade policistrônica do genoma do <i>T. brucei</i> , após a inibição por RNAi, da expressão de componentes do NER.....	133

2.4.8 Avaliação dos níveis de mRNA, após a inibição da expressão de TbCSB por RNAi, na presença de danos no DNA.....	136
2.4.9 As proteínas putativas do GG-NER estão envolvidas no reparo de <i>crosslinks</i> entre as fitas complementares do DNA.....	140
2.5 Discussão.....	142
2.6 Perspectivas.....	152
Capítulo 3: O papel da Asf1A na resposta a danos no DNA em <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i> .....	153
3.1 Introdução.....	153
3.2 Objetivos.....	158
3.2.1 Objetivo geral.....	158
3.2.2 Objetivos específicos.....	158
3.3 Material e Métodos.....	159
3.3.1 Cultivo dos parasitos.....	159
3.3.2 Obtenção da cepa superexpressora de Asf1A em <i>T. cruzi</i> .....	159
3.3.2.1 Amplificação do gene TcAsf1A.....	159
3.3.2.2 Sub-clonagem e clonagem do gene TcAsf1a em pRockNeo.....	160
3.3.2.3 Transfecção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com o vetor pRockNeo-TcAsf1A.....	163
3.3.2.4 Confirmação da superexpressão de TcAsf1A, em <i>T. cruzi</i> , por PCR quantitativa em tempo real.....	164
3.3.3 Curvas de crescimento de <i>T. cruzi</i> na presença de agentes genotóxicos.....	164
3.4 Resultados.....	166
3.4.1 Obtenção da linhagem de <i>T. cruzi</i> superexpressora de TcAsf1A.....	166
3.4.2 Crescimento de linhagem de <i>T. cruzi</i> superexpressora de Asf1A na presença de agentes genotóxicos.....	168
3.5 Discussão.....	173
3.5.1 A resposta a danos no DNA, entre <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i> , é diferencialmente regulada.....	173
3.5.2 A proteína Asf1A poderia assumir papéis diferentes na resposta a danos no DNA em <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i> .....	180

3.6 Perspectivas.....	186
Considerações finais.....	188
Referências Bibliográficas.....	191
Anexos.....	207

## Lista de tabelas e figuras

Tabela 1: Iniciadores utilizados na produção das construções do RNAi e na quantificação dos níveis de mRNA.....	103
Figura 1.1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i> .....	23
Figura 1.2: Desenho experimental da técnica de detecção de danos no DNA por PCR quantitativa.....	42
Figura 1.3: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de radiação ultravioleta, nas quais os parasitos foram tratados (0, 50, 100, 250 e 500 J/m <sup>2</sup> ).....	50
Figura 1.4: Curva da cinética de reparo, após o tratamento das formas sanguícola e procíclica do <i>T. brucei</i> com 30 J/m <sup>2</sup> de radiação ultravioleta.....	51
Figura 1.5: Curva de crescimento do <i>T. brucei</i> após tratamento com 30, 60 e 120 J/m <sup>2</sup> de radiação ultravioleta em PBS 1x.....	52
Figura 1.6: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de cisplatina nas quais os parasitos foram tratados por 1 hora (0, 50, 100, 200 e 400 µM).....	55
Figura 1.7: Curva da cinética de reparo de DNA, após o tratamento das formas sanguícola e procíclica do <i>T. brucei</i> , com 100 µM de cisplatina por 1 hora.....	56
Figura 1.8: Curva de crescimento do <i>T. brucei</i> após tratamento com 100, 200 e 400 µM de cisplatina por 1 hora.....	59
Figura 1.9: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de peróxido de hidrogênio nas quais os parasitos foram tratados (0, 50, 100, 200 e 400 µM).....	63
Figura 1.10: Curva da cinética de reparo, após o tratamento das formas sanguícola e procíclica do <i>T. brucei</i> , com 100 µM peróxido de hidrogênio, por 1 hora.....	64
Figura 1.11: Curva de crescimento do <i>T. brucei</i> , após tratamento com 50 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 30 minutos e 50/100 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 60 minutos.....	65
Figura 1.12: Curva dose resposta do número de lesões/10 kb versus as doses de MMS nas quais os parasitos foram tratados por 1 hora (0,5; 1; 1,5 e 2 mM).....	68
Figura 1.13: Curva da cinética de reparo, após o tratamento das formas sanguícola e procíclica do <i>T. brucei</i> , com 1,5 mM de MMS, por 1 hora.....	69
Figura 1.14: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de MMS nas quais os parasitos da forma procíclica foram tratados por 1 hora (1,5; 3; 6 e 12 mM).....	71
Figura 1.15: Curva de crescimento do <i>T. brucei</i> , após tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora.....	72

Figura 1.16: Curva da cinética de reparo após o tratamento com MMS das formas sanguícolas selvagem e Rad51 -/- do <i>T. brucei</i> .....	75
Figura 1.17: Tratamento com MMS da forma sanguícola do <i>T. brucei</i> , nocaute para o gene Rad51.....	76
Figura 2.1: Provável sequência de eventos do TC-NER e GG-NER em mamíferos.....	92
Figura 2.2: Organização dos genes nos genomas dos TriTryps.....	96
Figura 2.3: O vetor pGL2084.....	101
Figura 2.4: A proteína XPC de <i>T. brucei</i> .....	113
Figura 2.5: A proteína RAD23 de <i>T. brucei</i> .....	114
Figura 2.6: A proteína DDB de <i>T. brucei</i> .....	115
Figura 2.7: A proteína CSB de <i>T. brucei</i> .....	116
Figura 2.8: A proteína XPD de <i>T. brucei</i> .....	117
Figura 2.9: Homólogos de XPB em <i>T. brucei</i> .....	118
Figura 2.10: A proteína XPG de <i>T. brucei</i> .....	119
Figura 2.11: A proteína XPF de <i>T. brucei</i> .....	120
Figura 2.12: A proteína ERCC1 de <i>T. brucei</i> .....	121
Figura 2.13: Quantificação dos níveis de mRNA de TbXPB, TbXPBz, TbXPC, TbXPD, TbDDB, TbXPF, TbERCC1, TbXPG and TbCSB após a indução do RNAi.....	123
Figura 2.14: Curvas de crescimento das linhagens de <i>T. brucei</i> , cujos componentes do NER foram silenciados por RNAi.....	125
Figura 2.15: TbCSB e TbXPBz estão envolvidas na recuperação de danos no DNA após a irradiação com UV.....	127
Figura 2.16: As lesões induzidas por UV não são eficientemente reparadas na forma sanguícola do <i>T. brucei</i> .....	130
Figura 2.17: TbCSB, TbXPBz e TbXPG participam do TC-NER das lesões induzidas por cisplatina.....	132
Figura 2.18: Unidade policistrônica do cromossomo 8 de <i>T. brucei</i> , cuja expressão de oito genes foi analisada, após a inibição da expressão dos componentes do NER por RNAi.....	134
Figura 2.19: Avaliação dos níveis de mRNA, derivados de um trecho de uma unidade de transcrição multigênica, antes e após a indução do RNAi contra os componentes do NER em <i>T. brucei</i> .....	135



Figura 2.20: Avaliação dos níveis de mRNA, após o silenciamento de CSB, na presença de dano no DNA.....	137
Figura 2.21: O silenciamento de CSB aumenta, em curto prazo, a resistência à irradiação UV.....	139
Figura 2.22: As proteínas putativas do GG-NER de <i>T. brucei</i> estão envolvidas no reparo de lesões do tipo <i>crosslink</i> entre as fitas do DNA.....	141
Figura 2.23: TbXPC apresenta um sítio de reconhecimento de lesão mais largo, quando comparada a seu homólogo em levedura.....	146
Figura 3.1: Mapa do vetor pRockGFPneo.....	162
Figura 3.2: Análise em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo, das etapas de clonagem do gene TcAsf1A no vetor de superexpressão em <i>T. cruzi</i> , pRock Neo.....	167
Figura 3.3: Curva de crescimento de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> na presença de MMS.....	169
Figura 3.4: Curva de crescimento de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	170
Figura 3.5: Curva de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> após irradiação com 500 Gy de raios gama.....	172
Figura 3.6: Curvas de crescimento de formas promastigotas de <i>L. major</i> na presença de agentes genotóxicos.....	176 e 177
Figura 3.7: Citometria de fluxo das populações controle (Lm[pX63NEO]) e superexpressora de Asf1A (Lm[pX63NEO-ASF1]) de formas promastigotas de <i>L. major</i> , fixadas com etanol 70% e coradas com iodeto de propídeo, após tratamento com 500 Gy de irradiação gama.....	178
Figura 3.8: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE ( <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> ), após o tratamento com 500 grays de irradiação gama.....	179
Figura 3.9: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE ( <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> ), após o tratamento com 0,01% v/v de MMS.....	181
Figura 3.10: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE ( <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> ), após o tratamento com peróxido de hidrogênio.....	182
Figura 3.11: A superexpressão de Asf1 em <i>T. brucei</i> .....	184

## Lista de Siglas e Abreviaturas

$\gamma$ -H2AX: histona H2, variante X, fosforilada

2xYT: meio *yeast tryptone 2x*

5'dRP: 5' desoxirribose-fosfato

6-4PPs: (6-4 *photoproducts*) fotoprodutos 6-4

ACAD: acetil-CoA desidrogenase

ADP: adenosina difosfato

AID: (*activation-induced cytidine deaminase*) citidina desaminase induzida por ativação

ANOVA: (*analysis of variance*) análise de variância

APE-1: endonuclease apurínica/apirimidínica 1

Asf1(A/B): (*anti-silecing factor 1*) fator anti-silenciamento 1 A e/ou B

ATM: (*ataxia telangiectasia mutated*) ataxia telangiectasia mutado

ATP: adenosina trifosfato

ATR: (*ataxia telangiectasia rad3 related*) ataxia telangiectasia relacionado a Rad3

BER: Reparo por excisão de bases

BLAST: (*basic local alignment search tool*) ferramenta básica de busca por alinhamento local

BRCA2: (*breast cancer 2*) câncer de mama 2

BSA: albumina do soro bovino

CAK: complexo ativador de cinase

cDNA: DNA complementar

CHK1: (*checkpoint kinase-1*) Proteína cinase do checkpoint 1

CHK2: (*checkpoint kinase-2*) Proteína cinase do checkpoint 2

Complexo 9-1-1: complexo de proteínas formado por Rad9, Rad1 e Hus1

Complexo MRN: complexo de proteínas constituído por Mre11, Rad50 e Nbs1

Complexo Rad17-RFC: Complexo formado pelas proteínas Rad17 e RFC (*Replication Factor C* – fator de replicação C)

CPD: (*cyclobutane pyrimidine dimer*) dímero de pirimidina ciclobutano

CS: Síndrome de Cockayne

CSA: Síndrome de Cockayne A

CSB: Síndrome de Cockayne B

DASH, criptocromos: (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, humano)

DDB (1/2): (*UV-damaged DNA-binding protein 1 and 2*) proteína 1 e 2 de ligação ao DNA danificado por UV

ddH<sub>2</sub>O: água duplamente destilada

DDR: (*DNA damage response*) resposta a danos no DNA

DMC1-1: (*disrupted meiosis cDNA 1*) cDNA-1 associado a defeito na meiose

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos

DSB: (*double strand breaks*) quebras de fita dupla

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

ERCC1: (*excision repair cross complementing 1*) gene 1 de complementação cruzada do reparo por excisão

ESAGS: (*expression site associated genes*) genes associados ao sítio de expressão

FA: Anemia de Fanconi

FEN1: endonuclease 1 específica para a estrutura Flap

FITC: fluoresceína isotiocianato

G1: fase do ciclo celular, *gap 1*

G2: fase do ciclo celular, *gap 2*

GC: guanina-citosina

GGR-NER: sub-via do NER: (*global genome repair*) reparo global do genoma

GPI8: glicosilfosfatidilinositol

Gy: Gray

HR: (*homologous recombination*) recombinação homóloga

HSP: (*heat shock protein*) proteína de choque térmico

HMI-9: (*hirumi-modified Iscove's medium 9*) meio Iscove modificado por Hirumi número 9

ICLs: *interstrand crosslinks*

Kb: kilobase

kDNA: (*kinetoplast DNA*) DNA do cinetoplasto

Ku70/Ku80:

LB: meio Luria-Bertani

LIG1: DNA ligase 1

LIG3: DNA ligase 3

LIT: *Liver infusion-tryptose*

MBD4: (*methyl-CpG-binding protein 4*) proteína 4 de ligação ao grupamento metil de citosinas precedidas por guaninas

Mfd: (*mutation frequency decline*) declínio da frequência de mutações

MMEJ: (*Microhomology-mediated end-joining*) Reparo mediado por microhomologia

MMR: (*Mismatch Repair*) reparo de erros de pareamento

MMS: metilmetanosulfonato

MND1: (*meiotic nuclear division protein 1*) proteína de divisão nuclear meiótica 1

Mre11: (*meiotic recombination 11 homolog A*) homólogo de recombinação meiótica 11 A

mRNA: RNA mensageiro

NBS1: (*Nijmegen breakage syndrome gene*) gene da síndrome de quebra Nijmegen

Neil1: nei endonuclease VIII-like 1 (*E. coli*)

nDNA: (*nuclear DNA*) DNA do núcleo

NER: reparo por excisão de nucleotídeos

NHEJ: *non-homologous end joining*

OGG1: 8-oxoguanina-DNA glicosilase 1

ORF: (*open reading frame*) janela aberta de leitura

PARG: poli(ADP)ribose glicohidrolase

PARP: poli(ADP)ribose polimerase

PBS: (*Phosphate buffered saline*) tampão fosfato

PCNA: (*Proliferating cell nuclear antigen*) antígeno nuclear de proliferação celular

PCR: (*polymerase chain reaction*) reação em cadeia da polimerase

PFGE: (*pulse field gel electrophoresis*) gel de eletroforese em campo pulsátil

Pol  $\gamma$ : DNA polimerase gama

Pol  $\beta$ -PAK: DNA polimerase beta contendo uma região rica em prolina, alanina e lisina

Pol $\eta$ : DNA polimerase eta

Pol $\kappa$ : DNA polimerase kapa

Pol $\zeta$ : DNA polimerase zeta

PolI B/C/D: DNA polimerase I B/C/D

Pol $\beta$ : DNA polymerase beta

Pol $\delta$ : DNA polimerase delta

Pol $\epsilon$ : DNA polimerase épsilon

qPCR: PCR quantitativa

qRT-PCR: PCR quantitativa em tempo real

Rad1, Rad4, Rad6, Rad10 Rad18, RAD23, Rad50, Rad51, Rad51, Rad51-3, Rad51-5, Rad52, Rad53 e Rad54: (*Radiation sensitive*) homólogos das proteínas mutadas nas cepas de levedura sensíveis à radiação

Reparo de ICL: Reparo de ligações covalentes estabelecidas entre as fitas complementares do DNA

Rev1: (*reversionless 1*) clone 1 com ausência de mutações por reversão

RFC: (*Replication Factor C*) fator de replicação C

RNA Pol II: RNA polimerase II

RNA: ácido ribonucléico

ROS: (*reactive oxygen species*) espécies reativas do oxigênio

RPA: (*replication protein A*) proteína de replicação A

RT-PCR: PCR a partir do cDNA, produzido pela enzima transcriptase reversa

S: fase do ciclo celular, síntese

SAP: (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) fosfatase alcalina do camarão

SBF: soro fetal bovino

SDM-79: meio semi-definido 79

Sítios AP: sítios apurinícos/apirimidínicos

SL: *Spliced Leader*

SL-RNA: *Spliced Leader*-RNA

SMUG1: (*single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase*) uracil-DNA glicosilase monofuncional, seletiva para fita simples

SPO11: (*sporulation-specific protein 11*) proteína específica de esporulação 11

TAE: Tris-acetato EDTA

TbTopo3 $\alpha$ : topoisomerase 3  $\alpha$  de *T. brucei*

TCR-NER: sub-via do NER (*transcription coupled repair*) de reparo acoplado à transcrição

TE: Tris-EDTA

TFIIH: fator H de início de transcrição

TGD: *timine DNA glicosilase*

TLK1(/B): *Tousled-like kinase 1* e/ou *Tousled-like kinase 1/B*

TLS: (*Translesion synthesis*) síntese translesão

TM: mutagênese transcricional

Trityps: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*

TSP1/2: proteínas 1 e 2 específicas de tripanossomatídeos

TTD: Tricotiodistrofia

UNG: *uracila DNA glicosilase*

UV: radiação ultravioleta (200 a 400 nm)

UVC: radiação ultravioleta C (220 a 280 nm)

VSG: (*variant surface glycoprotein*) glicoproteína variante de superfície

WT: (*wilde type*) tipo selvagem

XLF: fator XRCC4-like ou Cernunnos

XP(A-G): (*Xeroderma Pigmentosum*) – grupos de complementação de A, B, Bz, C, D, E, F e G

XRCC1: (*X-ray repair cross complementing protein 1*) proteína 1 de complementação cruzada do reparo de raio X

XRCC4: (*X-ray repair cross complementing protein 4*) proteína 4 de complementação cruzada do reparo de raio X

## Resumo

Os tripanossomatídeos constituem um grupo de protozoários unicelulares de particular relevância médica, por conter espécies que parasitam humanos, tais como a *Leishmania* spp, o *Trypanosoma brucei* e o *Trypanosoma cruzi*. As doenças causadas por esses parasitos acometem aproximadamente 20 milhões de pessoas em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento. A alta variabilidade genética e antigênica expressas principalmente através das proteínas de superfície estão entre os mecanismos que estes parasitos utilizam para escaparem do sistema imunológico do hospedeiro. A geração de diversidade genética e antigênica está diretamente relacionada às vias do metabolismo de DNA. Portanto, o estudo dessas vias, em tripanossomatídeos, além de aprofundar a compreensão sobre a evolução do metabolismo de DNA na natureza, poderá trazer novas informações importantes para o melhoramento da terapêutica empregada no tratamento das doenças causadas por esses parasitos. Este projeto está focado no estudo dos processos metabólicos associados à resposta a danos no DNA (DDR) entre diferentes tripanossomatídeos. Na primeira parte deste trabalho, comparamos a resposta a danos no DNA, entre as formas procíclica e sanguícola do *T. brucei*, submetidas a variados tipos de estresse genotóxico. Foram encontradas consideráveis diferenças nos padrões de resposta a danos no DNA, entre essas duas formas evolutivas do parasito. Na segunda parte desta tese, caracterizamos a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *T. brucei*. Observamos, neste parasito, que o NER ocorre predominantemente via TC-NER (reparo por excisão de nucleotídeos associado à transcrição). Além disso, os genes preditos para a outra subvia do NER (GG-NER – reparo global do genoma) se especializaram no reparo de *crosslinks* entre fitas complementares do DNA. Já na última parte do trabalho, analisamos a função da proteína Asf1 na DDR de dois tripanossomatídeos diferentes. Através do perfil de resposta celular apresentado pelas cepas de *T. cruzi* e *L. major* superexpressoras de Asf1, ao serem expostas a diversos agentes genotóxicos, sugerimos que essa proteína possa estar envolvida em diferentes funções, associadas à DDR, nesses tripanossomatídeos.

Palavras-chave: Reparo de DNA. Tripanossomatídeos. Resposta a Danos no DNA.

## Abstract

Trypanosomatids constitute a group of unicellular protozoans highly relevant for human health, since it contains parasites that cause diseases in humans (e.g. *Leishmania* spp, o *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*). Diseases caused by trypanosomatids affect around 20 million people worldwide especially in developing countries. As a strategy to evade the host immune system, these parasites display high genetic and antigenic variability particularly represented by their surface proteins. The mechanisms involved in the generation of variability are related to the DNA metabolism pathways. Thus, studies regarding *trypanosomatid* DNA metabolism could contribute not only to a better understanding of the evolutionary process that culminate with these pathways, since this group represents a very divergent branch in the eukaryotic phylogenetic tree, but also could uncover new potential therapeutic targets to treat these diseases. This project aims to investigate the *trypanosomatids* DNA metabolism pathways associated with DNA damage response (DDR). In the first section of this thesis, we compared the DNA damage response between the two developmental forms of *T. brucei*, procyclic and bloodstream forms. We show that the DNA damage response is differentially regulated throughout the parasite life cycle. In the second section, we characterized *T. brucei* nucleotide excision repair (NER). *T. brucei* NER works mainly through the NER sub-pathway known as TC-NER (transcription-coupled NER). We also found that predicted genes for another NER sub-pathway, the GG-NER (global genome NER), is specialized in interstrand crosslink repair. In the final section, we investigated the role of Asf1 protein in DDR in *T. cruzi* and *L. major*. Asf1 overexpression interferes in the DNA damage recovery after exposure to DNA damaging agents. Since Asf1 overexpression results in different phenotypes in *T. cruzi* and *L. major*, we suggest that the Asf1 function may have diverged between these two parasites.

Keywords: DNA Repair. Tripanosomatids. DNA Damage Response.



## Prelúdio

O DNA está suscetível a diversos tipos de dano, devido à ação de agentes genotóxicos endógenos e exógenos, bem como devido à instabilidade intrínseca de sua molécula (Hoeijmakers, 2001). Agentes endógenos compreendem principalmente os subprodutos das vias metabólicas, tais como os compostos reativos do oxigênio e nitrogênio (Pluskota-Karwatka, 2008), além dos radicais alquil e metil (Marnett & Plataras, 2001). Agentes exógenos ou fatores ambientais, como radiação ionizante (raios X e raios  $\gamma$ ), radiação UV (ultravioleta) e agentes químicos, podem causar, respectivamente, quebras duplas das ligações fosfodiéster; dímeros de pirimidina ciclobutano e 6-4 fotoprodutos; e danos nas bases nitrogenadas do DNA e/ou distorções no arcabouço de açúcar-fosfato. A instabilidade da ligação glicosídica, entre a pentose e o anel da base, pode causar a perda da base, resultando em sítios apurínicos ou apirimidínicos (ou sítios AP) (Hoeijmakers, 2001). Finalmente, os danos no DNA podem ser gerados por enzimas do próprio metabolismo celular, tal como ocorre na formação de erros de pareamento do tipo U:G, através da atuação da enzima AID (Activation-induced cytidine deaminase), durante o processo de diversificação de receptores de antígenos, nos linfócitos B maduros dos mamíferos (Jankovic et al., 2007).

Dada à diversidade das formas de danos no DNA, muitas vias de reparo de DNA são usadas, tais como: (1) sanitização do pool de nucleotídeos, (2) a reversão direta das modificações de base, ou (3) retirada de (i) bases incorporadas erroneamente no DNA recém-replicado pelo reparo de erro de pareamento (ou MMR, do inglês *Mismatch Repair*), (ii) danos volumosos por meio de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*), e (iii) bases modificadas pelo reparo por excisão de base (ou BER, do inglês *Base Excision Repair*). O DNA também é suscetível a quebras duplas (ou DSBs, do inglês *Double Strand Breaks*), que podem ser reparados por recombinação homóloga (ou HR, do inglês *Homologous Recombination*) ou *non homologous end joining* (NHEJ). Mesmo que estes mecanismos reparem a maioria das lesões no DNA, alguns destes danos permanecem levando ao bloqueio da maquinaria de replicação. Alternativamente, algumas DNA polimerases especializadas podem adicionar nucleotídeos, através de moldes contendo lesões. Esse

processo, conhecido como síntese translesão (ou TLS, do inglês *Translesion Synthesis*) aumenta a probabilidade de erros de replicação, o que pode levar a mutações no material genético (Hoeijmakers, 2001).

As vias de reparo de DNA são conservadas em todos os domínios da vida, incluindo *Bacteria*, *Archaea* e eucariotos. Dentre os eucariotos, o nosso grupo de pesquisa se dedica ao estudo das vias de reparo de DNA em tripanossomatídeos, protozoários altamente divergentes dos principais organismos modelo, pertencentes à ordem dos cinetoplastídeos (ordem *Kinetoplastidae*). Essa ordem é composta por protozoários flagelados que possuem uma arquitetura do DNA mitocondrial única, formada por uma rede de minicírculos e maxicírculos, denominada de cinetoplasto (Simpson et al., 1980). Além disso, esse táxon apresenta outros caracteres exclusivos do grupo, tais como: (i) a ausência de íntrons em quase todos os genes codificadores de proteínas (Siegel et al., 2010) (ii) perda do controle pré-transcricional da expressão gênica de genes transcritos pela RNA polimerase II. A expressão gênica nesse grupo é feita através de grandes transcritos policistrônicos, que são posteriormente processados pela realização de trans-splicing, por intermédio do transcrito Spliced Leader (SL) (Vanhamme & Pays, 1995), (iii) a presença de modificações nucleotídicas nunca observadas, tal como a beta-D-glicosil-hidroxi-metil-uracila, ou base J, derivada da base pirimidínica timina (Borst & van Leeuwen, 1997), (iv) intensa edição de transcritos mitocondriais por inserções e deleções de uracila (Sloof & Benne, 1993); e (v) a compartimentalização da glicólise (Hannaert et al., 2003).

Dentre os cinetoplastídeos, a evolução do parasitismo ocorreu em pelo menos quatro eventos independentes, sendo que um deles está associado à divergência dos tripanossomatídeos. O ancestral dos tripanossomatídeos provavelmente era um parasito de insetos, do qual divergiram grupos monoxênicos de parasitos de insetos e grupos heteroxênicos de parasitos, que alternariam entre hospedeiros insetos e vertebrados (ou plantas). No caso dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, especula-se que o ancestral destes parasitos era um parasito de inseto hematófago, que entrou acidentalmente na corrente sanguínea de um animal vertebrado, sobreviveu dentro deste hospedeiro e cujos descendentes foram capazes de alternarem entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Simpson et al., 2006). Protozoários

do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* possuem particular significância médica, por conterem várias espécies que parasitam humanos. *Leishmania* spp, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* são os agentes etiológicos da leishmaniose, que atualmente acomete 150 milhões de pessoas; da doença do sono, que atinge aproximadamente de 50 a 70 mil pessoas e da doença de Chagas, que afeta cerca de 8 milhões de pessoas, respectivamente. Juntas, essas doenças são responsáveis por 110 mil mortes por ano (WHO, <http://www.who.int/topics/en/>).

A estratégia de sobrevivência destes parasitos ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro é baseada principalmente na alta variabilidade genética e antigênica expressas, sobretudo, através das proteínas de superfície. A geração da diversidade genética e antigênica, entre os tripanossomatídeos, é promovida por diferentes vias de metabolismo do DNA. No *Trypanosoma* africano, isso pode ser exemplificado pelo repertório de mais de 1600 variantes de genes codificadores das glicoproteínas VSGs (*Variant Surface Glycoproteins*) e pela troca periódica da expressão de uma única proteína, expressa em toda a superfície do parasito. A troca da variante, que será expressa na superfície do parasito, pode ser realizada por recombinação homóloga, de modo que a sequência codificadora da VSG a ser expressa é copiada no único sítio ativo de expressão de VSGs, substituindo a ORF da variante predecessora. Dessa forma, o parasito consegue evadir da resposta imune do hospedeiro vertebrado, mediada por anticorpos específicos para seus antígenos de superfície (Alford et al., 2009). O *T. cruzi* não usa a estratégia de troca de expressão de VSGs, para a evasão do sistema imune do hospedeiro. Em vez disso, esse parasito possui um repertório variado de moléculas de superfície altamente polimórficas, que podem aumentar a taxa de sucesso no processo de invasão e sobrevivência, dentro do organismo do hospedeiro. A origem de alelos altamente polimórficos também poderia ser atribuída, neste caso, a processos do metabolismo de DNA, tais como a conversão gênica e a ineficiência do reparo de erros de pareamento (Machado et al., 2006).

Com isso, o foco principal do nosso objeto de pesquisa são as vias de reparo de DNA, que atuam na manutenção da integridade genômica nestes parasitos, além de estarem associadas aos mecanismos de adaptação ao estilo de vida parasitário. Envolvendo as vias de reparo, também é de nosso interesse investigar sobre os mecanismos de sinalização na presença de

danos no material genético e quais as decisões tomadas por estas células, após as lesões no DNA serem detectadas, ou seja, aprofundar o conhecimento sobre as vias de resposta a danos no DNA nestes parasitos. Esta tese é subdividida em três capítulos, sendo que o primeiro discute as diferenças na resposta a danos no DNA, entre duas formas distintas do ciclo de vida do *T. brucei*, sendo que uma é especializada em sobreviver na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, e a outra é derivada do inseto vetor. O segundo capítulo aborda a via de reparo por excisão de nucleotídeos em *T. brucei*, e como esta foi modificada em função da transcrição policistrônica realizada por este organismo. No terceiro e último capítulo, avaliamos a influência da proteína Asf1A no reparo e na resposta a danos no DNA em *T. cruzi* e *L. major*. Juntos, estes três projetos visam entender o funcionamento das vias de metabolismo de DNA nestes parasitos, assim como a evolução dessas vias e como elas contribuem para o estabelecimento da relação destes parasitos com seus respectivos hospedeiros.

# Capítulo 1: A resposta a danos no DNA em *T. brucei* é diferencialmente regulada ao longo do seu ciclo de vida

## 1.1 Introdução

O processo de diferenciação, que ocorre durante o ciclo de vida do *T. brucei*, envolve profundas modificações na regulação de vários processos celulares deste parasito, tais como o controle da expressão gênica, o remodelamento da cromatina e o controle do ciclo celular (Kramer, 2011). A modificação de alguns desses processos, entre as formas evolutivas do parasito, poderia também implicar em uma resposta diferencial ao estresse genotóxico, ao longo do ciclo de vida do *T. brucei*. Dessa forma, abordaremos neste capítulo os mecanismos empregados por duas formas diferentes do parasito, durante a resposta a danos no DNA (DDR), enfatizando o papel das vias de reparo de DNA nesse contexto.

O *T. brucei* apresenta um ciclo de vida complexo que passa por hospedeiros vertebrados mamíferos, incluindo humanos, animais domésticos, ou da fauna silvestre, e hospedeiros invertebrados do gênero *Glossina*, conhecidos como mosca tsé-tsé (Figura 1.1). Nos hospedeiros vertebrados, o *T. brucei* encontra-se principalmente sob a forma sanguícola e replicativa, morfológicamente caracterizada por um formato mais alongado e delgado, contrastando-se com a forma não replicativa, de formato encurtado e grosso, capaz de infectar o hospedeiro invertebrado. No trato digestivo do hospedeiro invertebrado, a forma sanguícola não replicativa diferencia-se na forma procíclica.

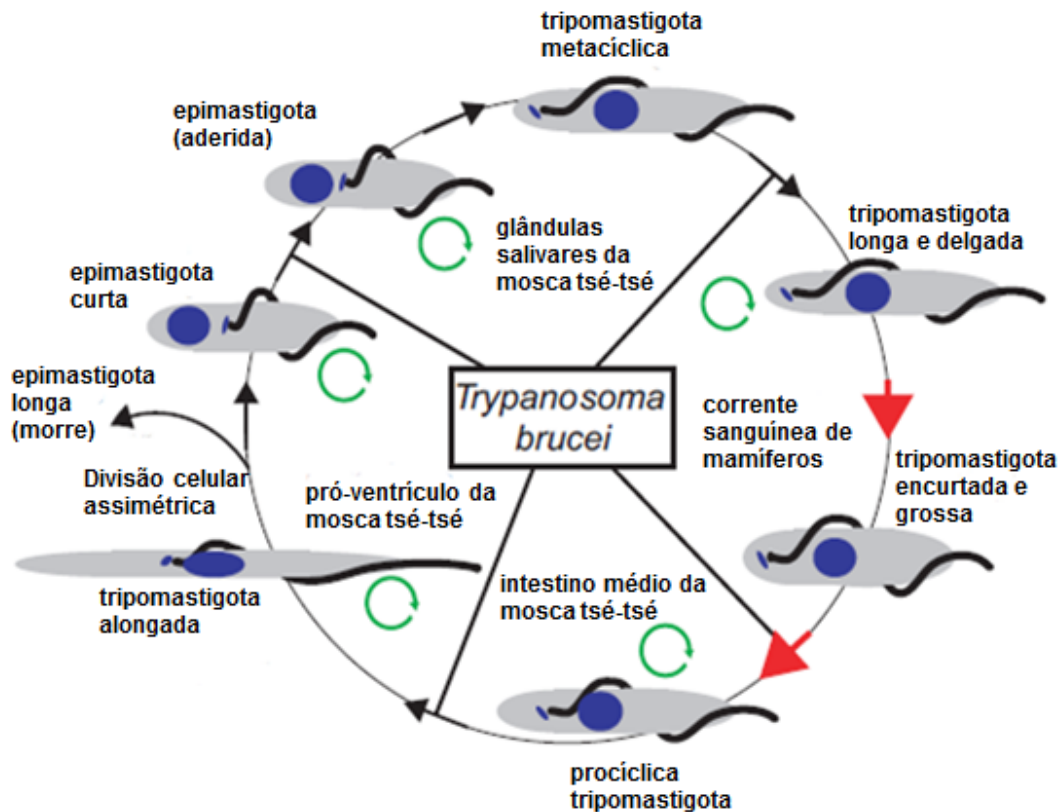


Figura 1.1: Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. O parasito se divide sob a forma tripomastigota sanguínea longa e delgada, na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Em condições de alta parasitemia, essa forma se diferencia na tripomastigota sanguínea encurtada e grossa, que permanece quiescente na fase G1/G0 do ciclo celular. A forma encurtada e grossa é então transmitida para o intestino médio da mosca tsé-tsé, juntamente com o sangue ingerido pelo inseto, onde irá diferenciar-se na forma procíclica. A forma procíclica troca a cobertura de VSGs (*Variant Surface Glycoproteins*) por uma cobertura de prociclinas. Além disso, o metabolismo energético da forma procíclica é sustentado principalmente pela fosforilação oxidativa, ao passo que a forma sanguínea é quase que exclusivamente dependente da glicólise. Em seguida, a forma procíclica migra para o pró-ventrículo, cresce em comprimento e divide-se assimetricamente, originando formas epimastigotas curtas e longas. Estas últimas não são capazes de continuar o ciclo de vida, porém as primeiras migram para as glândulas salivares, se aderem às células epiteliais do hospedeiro e continuam se dividindo. As formas epimastigotas aderidas são as únicas formas do parasito capazes de realizarem trocas genéticas via meiose. Elas possuem as proteínas BARP (*Brucei Alanine Rich Protein*) na superfície celular, que são trocadas por VSGs, quando estas se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica. As formas tripomastigotas metacíclicas são transmitidas para o hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor. Todas as formas replicativas do parasito são indicadas pelas setas verdes encurvadas. Modificado de Kramer, 2012.

Esta, por sua vez, migra para as glândulas salivares da mosca, onde se diferenciara na forma epimastigota, que após mais uma etapa de diferenciação, originará a forma tripamastigota metacíclica, infectante para os hospedeiros vertebrados (Kramer, 2012).

A resposta a danos no DNA (*DNA Damage Response*, DDR) envolve uma rede de proteínas responsáveis pela detecção do dano no DNA, amplificação dos sinais químicos que surgem em resposta a esse dano e na coordenação dos mecanismos efetores que resultarão a partir desse processo. A presença de danos no DNA induz a modificação da estrutura da dupla hélice e/ou da cromatina associada aos sítios de lesão. Tais modificações da cromatina levam à ativação de proteínas responsáveis pela detecção do dano no DNA. Dependendo da natureza química das lesões no DNA, existem duas principais vias de transdução de sinais, uma dependente de ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3 Related), e outra de ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). ATR está muito associada à presença de quebras duplas e é recrutada ao sítio de lesão pelos complexos 9-1-1 e Rad17-RFC. Já ATM, possivelmente é recrutada pelo complexo MRX (Rad50-Mre11-NBS1). A ativação de ATR e ATM leva à fosforilação de proteínas centrais à resposta a danos no DNA, CHK1 e CHK2. CHK1 e CHK2, por sua vez, regularão os mecanismos efetores da DDR, promovendo a modulação de funções celulares relacionadas a vias de apoptose, reparo de DNA, parada do ciclo celular e remodelamento da cromatina (Zhou & Bartek, 2004). Dentre os mecanismos efetores da DDR, enfatizaremos neste trabalho as vias de reparo de DNA presentes no *T. brucei*.

### **1.1.1 Reparo de DNA em *T. brucei***

O sequenciamento do genoma desse parasito revelou a presença de grande parte dos genes das principais vias de reparo de DNA, indicando que o mesmo é capaz de realizar a maioria delas (Berriman et al., 2005). Entretanto, das vias de reparo de DNA identificadas neste organismo, descreveremos a seguir apenas aquelas que consideramos serem mais relevantes para este trabalho, com exceção do reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que será detalhadamente descrito no próximo capítulo. Dessa forma, abordaremos algumas informações

sobre as vias de reparo por excisão de bases (BER), reparo de quebras duplas (DSBR) e síntese translesão (TLS) presentes no *T. brucei*, comparando-as com as respectivas vias presentes em *T. cruzi* e *L. major*.

### 1.1.1.1 Reparo por excisão de bases (BER)

O BER é responsável pela remoção de bases nitrogenadas danificadas e de quebras simples no arcabouço açúcar-fosfato, assim como pelo reparo de sítiosapurínicos/apirimidínicos (sítios APs). Esta via de reparo, por sua vez, é subdividida em uma via curta (*short-patch* BER) e uma via longa (*long-patch* BER) (Parsons & Dianov, 2013). A via curta, responsável pelo reparo de 80% das lesões removidas pelo BER (Dianov & Parsons, 2007), consiste em cinco etapas principais: (i) clivagem da ligação N-glicosídica, liberando a base nitrogenada danificada do arcabouço açúcar-fosfato e gerando um sítio abásico (Parsons & Dianov, 2013) (ii) clivagem a 5' do sítio abásico pela enzima APE-1 (Robson & Hickson, 1991, Demple et al., 1991) (iii) remoção do motivo de desoxirribose-fosfato, pela DNA polimerase  $\beta$  (iv) inserção do desoxirribonucleotídeo correto no sítio de reparo, catalisada pela própria DNA polimerase  $\beta$  (Matsumoto & Kim, 1995, Sobol et al., 1996) (v) ligação da quebra remanescente no arcabouço açúcar-fosfato pela ação da DNA ligase III, em conjunto com a proteína XRCC1 (Kubota et al., 1996). Os produtos gerados pela ação da APE1, resistentes à clivagem pela DNA polimerase  $\beta$  são endereçados à via longa do BER (Parsons & Dianov, 2013), onde 2 a 13 nucleotídeos são incorporados pelas DNA polimerases  $\delta/\epsilon$  (Frosina et al., 1996), o que resulta na formação de uma estrutura conhecida como *flap* (ou *aba*), que posteriormente é removida pela enzima FEN1. Em seguida, a DNA ligase I corrige a quebra na cadeia de açúcar-fosfato (Kim et al., 1998), de maneira dependente de PCNA (D'Amours et al., 1999). Outras proteínas que possuem um papel importante no BER são as poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs), que sinalizam a presença de quebras simples no DNA, através da poli (ADP-ribosilação) de várias proteínas da cromatina (Huber et al., 2004). A PARP-1 teria um papel chave na regulação do BER, ao se ligar aos produtos gerados pela APE1, protegendo-os da ação de endonucleases, ou evitando que tais quebras simples induzam a formação de quebras



duplas, pelo colapso da forquilha de replicação, antes que ocorra a finalização do BER (Parsons et al., 2005, Woodhouse et al., 2008).

O *T. brucei*, assim como o *T. cruzi* e a *L. major*, possui as enzimas necessárias para que o BER funcione normalmente (Ivens et al. 2005; El-Sayed et al. 2005; Berriman et al. 2005). Além disso, a ação do BER, durante o reparo de bases oxidadas, foi experimentalmente observada em *T. cruzi* (Cabrera et al., 2011). Nesse parasito, o reparo de uracilas ocorre preferencialmente pela via curta do BER (Pena-Diaz et al., 2004). Das glicosilases pertencentes ao BER, as uracil DNA glicosilases (UNGs) de *T. brucei* e de *T. cruzi* foram identificadas e caracterizadas. Devido à perda de homólogos para SMUG1, MBD4 e TGD, a remoção de uracilas no DNA destes parasitos é atribuída exclusivamente às UNGs (Pena-Diaz et al., 2004, Castillo-Acosta et al., 2012). Nenhuma atividade de uracil glicosilase foi detectada nos extratos protéicos da linhagem de *T. brucei*, nocaute para TbUNG, evidenciando o papel exclusivo desta glicosilase no reparo de uracilas deste parasito. Além disso, a ausência de UNG em *T. brucei* proporciona um fenótipo mutador, cuja frequência de mutações é cerca de seis vezes maior que a frequência apresentada pela linhagem controle (Castillo-Acosta et al., 2012). Também foi mostrado que *T. cruzi* possui um ortólogo funcional da glicosilase OGG1, que atua no reparo de 8-oxoguanina, tanto no DNA nuclear, quanto no kDNA (Furtado et al., 2012). Em relação à APE1 de *T. brucei*, foi visto que a ausência desta proteína resultou em sensibilidade aos agentes indutores de sítio abásico e quebra dupla, metotrexato e fleomicina, embora não tenha aumentado a sensibilidade do parasito a MMS (Charret et al., 2011). Entretanto, em *T. cruzi* e *L. major*, esta enzima está envolvida com resistência a agentes oxidantes e alquilantes, sendo capaz de complementar eficazmente *Escherichia coli* deficiente em AP endonuclease (Perez et al., 1999, Gallego et al., 2005, Vidal et al., 2007). Quanto às DNA polimerases, foi demonstrado que as DNA polimerases  $\beta$  (Pol $\beta$ ) de *T. cruzi* e *T. brucei* localizam-se no cinetoplasto do parasito e apresentam atividade de DNA polimerase e 5'dRP liase (Saxowsky et al., 2003, Lopes Dde et al., 2008, Venegas et al., 2009). A localização destas polimerases no cinetoplasto reflete a necessidade de um mecanismo especial para a replicação da complexa estrutura do kDNA. Além da Pol $\beta$ , os tripanossomatídeos ainda contam com mais cinco outras DNA polimerases (Pol  $\kappa$ , Pol  $\beta$ -PAK, PolI B, PolI C e PolI D), para replicarem o kDNA, enquanto que nos demais eucariotos a duplicação do genoma mitocondrial é realizada apenas pela DNA polimerase gama

(Pol  $\gamma$ ) (Bruhn et al., 2011). Atribui-se a Pol $\beta$  e Pol $\beta$ -PAK as funções de processamento dos fragmentos de Okazaki e de preenchimento dos *gaps*, durante os estágios finais da replicação do minicírculo (Saxowsky et al., 2003). Além disso, foi descrito que a Pol $\beta$  de *T. cruzi* atua no reparo de bases oxidadas, de modo que a superexpressão desta polimerase aumenta a resistência do parasito ao tratamento com peróxido de hidrogênio, além de diminuir a quantidade de 8-oxoguanina no kDNA (Schamber-Reis et al., 2012). Entretanto, a Pol $\beta$  de *L. infantum*, cuja capacidade de polimerização de DNA também foi constatada, possui localização nuclear, diferindo do padrão de localização das DNA polimerases  $\beta$  encontrado nos outros tripanosomatídeos (Taladriz et al., 2001). Por fim, a ação das proteínas PARP e PARG também foi descrita em *T. cruzi*. Esta última catalisa a hidrólise das poli (ADP-riboses) adicionadas pela PARP, modulando a sinalização de danos no DNA via poli (ADP-ribosilação). Neste estudo, foi descrito que, dependendo do tipo de dano ocorrido no DNA, diferentes grupos de proteínas são modificados por essas enzimas, induzindo nesse parasito, mecanismos distintos de morte celular (Vilchez Larrea et al., 2010).

#### **1.1.1.2 Reparo de quebras duplas (DSBR)**

O reparo de quebras na fita dupla do DNA é realizado por duas vias distintas principais: a recombinação homóloga (HR), que utiliza a informação contida em sequências homólogas, para ressintetizar o DNA no sítio da quebra dupla; e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ - *Non homologous end-joining*), que une as extremidades da quebra dupla, independentemente da homologia existente entre as sequências envolvidas. Além destas duas vias principais, uma terceira via foi recentemente descrita entre os eucariotos, cuja principal característica é a junção das extremidades de uma quebra dupla que contém pequenos trechos de homologia. Tal via de reparo foi denominada de junção de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ - *Microhomology-mediated end-joining*) (Symington & Gautier, 2011). Entre estas três diferentes vias, a recombinação homóloga é a que apresenta menor propensão a erros, sendo que os produtos gerados pelas outras duas vias geralmente apresentam pequenos trechos de deleção. Além disso, a junção de extremidades não homólogas ou com

pequenos trechos de homologia pode resultar em translocações e inverções, levando à instabilidade cromossômica (Symington & Gautier, 2011).

Em tripanossomatídeos a recombinação homóloga é a via predominante do reparo de quebras duplas, correspondendo a 85% dos eventos de reparo de quebra dupla única, induzida pela endonuclease I-*Sce1* e analisada na região próxima ao telômero do cromossomo 11 (Glover et al., 2008). De acordo com vários estudos sobre a recombinação homóloga, realizados nos principais organismos modelo, esta via inicia-se pela ressecção das extremidades da quebra dupla pelo complexo MRN (MRE11, Rad50 e Nbs1) (Huertas, 2010). Os segmentos de fita simples então formados são reconhecidos pela Rad51, que inicia o processo de busca por sequências homólogas. A inserção da fita simples, associada à Rad51, no duplex de DNA homólogo, leva à formação de uma estrutura conhecida como D-loop. A extremidade 3'-OH livre do D-loop é então estendida por uma DNA polimerase. A partir dessa etapa, a recombinação homóloga pode seguir por diferentes subvias, que resolvem por maneiras diversas as estruturas formadas após a extensão do D-loop (San Filippo et al., 2008, Chapman et al., 2012).

Entre as proteínas envolvidas com a ressecção das extremidades da quebra dupla, foi descrito que cepas de *T. brucei*, nocautes para MRE11, possuem deficiência no reparo por recombinação homóloga, apresentando maior sensibilidade a danos no DNA, além de maior frequência de rearranjos cromossômicos (Robinson et al., 2002, Tan et al., 2002). No entanto, MRE11 não contribui para a recombinação ocorrida durante o processo de troca de VSGs (Robinson et al. 2002).

Já em relação à etapa de sinapse, ou seja, da inserção da fita simples associada à Rad51 no duplex homólogo correspondente, foram realizados diversos estudos de caracterização da recombinase Rad51 em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. A proteína Rad51 desempenha um papel central, durante o processo de troca de VSGs, em *T. brucei* (McCulloch & Barry, 1999). Além disso, essa proteína está associada, neste parasito, ao reparo de quebras duplas, mediado por

recombinação homóloga, durante as fases S e G2 do ciclo celular (Glover et al., 2008). O mRNA de Rad51 pode ser detectado nas três formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo duas vezes mais abundante na forma amastigota. Os níveis do mRNA de TcRad51 aumentam após a irradiação gama. Além disso, parasitos superexpressando TcRad51 retomam o crescimento, após irradiação gama, mais rapidamente do que a população controle. A retomada de crescimento acelerada, observada no superexpressor de TcRad51, após irradiação gama, é acompanhada pela maior eficiência de reconstituição de suas bandas cromossômicas. Deste modo, tais evidências também apontariam para a participação da Rad51 de *T. cruzi* no reparo de quebras duplas induzidas por irradiação gama (Regis-da-Silva et al., 2006). A Rad51 de *L. major* possui atividade ATPásica, estimulada pela ligação ao DNA. A atividade ATPásica de Rad51, também descrita em outros organismos, é importante para que esta proteína se desligue de fitas simples, já em processo de sinapse, e seja reciclada para futuras reações de recombinação (San Filippo et al., 2008). O mRNA da LmRad51 foi detectado somente após a exposição deste parasito à fleomicina, indicando o papel desta recombinase no reparo de quebras duplas também em *L. major* (McKean et al., 2001).

Algumas das proteínas mediadoras de recombinação homóloga, cuja função é controlar o carregamento de Rad51 nos fragmentos de fitas simples (San Filippo et al., 2008), foram caracterizadas em *T. brucei*. Entre elas, citaremos algumas das informações descritas sobre Rad52, BRCA2, Rad51-3 e Rad51-5. Tripanossomatídeos não possuem homólogos para Rad52 (Passos-Silva et al., 2010), uma proteína cuja função é essencial para a recombinação em levedura (San Filippo et al., 2008). Entranto, em camundongo, a deleção de Rad52 causa somente um impacto moderado na HR, além de não conferir sensibilidade à radiação ionizante (Rijkers et al., 1998). A função de Rad52, como mediadora de recombinação homóloga, poderia ser realizada, paralelamente, por BRCA2 (Feng et al., 2010). Isso estaria coerente com as observações de que levedura não possui homólogos para BRCA2 (San Filippo et al., 2008) e que a inativação de Rad52 é letal em células humanas deficientes em BRCA2 (Feng et al., 2010). BRCA2 interage com Rad51, através de suas repetições BRC (Shivji et al., 2009) e sequências não relacionadas. BRCA2 de *T. cruzi* e *L. major* possuem duas repetições BRC, enquanto que a BRCA2 de *T. brucei* possui 15 destas repetições (Hartley & McCulloch, 2008). Tais repetições são essenciais para que a recombinação homóloga ocorra de maneira eficiente,

uma vez que elas estão associadas à correta localização de Rad51 no sítio de reparo de quebras duplas. Em ambas as formas de *T. brucei*, a quantidade de foci de Rad51, após o tratamento com fleomicina, é diretamente proporcional ao número de repetições BRC presentes em BRCA2. Parasitos da forma sanguícola do *T. brucei*, mutantes para BRCA2, apresentam instabilidade genômica, divisão celular aberrante e diminuição da variação antigênica. Entretanto, este fenótipo não se reproduz na forma procíclica do parasito (Trenaman et al., 2012). *T. brucei* e *T. cruzi* apresentam quatro parálogos para Rad51, enquanto que em *L. major* um deles está ausente. Cepas nocautes para Rad51-3 e Rad51-5, em *T. brucei*, apresentam deficiência tanto no reparo de DNA, quanto na integração de DNA exógenos. Além disso, o parasito nocaute para Rad51-3 também apresenta menor frequência de troca de VSGs (Proudfoot & McCulloch, 2005).

Entre as proteínas que atuam após a extensão do D-loop, foi proposto que *T. brucei* possui um mecanismo homólogo ao de levedura e humanos, responsável por controlar a formação de *crossovers*, entre as estruturas intermediárias da recombinação. Parasitos nocautes para a topoisomerase TbTopo3 $\alpha$  possuem um fenótipo hiperrecombinogênico, apresentando maiores frequências, tanto de troca de VSGs, mediada por conversão gênica, quanto de *crossovers*, ocorridos dentro da região que contém a VSG (Kim & Cross, 2010).

A via de recombinação homóloga mitótica pode exercer um papel relevante na biologia do parasito, através da homogeneização dos alelos e na formação de híbridos (Machado et al. 2006). Paralelamente, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* são dotados de DMC1, uma recombinase específica para meiose. Em *T. brucei*, a ausência dessa proteína não afeta o reparo realizado por HR ou a troca de VSGs (Proudfoot & McCulloch, 2006). A presença de uma recombinase meiótica, em organismos que se reproduzem majoritariamente por fissão binária, indicaria a ocorrência, nestes parasitos, de eventos de troca genética associados à meiose. Vários estudos demonstraram a ocorrência de troca genética entre populações de *T. brucei* (Tait, 1980, Gibson et al., 2008), *T. cruzi* (Bogliolo et al., 1996, Carrasco et al., 1996, Gaunt et al., 2003) e *L. major* (Kelly et al., 1991). Além disso, foram descritas recentemente evidências de meiose em *T. brucei*. Formas epimastigotas morfologicamente distintas, presentes nas glândulas salivares da

mosca tsé-tsé, apresentam expressão das proteínas de meiose DMC1, MND1 e SPO11. A expressão dessas proteínas, em *T. brucei*, ocorre antes dos eventos de troca genética (Peacock et al., 2011).

No NHEJ, as extremidades da quebra são protegidas pelo dímero Ku70/Ku80 da ação de nucleases que promoveriam a etapa inicial da recombinação homóloga (Huertas, 2010). A permanência desse dímero, nas extremidades da quebra dupla, promove o recrutamento de uma série de proteínas; entre elas a XRCC4, DNA Ligase IV e XLF; responsáveis pelo processamento e ligação destas extremidades (Davis & Chen, 2013). A ausência de alguns dos elementos chave do NHEJ no genoma dos tripanossomatídeos sugere que esta via não esteja presente nestes organismos (Passos-Silva et al., 2010). Corroborando com esta hipótese, através do sequenciamento dos produtos derivados do reparo de uma única quebra dupla, induzida pela endonuclease *I-Sce1*, não foi evidenciada nenhuma atividade relacionada ao NHEJ (Glover et al., 2008, Glover et al., 2010). A função das proteínas Ku70/80 em *T. brucei*, que supostamente participariam do NHEJ, estaria mais relacionada à manutenção dos telômeros, já que os parasitos nocautes para estes genes não apresentam maior sensibilidade ao estresse genotóxico (Burton et al., 2007, Conway et al., 2002).

O reparo de quebras duplas mediado por microhomologia também foi detectado em *T. brucei*, após a indução de quebra dupla pela enzima *I-Sce1*. Os trechos de homologia de sequência, necessários para que este tipo de reparo ocorra, variam de 5 a 20 pares de bases, com vários erros de pareamento tolerados entre os trechos mais longos. Tais trechos também apresentam maior conteúdo GC. Este tipo de reparo resulta na deleção de cerca de 280 nucleotídeos, sendo que a maior parte dos eventos ocorre independentemente de Rad51. Deste modo, o MMEJ representaria uma via alternativa à HR, inclusive durante o processo de troca de VSGs (Glover et al., 2010).

### 1.1.1.3 Síntese translesão

A via de síntese translesão não é propriamente uma via de reparo de DNA, mas, pelo contrário, ela é um mecanismo de tolerância a lesões no DNA. Essa via possui a função de promover a sobrevivência da célula, ao transpassar o bloqueio da forquilha de replicação causado pela presença de danos no DNA. As lesões no DNA que escapam da maquinaria de reparo bloqueiam a passagem das DNA polimerases replicativas delta e épsilon (Pol $\delta$  e Pol $\epsilon$ , respectivamente). A parada da forquilha de replicação leva à monoubiquitinação do PCNA, pela ação das proteínas Rad6 e Rad18. Com isso, ocorre a troca das DNA polimerases replicativas por DNA polimerases de síntese translesão, que catalisam a inserção de nucleotídeos frente à lesão. Em seguida, a DNA polimerase zeta (Pol $\zeta$ ) ou a kapa (Pol $\kappa$ ) realizariam a extensão dos nucleotídeos pareados com as lesões. Por fim, ocorre o retorno das DNA polimerases replicativas para a forquilha de replicação (Lehmann et al., 2007).

*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* são dotados de vários componentes da via de síntese translesão. As DNA polimerases de síntese translesão Pol $\kappa$ , Pol $\eta$ , Rev1 e Pol $\zeta$  são encontradas nestas espécies, além do PCNA e de um homólogo de Rad6 (Passos-Silva et al., 2010). A DNA polimerase eta (Pol $\eta$ ) de *T. cruzi* é capaz de inserir nucleotídeos frente a lesões causadas por UV e 8-oxoguanina. Além disso, também foi descrito que essa DNA polimerase localiza-se no núcleo do parasito (de Moura et al., 2009). O número de cópias de Pol $\kappa$  varia entre os tripanossomatídeos, de modo que *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* apresentam, respectivamente, 10, 2 e 3 cópias (Passos-Silva et al., 2010). Uma das cópias de Pol $\kappa$  em *T. cruzi* possui localização mitocondrial (Rajao et al., 2009), enquanto a outra se apresenta no núcleo do parasito (Rajao, Tese de Doutorado). A Pol $\kappa$  mitocondrial realiza síntese translesão *in vitro*, através de 8-oxoguanina, e provavelmente *in vivo*, já que a superexpressão desta proteína aumenta a resistência do parasito a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, parasitos superexpressores de Pol $\kappa$  mitocondrial retomam o crescimento mais rapidamente, quando comparados à linhagem selvagem, após a irradiação gama. Este fenótipo é associado à capacidade da Pol $\kappa$  mitocondrial de *T. cruzi* em extender, *in vitro*, um análogo de D-loop (Rajao et al., 2009). A TLS desempenha

um papel na síntese de DNA, através de moldes contendo lesões que bloqueiam a forquilha de replicação, resgatando, dessa forma, a célula da morte. Isso explicaria o aumento da sobrevivência das populações de *T. cruzi* superexpressando Polk e Pol $\eta$ , quando expostos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim como explicaria a maior tolerância a agentes que causam DSBs, observada apenas na cultura superexpressora de Polk. TcPolk e TcPol $\eta$  também estão envolvidas com os mecanismos de resistência ao benznidazol, a droga quimioterápica utilizada para o tratamento da Doença de Chagas. Tais enzimas promoveriam a síntese de DNA, através de nucleotídeos oxidados no pool, pela ação da droga, e incorporadas no DNA durante a replicação. Além disso, a Polk realizaria síntese de DNA, durante o reparo por recombinação homóloga, das quebras duplas derivadas de estruturas intermediárias do BER (Rajao et al., submetido).

Se por um lado a síntese translesão promove a sobrevivência das células que contêm lesões no DNA, por outro lado, esta via aumenta a mutagenicidade associada à replicação, já que as DNA polimerases de síntese translesão operam de maneira propensa a erros. A mutagenicidade associada a erros da replicação poderia, dessa forma, assumir um papel importante no processo de adaptação destes parasitos em seus respectivos hospedeiros.

### **1.1.2 Outros processos relacionados à sobrevivência celular e manutenção da estabilidade genômica**

As vias de reparo de DNA estão inseridas dentro de um contexto mais amplo, ao considerarmos os outros processos celulares relacionados à sobrevivência celular e à manutenção da estabilidade genômica, na presença de estresse genotóxico. Entre esses processos, trataremos dos mecanismos de destoxificação, que influenciam diretamente na concentração e no acesso do agente genotóxico ao material genético. Dentre os mecanismos de destoxificação, descreveremos brevemente o sistema de bombeamento de drogas e o metabolismo de peróxido, presentes no *T. brucei* e demais tripanossomatídeos.



Os membros da família de proteínas ABC (*ATP Binding Cassete*), presentes em todos os reinos dos organismos vivos, estão envolvidos com o transporte de uma ampla diversidade de substratos, que variam desde pequenos íons até moléculas relativamente grandes de polipeptídeos e polissacarídeos. Por muitos anos, o papel dessas proteínas foi intensamente estudado, devido à importância das mesmas para os mecanismos de resistência a drogas. As proteínas ABC estão presentes em vários parasitos protozoários, incluindo os tripanossomatídeos. Tais proteínas estariam envolvidas nos mecanismos de resistência, apresentados por esses organismos, às principais drogas utilizadas no tratamento das protozooses que eles causam em humanos e animais. Os membros da família ABC, de ABCA a ABCH, estão presentes nos tripanossomatídeos, sendo encontrados 42 genes ABC em *Leishmania* spp, 22 em *T. brucei* e 28 em *T. cruzi*. A maior quantidade dos genes ABC vista em *Leishmania* spp é atribuída à expansão de ABCA, ABCC e ABCG (Sauvage et al., 2009). Foi demonstrado que o transportador ABCC3 é superexpresso em cepas de *Leishmania infantum* resistentes a drogas antimoniais, cujas ações leishmanicidas estão bem caracterizadas (Leprohon et al., 2006). Além disso, foi observado em *T. brucei* que a superexpressão de ABCC2 induz 10 vezes mais resistência a melarsoprol, uma das drogas aprovada para o tratamento da tripanossomíase africana em estágio avançado (Luscher et al., 2006, Delespaux & de Koning, 2007).

Os tripanossomatídeos possuem um elaborado metabolismo direcionado para a eliminação de peróxido. Foram identificadas nestes organismos três famílias de peroxidases: 2-cisteína peroxiredoxina, glutathione peroxidases sem selênio e ascorbato peroxidases. Estas enzimas possuem a peculiaridade de utilizarem, como substrato redutor, os derivados de tripanotiona, um ditiol encontrado exclusivamente nestes organismos (Castro & Tomas, 2008). Essas enzimas possuem papéis tanto redundantes, quanto complementares, no balanço redox destes parasitos, tornando-os competentes para lidarem com o dano causado por espécies reativas de oxigênio, mesmo que eles não apresentem alguns dos genes, amplamente compartilhados por outros organismos, como a catalase e a glutathione peroxidase (Ivens et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Berriman et al., 2005).

A existência de apoptose ou morte celular programada em eucariotos unicelulares, incluindo protozoários parasitos, permanece uma questão bastante controversa. Vários dos eventos que caracterizam morte celular por apoptose foram identificados nos tripanossomatídeos, tais como a diminuição do volume celular, a perda do potencial elétrico da membrana mitocondrial, a formação de corpos apoptóticos, a exposição de fosfatidilserina e a fragmentação do DNA (Reece et al., 2011, Proto et al., 2013, van Zandbergen et al., 2010). Entretanto, os mecanismos moleculares sinalizadores e efetores, que conduziriam o processo de morte celular programada, ainda não foram claramente definidos (Proto et al., 2013). A presença de tais indicadores de apoptose, observados em uma parcela de parasitos expostos a diversos tipos de estresses, sugere que pelo menos mais de um tipo de via de morte celular ocorre nestes organismos (Reece et al., 2011, Proto et al., 2013, van Zandbergen et al., 2010). Alguns autores denominam estes dois tipos de morte celular como morte celular programada, ou *apoptose-like*, pelo fato de que os parasitos apresentam os sinais clássicos de apoptose, presentes em eucariotos multicelulares, e morte acidental por necrose, em que tais sinais não estão presentes (van Zandbergen et al., 2010). Uma série de agentes foi descrita como causadores de morte, em tripanossomatídeos, por morte celular programada (Kaczanowski et al., 2011).

### 1.1.3 Por que estudar a DDR em tripanossomatídeos?

Duas características dos tripanossomatídeos que podem fazer com que a resposta a danos no DNA nestes organismos seja única seriam a perda do controle pré-transcricional da expressão gênica e a grande quantidade de variantes de histonas, quando comparados a outros organismos. Especula-se que a ampla diversidade de variantes de histonas, vista neste grupo divergente de eucariotos, esteja na verdade em função do modo ancestral de modular a expressão gênica na ausência de fatores de transcrição (Talbert & Henikoff, 2010).

A descrição de algumas das características das histonas em tripanossomatídeos, relacionadas à DDR, será realizada no último capítulo, onde a função destas proteínas, bem como das modificações pós-traducionais sofridas por elas, serão relacionadas à função da chaperona de histonas Asfl.

O controle da transcrição está muito associado à resposta a danos no DNA, já que alguns dos mecanismos efetores desta última baseiam-se na modificação dos níveis de RNAs mensageiros ou não codificadores relacionados ao estresse genotóxico. Esta relação é evidente aos considerarmos a importância do fator de transcrição p53 na resposta a danos no DNA em metazoários. Em *T. cruzi*, a modulação dos níveis de RNA em resposta à irradiação gama consiste em reprimir mRNAs relacionados ao metabolismo energético e à tradução, enquanto que os RNAs não codificadores, retrotransposons e proteínas de função indefinida constituem a maior parte dos RNAs cujos níveis encontram-se aumentados (Grynberg et al., 2012). Embora não seja óbvia a baixa representatividade dos genes de reparo nos mRNAs diferencialmente expressos, após dano no DNA, esse perfil de resposta é similar ao observado em levedura, refletindo um caráter comum na resposta ao estresse genotóxico, que consiste em reprimir a produção de proteínas e promover a atuação de RNAs não codificadores. É postulado que a ausência da indução massiva de genes de reparo, em condições de estresse genotóxico, esteja atribuída à necessidade imediata dessas proteínas na presença do dano, para que a célula possa lidar apropriadamente com as injúrias em seu material genético. Em levedura, a regulação das

vias de reparo durante a DDR estaria muito associada à degradação de proteínas pelo proteossomo, levando em consideração a alta representatividade de genes relacionados a essa via, cujos mRNAs são modulados após indução de dano no DNA (Fry et al., 2005).

O grau de complexidade da resposta a danos no DNA pode ser ainda maior ao considerarmos as diversas variáveis presentes dentro do mesmo organismo. Por exemplo, células de humanos originadas de tecidos diferentes apresentam diferenças na resposta a danos no DNA, assim como também são encontradas diferenças entre a DDR de culturas de levedura em fase logarítmica de crescimento e culturas em fase estacionária. Além disso, outros fatores, tais como a fase do ciclo celular e o tipo de lesão gerada podem influenciar nesse processo (Fry et al., 2005). Ao transferirmos esse raciocínio para o *T. brucei*, nos perguntamos se a resposta a danos no DNA neste parasito poderia ser regulada ao longo de seu ciclo de vida. Decidimos, então, comparar a resposta a danos no DNA, com ênfase no reparo de DNA, entre as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Análise comparativa da resposta a danos no DNA entre as formas procíclica e sanguícola do *Trypanosoma brucei*.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Quantificação do número de lesões e análise da cinética de reparo de DNA nos genomas nuclear e mitocondrial, após a indução de dano.

Determinação das taxas de sobrevivência e crescimento do parasito nos dois estágios do ciclo de vida, após tratamento com os agentes genotóxicos cisplatina, radiação ultravioleta, peróxido de hidrogênio e metilmetanosulfonato.

## 1.3 Material e Métodos

### 1.3.1 Cultivo dos parasitos

A cultura selvagen de formas procíclicas do *Trypanosoma brucei*, cepa Lister 427, foi cultivada a 27°C, em meio derivado semi-definido SDM-79 (Brun & Schonemberger, 1979), suplementado com 10% de soro fetal bovino, inativado pelo calor (Sigma) e 0,2% v/v de solução de hemina (Sigma) (2 mg/mL em NaOH a 0,2 M). Já as formas sanguícolas do *T. brucei*, cepa Lister 427, foram cultivadas a 37° C em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os parasitos foram mantidos em meio HMI-9 (Hirumi & Hirumi, 1989), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado por calor (SBF) (Sigma) e com 1% (v/v) de penicilina e estreptomicina (Sigma).

### 1.3.2 Curvas de crescimento das formas procíclica e sanguícola do *Trypanosoma brucei*, após o tratamento com agentes genotóxicos

Parasitos da forma sanguícola e procíclica do *T. brucei* foram cultivados até o fim da fase logarítmica de crescimento ( $1,5-3 \times 10^6$  células/mL para a forma sanguícola e  $1-2 \times 10^7$  células/mL para a forma procíclica), centrifugados a 2000 g, por 15 minutos a 4°C e ressuspendidos no mesmo volume da cultura original em PBS 1x.

No tratamento com radiação ultravioleta, as células da forma sanguícola do parasito, após serem ressuspendidas em PBS 1x, foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em um volume 10 vezes menor de tampão fosfato, já que a concentração de parasitos na cultura desta forma é ~10 vezes menor, quanto comparada à concentração de células da cultura de procíclicos. Em seguida, 5 mL de cada forma do parasito, ressuspendida em PBS 1x, foram

colocados em uma placa de Petri e expostos à luz ultravioleta, no Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene), sob as doses de 30, 60 e 120 J/m<sup>2</sup>. Depois de irradiadas, as células em PBS 1x eram novamente centrifugadas a 3000 g e 4°C, durante 15 minutos, e ressuspensas no mesmo meio de cultura em que estavam (meio condicionado). A contagem dos parasitos sobreviventes, em relação aos controles não tratados, foi realizada em câmara citométrica, em 4 horas após o tratamento. Após a contagem, as culturas foram diluídas 10 vezes e contadas a cada 24 horas, até atingirem a fase estacionária da curva de crescimento.

No tratamento com cisplatina, volumes suficientes de uma solução estoque dessa droga (50 mM de cisplatina dissolvida em dimetilformamida) foram adicionados às células ressuspensas, no mesmo volume da cultura original, em PBS 1x, de modo a obter as concentrações finais de 50, 100, 200 e 400 µM desse agente. Em seguida, as células eram incubadas por 1 hora, centrifugadas a 3000 g e 4°C, durante 15 minutos e, em seguida, eram ressuspensas em meio condicionado. A contagem dos parasitos sobreviventes, em relação aos controles não tratados, era feita em 4 horas após o tratamento. Após a contagem, as culturas eram diluídas 10 vezes e contadas a cada 24 horas, até atingirem a fase estacionária da curva de crescimento.

O protocolo empregado no tratamento com peróxido de hidrogênio e MMS foi o mesmo descrito para cisplatina. As doses do tratamento com peróxido de hidrogênio foram de 50, 100, 200 e 400 µM por 30 e 60 minutos, enquanto que as doses utilizadas para o tratamento com MMS foram de 0,5 e 1,5 mM por 1 hora.

### **1.3.3 Quantificação das frequências de lesões, nos genomas nuclear e mitocondrial, das formas sanguícola e procíclica do *Trypanosoma brucei*, através da técnica de PCR quantitativa**

O protocolo utilizado para a quantificação de lesões no DNA, através do método de PCR quantitativa, foi adaptado de Santos e colaboradores (Santos et al., 2006). A figura 1.2 ilustra os princípios gerais abrangidos por esta técnica, que serão detalhadamente descritos logo a seguir.

#### **1.3.3.1 Tratamento dos parasitos com os agentes genotóxicos**

O tratamento de ambas as formas do parasito com agentes genotóxicos foi realizado conforme descrito no item anterior. Após os tratamentos acima especificados, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas no volume original da cultura com meio condicionado. As alíquotas de parasitos não tratados, assim como as alíquotas de cultura da cinética de reparo após a indução de dano no DNA (0, 1, 2, 5, e 10 horas após os tratamentos genotóxicos) foram coletadas, centrifugadas a 3000 g e 4 °C, durante 15 min, e o *pellet* resultante, de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células, foi imediatamente congelado a -80 °C .

#### **1.3.3.2 Extração de DNA genômico dos parasitos**

A extração do DNA genômico foi realizada através do *kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen)*, através do protocolo adaptado para extração de DNA em tecidos, fornecido pelo fabricante. Dessa forma, foi possível a obtenção de preparações contendo uma mistura dos genomas nuclear e mitocondrial do *T. brucei*.



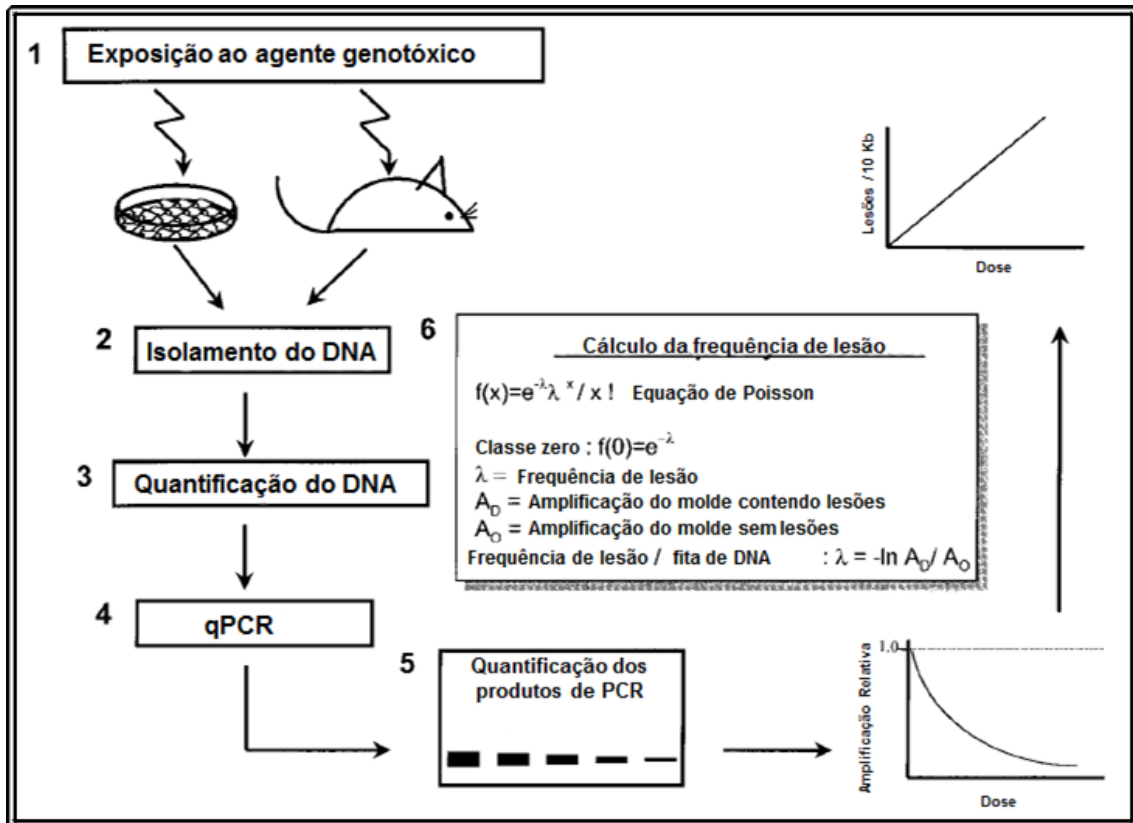


Figura 1.2: Desenho experimental da técnica de detecção de danos no DNA por PCR quantitativa. Após exposição ao agente genotóxico (1), o DNA da amostra de cultura ou tecido é isolado (2) e quantificado (3). Após amplificação (4), os produtos de PCR são quantificados e a partir das porcentagens relativas de amplificação obtidas nos grupos tratados, em relação ao controle não tratado, são calculadas as frequências de lesões por Kb. Os detalhes de cada um dos passos estão contidos no texto. Modificado de Ayala-Torres (Ayala-Torres et al., 2000).

### 1.3.3.3 Dosagem do DNA genômico

Primeiramente, foi realizada uma dosagem menos refinada, utilizando-se o aparelho *Thermo Scientific NanoDrop 2000*. Em seguida, as amostras foram diluídas para a concentração de 3 ng/μL, de acordo com a dosagem obtida pelo Nanodrop. Após serem diluídas, as amostras passaram por várias rodadas de dosagem, através de um sistema mais acurado, baseado no corante fluorescente específico para DNA dupla fita, obtido através do kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen)*. As leituras de fluorescência foram realizadas em placa de 96 poços no leitor de fluorescência *PerkinElmer precisely Envision 2102 Multilabel Reader*, utilizando-se os filtros FITC 485 para a excitação e FITC 535 para emissão. Após cada rodada, a concentração de cada uma das amostras foi corrigida, de modo a atingirem os valores mais próximos o possível de 3 ng/μL.

### 1.3.3.4 Reações de PCR

#### 1.3.3.4.1 Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores responsáveis pela amplificação dos fragmentos longo e curto (ver tabela 1) foi realizado a partir da análise da sequência do DNA genômico da cepa Lister 427 de *T. brucei*, disponível no banco de dados [www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org). O critério de escolha para o trecho analisado baseou-se na simples presença de sequências codificadoras dentro do mesmo. Escolhemos, para a análise do reparo de DNA no núcleo de *T. brucei*, um trecho presente no cromossomo 8 deste organismo, de aproximadamente 11 kpb, posicionado entre as ORFs Tb427.08.3290 e Tb427.08.3330 e amplificável através dos iniciadores qPCRf (5'-GTTGCTCACTTTTACCACGTATTCGGGAACCTGT-3') e qPCRr (5'-CCACTGAATGCTGTATCCGGCATTAGTCGTGTCTATGGG-3'). Para a amplificação do fragmento interno a esse trecho, de 204 pb, utilizamos os iniciadores qPCRfi (5'-TTACAGCACCCAGGTTTATACCGCACGAAAGTGG-3') e qPCRr. Já para as análises da

frequência de lesões e da cinética de reparo, no genoma mitocondrial do *T. brucei*, utilizamos o trecho compreendido entre as sequências codificadoras dos genes ND7 e ND4 no DNA do maxicírculo. Esse fragmento é amplificável pelos iniciadores MtF (5'-TAAGTACAAGAGGAGACAGACGACAGTGTCCACAGCAC-3') e MtR2 (5'-TCGAACGGCTCTTTCTCTCCAGT-3'). O fragmento interno a esse trecho foi amplificado através dos iniciadores MtFI2 (5'-CCAACACTCCATTCTGTTTCACACCGTGATTCTTCTC-3') e MtR2. Todos os iniciadores foram comprados da *Eurofins MWG Operon*.

#### 1.3.3.4.2 As reações de PCR

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empregadas nesta técnica devem necessariamente ser interrompidas no meio da fase logarítmica do processo de amplificação. Com isso, a relação da quantidade de DNA adicionado à reação deve ser diretamente proporcional ao total de amplificação obtido. Para garantir que durante todos os experimentos estávamos satisfazendo essa condição, fizemos o controle do 50%. Para esse controle de 50%, colocávamos a metade da quantidade de DNA utilizada no controle não tratado e esperávamos, assim, obtermos uma amplificação correspondendo de 40 a 60% da amplificação obtida no controle não tratado. Quando esta condição não era alcançada, as reações então obtidas eram descartadas.

As reações de PCR foram realizadas através do kit de amplificação *GeneAmp XL PCR* (*Applied Biosystems*), em que as mesmas foram otimizadas a partir de recomendações fornecidas pelo fabricante. Para cada reação, foram utilizados: XL Buffer II (tricina, K[OAc], glicerol de DMSO) 1x, B.S.A (albumina do soro bovino) a 100 µg/mL, 200 µM de dNTPs, 1,2 mM de Mg(OAc)<sub>2</sub>, 200 nM de cada primer, 15 ng do DNA genômico ressuspendido em T.E (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), 5µL do Mix Taq (3,13 µL de ddH<sub>2</sub>O, 1,36 µL de 3.3 XL Buffer II e 0,5 µL da rTth DNA polimerase, XL [2 u/µL]) e ddH<sub>2</sub>O q.s.p 50 µL. Para a amplificação do fragmento longo, utilizamos o programa de *hot start* por 1 minuto e 30

segundos, com desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto. Em seguida, eram realizados 20 e 22 ciclos, respectivamente, para os fragmentos do núcleo e da mitocôndria, com desnaturação a 94°C por 15 segundos e anelamento + síntese a 64°C por 12 minutos. Finalmente, as misturas de PCR eram incubadas a 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Para a amplificação do fragmento curto e interno, utilizamos o programa de *hot start* por 1 minuto e 30 segundos. As reações então seguiam com 22 e 21 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, respectivamente, para os fragmentos do núcleo e da mitocôndria. Finalmente, as amostras de PCR eram mantidas a 4°C por tempo indeterminado.

#### 1.3.3.4.3 Análise quantitativa das amplificações

As reações de PCR eram dosadas através do kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay* (Invitrogen). As leituras de fluorescência foram realizadas em placa de 96 poços no leitor de fluorescência *PerkinElmer precisely Envision 2102 Multilabel Reader*, utilizando-se os filtros FITC 485 para a excitação e FITC 535 para emissão. A partir do controle não tratado, obtínhamos as amplificações relativas referentes aos tratamentos então realizados. Vale ressaltar que os valores de fluorescência correspondentes aos controles “Branco” das reações de PCR eram subtraídos dos valores das amplificações. O número de lesões era então calculado através da equação  $D = -\ln AD/AC$ , baseada na “classe zero” da expressão de Poisson, onde D é o número de lesões, AD corresponde à amplificação obtida pelas amostras tratadas e AC equivale à amplificação obtida pelo controle não tratado. Todos esses cálculos foram realizados através do programa Microsoft Excel. Para as análises estatísticas referentes às comparações de eficiência de reparo, entre as diferentes formas do parasito, e entre os diferentes intervalos de tempo, após exposição a agentes genotóxicos, realizamos o teste *Two-Way* ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 6.0*.

## 1.4 Resultados

### 1.4.1 Comparação da resposta a danos no DNA entre as formas procíclica e sanguícola do *T. brucei*

O objetivo desta parte do trabalho é a comparação da resposta a danos no DNA e, especificamente, das eficiências de reparo entre as formas procíclica e sanguícola do *T. brucei*. Para isso, analisaremos o número de lesões em um trecho de 10 kbp do DNA nuclear e do DNA mitocondrial de ambas as formas desse parasito, antes e depois da exposição aos agentes genotóxicos radiação ultravioleta, cisplatina, peróxido de hidrogênio e metilmetanosulfonato. Para a dosagem da frequência de lesões, após o tratamento com esses agentes genotóxicos, utilizamos a técnica de PCR quantitativa descrita por Santos e colaboradores em 2006. Essa técnica baseia-se na premissa de que a atividade da Taq DNA polimerase, utilizada nas reações de PCR, é bloqueada quando esta se depara com uma lesão na fita molde. À medida que o número de lesões na fita molde aumenta, a amplificação relativa ao controle não tratado irá diminuir. Basicamente, o protocolo consiste em tratar os parasitos com os agentes genotóxicos em estudo, coletar as células, extrair o DNA genômico, dosar o DNA de maneira bastante acurada, realizar as reações de PCR, analisar as amplificações obtidas após os tratamentos e compará-las aos controles não tratados. Para que seja possível a detecção da frequência de lesões geradas aleatoriamente é preciso amplificar um longo trecho do DNA alvo, de aproximadamente 10kb. Para a normalização das reações de amplificação, um pequeno trecho interno, localizado na extremidade 3' do amplicon de 10 kb, também é amplificado.

#### 1.4.1.1 Os tratamentos com radiação ultravioleta e cisplatina

Os agentes genotóxicos radiação ultravioleta (UV) e cisplatina geram lesões no DNA, causando grande distorção na estrutura da dupla hélice. Lesões que envolvem modificações nas ligações covalentes do arcabouço açúcar-fosfato do DNA são tipicamente reparadas pelo NER (Nouspikel, 2009). Nesse sentido, ao tratarmos as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei* com os agentes UV e cisplatina, estaríamos realizando uma análise comparativa do funcionamento dessa via de reparo de DNA, entre dois diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. Vale ressaltar que apesar desses agentes causarem lesões, que são reparadas basicamente pela mesma via de reparo de DNA, cada um deles possui peculiaridades no que diz respeito à natureza química das lesões envolvidas, à eficiência de reparo dessas respectivas lesões e à resposta a danos no DNA envolvida em cada um desses respectivos contextos.

A radiação ultravioleta causa dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 (6-4 PPs) no DNA. Os CPDs compreendem cerca de 70-80% das lesões geradas por UV, enquanto que os 6-4 PPs correspondem de 20-30% (Suquet & Smerdon, 1993), sendo que a eficiência de reparo dos CPDs é menor comparada à cinética de remoção dos 6-4 PPs no DNA. Isso se deve ao fato de que os CPDs estão localizados mais frequentemente no DNA nucleossômico, dificultando o acesso da maquinaria do NER a essa lesão, ao passo que os 6-4 PPs, além de causarem maior distorção na estrutura da cromatina, estão mais presentes no trecho de DNA que conecta um nucleossomo ao outro, o que os torna mais prontamente detectáveis e acessíveis às enzimas de reparo (Tijsterman et al., 1999).

Para realizarmos uma análise comparativa da resposta à irradiação ultravioleta entre as formas procíclica e sanguícola do *T. brucei*, tratamos ambas as células do parasito com UVC (254 nm) e avaliamos a recuperação das mesmas, através da análise da cinética de reparo do DNA nuclear/mitocondrial e de curvas de crescimento celular, após o tratamento com esse agente. Como as duas formas do parasito são cultivadas em meios de cultura diferentes e com concentrações diferentes de soro fetal bovino, o que influenciaria na exposição à irradiação com

UV, decidimos padronizar uma dose, em PBS 1x, que induzisse uma frequência similar de fotolesões nas duas formas do parasito. Para determinarmos o efeito da radiação ultravioleta, bem como a frequência de lesões geradas nos genomas nuclear e mitocondrial, realizamos, primeiramente, uma curva dose resposta, tratando as células da forma sanguícola, em PBS 1x, com 50, 100, 250 e 500 J/m<sup>2</sup> de UVC (Figura 1.3). Até a dose de 100 J/m<sup>2</sup> observa-se um aumento linear do número de lesões do núcleo, sendo que o mesmo não é observado para a mitocôndria. A partir das doses de 100 J/m<sup>2</sup>, as frequências de lesões alcançadas no núcleo e na mitocôndria aproximam-se da frequência máxima de lesões que pode ser detectada pela técnica de PCR quantitativa, já que valores próximos a 3-4 lesões/10kb correspondem a menos de 5% de amplificação. Para as doses de 100 e 250 J/m<sup>2</sup>, o número de lesões gerado na mitocôndria foi significativamente menor comparado ao número de lesões gerado no núcleo.

A curva dose resposta de UVC possibilitou a obtenção dos valores das doses com as quais as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei* foram tratadas, para as análises subsequentes da cinética de reparo de DNA e do crescimento, após a indução do dano. Os parasitos foram tratados com 30 J/m<sup>2</sup> que, de acordo com a curva dose resposta de radiação ultravioleta, é a dose necessária para gerar uma frequência de 1,5 lesões/10kb, o que corresponderia a um valor intermediário à frequência máxima de lesões que pode ser obtido por esta técnica.

Ao avaliarmos a frequência de lesões no núcleo das formas sanguícola e procíclica, após o tratamento com 30 J/m<sup>2</sup> (células em PBS 1x), observamos que a frequência de danos no DNA da forma sanguícola foi similar àquela inferida pela curva dose resposta. Já na forma procíclica, essa frequência foi significativamente menor (Figura 1.4a). Após 10 horas de recuperação, não houve reparo das lesões geradas por UVC no núcleo da forma sanguícola do *T. brucei*, enquanto que a forma procíclica apresentou um reparo de ~50% das lesões geradas. Embora a forma procíclica tenha conseguido reparar parcialmente as lesões geradas por UV no núcleo, a intensidade do dano sofrido por ela foi menor.

Já em relação à indução de lesões por UV no DNA mitocondrial, observamos que a frequência de danos induzidos na forma sanguícola é significativamente menor à frequência de lesões encontradas no procíclico, ou seja, o inverso do que foi observado no DNA nuclear (Figura 1.4b). O número de lesões no DNA mitocondrial da forma sanguícola é variável, durante o período de tempo analisado, enquanto que a frequência de danos no DNA mitocondrial do procíclico permanece praticamente a mesma. O aumento do número de lesões, observado no DNA mitocondrial da forma sanguícola, entre os tempos de 1-4 horas após a irradiação, pode ser atribuído à geração de intermediários do processo de reparo capazes de bloquear a DNA polimerase utilizada neste ensaio. A diminuição do número de lesões após 4 horas, fazendo com que a frequência de lesões no ponto 10 horas se equivalha à frequência observada no ponto 0 hora após o tratamento, pode ser atribuída a um reparo parcial dos intermediários gerados. Entretanto, a maior parte das lesões originais e/ou dos intermediários do processo de reparo persiste até o fim do período analisado. De maneira geral, vimos que o reparo das lesões geradas por radiação ultravioleta apresenta-se de maneira pouco eficiente, em ambas as formas do parasito, durante o tempo de recuperação avaliado.

Para avaliarmos o crescimento dos parasitos, após o dano no DNA gerado por radiação ultravioleta, tratamos os parasitos com a dose utilizada na curva de cinética de reparo, o dobro e o quádruplo dessa mesma dose (30, 60 e 120 J/m<sup>2</sup>). Durante o intervalo de 4-10 horas, tempo equivalente ao período de recuperação da curva de reparo, observa-se morte de ~50% da população em ambas as formas do parasito (Figuras 1.5a e 1.5b). Após 24 horas, as porcentagens de sobrevivência das formas sanguícola e procíclica decaem para cerca de 1% e 6-14%, respectivamente, em todas as doses testadas. Os parasitos da forma sanguícola se recuperaram 48 horas após o tratamento, independentemente da dose testada, enquanto que apenas a forma procíclica, tratada com 30 J/m<sup>2</sup>, se recuperou neste mesmo período de tempo. As populações da forma procíclica, tratadas com 60 e 120 J/m<sup>2</sup>, se recuperaram após 72 horas.

Após o tratamento com UVC, houve morte da maior parte da população de ambas as formas do parasito, em todas as doses testadas, sendo que uma pequena porcentagem de parasitos sobreviventes foi capaz de se recuperar, retomando o crescimento.



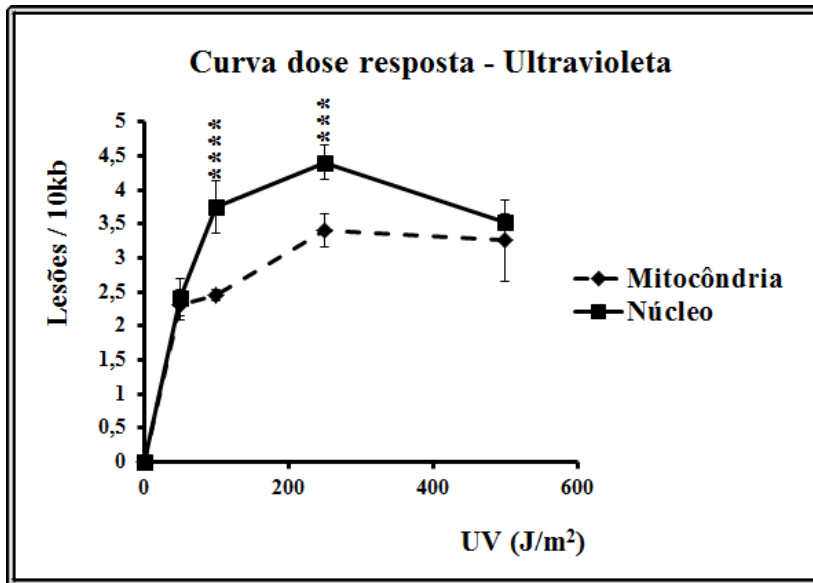
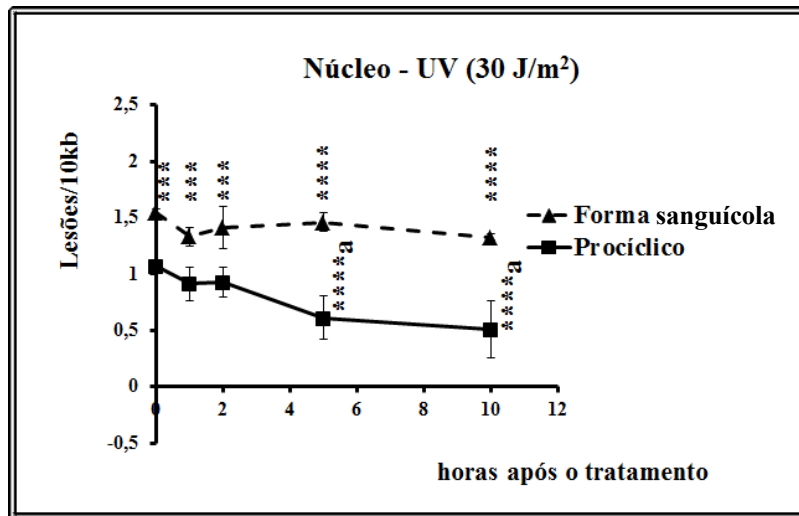


Figura 1.3: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de radiação ultravioleta nas quais os parasitos da forma sanguicola foram tratados (0, 50, 100, 250 e 500 J/m<sup>2</sup>). A linha tracejada com losangos representa as lesões no DNA mitocondrial, enquanto que a linha preta com quadrados representa as lesões presentes no DNA nuclear. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\* e \*\*\*\* representam  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

a-)



b-)

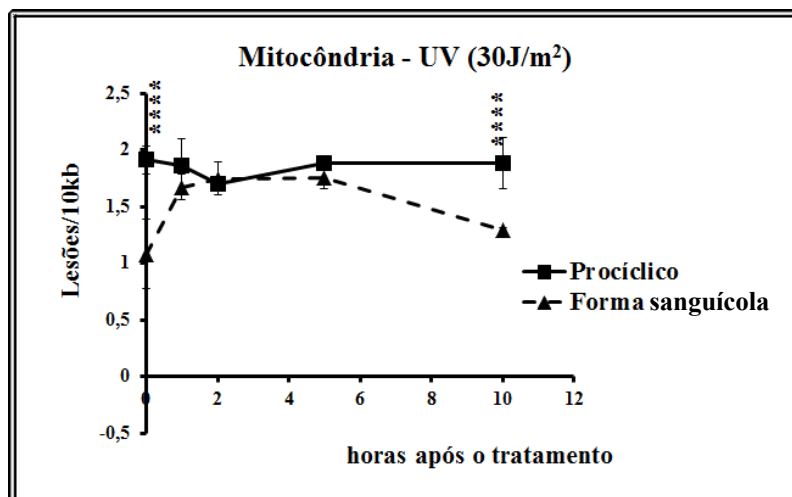
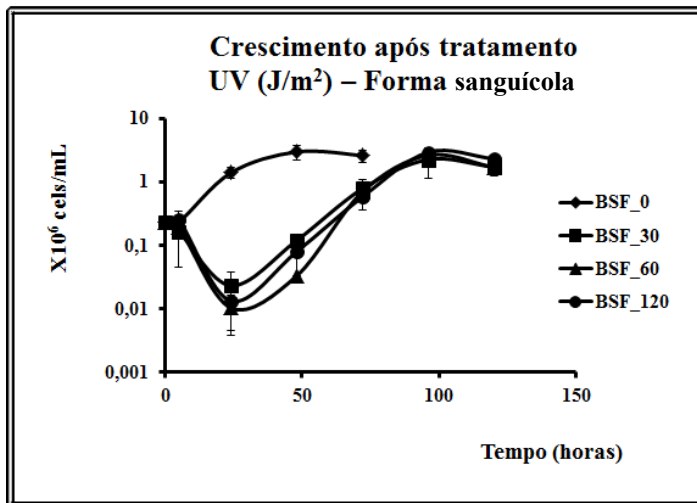


Figura 1.4: Curva da cinética de reparo após o tratamento das formas sanguícola (linha tracejada com triângulos) e procíclica (linha preta com quadrados) do *T. brucei* com  $30 \text{ J/m}^2$  de radiação ultravioleta. a-) DNA nuclear b-) DNA mitocondrial. Cada ponto destas curvas representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\* e \*\*\*\* representam  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente. “a”, apenas representado na figura a, denota as comparações dos pontos “1”, “2”, “5” e “10” versus o ponto “0”.

a-)



b-)

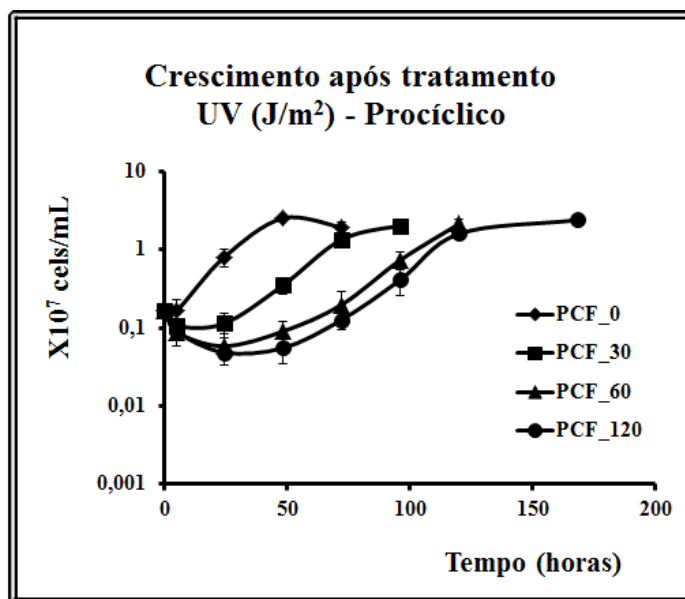


Figura 1.5: Curva de crescimento do *T. brucei* após tratamento com 30, 60 e 120  $J/m^2$  de radiação ultravioleta em PBS 1x. a-) Forma sanguícola (número de parasitos  $\times 10^6$  células/mL) versus tempo em horas. b-) Forma procíclica (número de parasitos  $\times 10^7$  células/mL versus tempo em horas. BSF/PCF\_0 (losangos), BSF/PCF\_30 (quadrados), BSF/PCF\_60 (triângulos) e BSF/PCF\_120 (círculos) representam, respectivamente, células tratadas com 0, 30, 60 e 120  $J/m^2$  de radiação ultravioleta. Estas curvas de crescimento são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A cisplatina tem sido usada por mais de 30 anos no tratamento de diversos tipos de câncer (Stordal & Davey, 2007). Ao entrar na célula, a cisplatina torna-se positivamente carregada e apta a reagir com moléculas nucleófilas tais como o DNA, o RNA e proteínas. Entretanto, a citotoxicidade da cisplatina deve-se principalmente à sua habilidade de se ligar ao DNA (Stordal & Davey, 2007). Essa droga induz, predominantemente, ligações covalentes entre resíduos de adenina e guanina, localizados na mesma fita (25% das lesões), ou entre guaninas adjacentes (65% das lesões), além de uma pequena proporção de ligações covalentes entre as fitas complementares do DNA (1% das lesões) (Masters & Koberle, 2003). Além disso, vários outros processos celulares estão envolvidos na susceptibilidade ou resistência à cisplatina, de modo que ao tratarmos as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei* com esse agente, devemos levar em consideração fatores como a taxa de influxo e efluxo da droga, através da membrana celular, a sua acessibilidade ao DNA, os processos de destoxificação e ativação desse composto, a eficiência de reparo das lesões geradas e os mecanismos de morte celular programada, induzidos por essa droga (Masters & Koberle, 2003). Apesar dos adutos gerados por cisplatina serem basicamente processados pelo NER, a mesma via implicada no reparo de lesões causadas por UV, esses outros fatores tornam o tratamento com cisplatina peculiar, ao compararmos a resposta a danos no DNA gerada por esses dois agentes.

Para determinarmos a dose ideal na realização das curvas de cinética de reparo e crescimento celular, após a exposição à cisplatina, realizamos uma curva dose resposta tratando a forma sanguícola do parasito por 1 hora com 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de cisplatina (Figura 1.6). Após esses tratamentos, constatamos que a frequência de lesões geradas no núcleo é significamente maior do que aquela observada na mitocôndria, para as doses de 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$ . O aumento do número de lesões tanto no núcleo, quanto na mitocôndria, é dose dependente. Decidimos utilizar a dose de 100  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 1 hora, que causa uma frequência aproximada de 1,5 lesões/10kb, para a realização das curvas de cinética de reparo de DNA. A frequência de lesões obtida após o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 1 hora é a mesma observada na curva dose resposta, tanto no núcleo, quanto na mitocôndria da forma sanguícola do *T. brucei*. A mesma intensidade de danos no DNA também é vista no DNA nuclear e mitocondrial do procíclico (Figuras 1.7a e 1.7b).

O reparo do DNA nuclear (Figura 1.7a) de ambas as formas do parasito ocorre na primeira hora de recuperação, após a indução de danos pela cisplatina. No entanto, a eficiência de reparo no núcleo da forma sanguícola é bem maior quando comparada à eficiência de reparo observada no procíclico. Enquanto que no primeiro caso o DNA nuclear é totalmente reparado em 1 hora, no segundo caso ocorre uma remoção de cerca de 50% das lesões, neste mesmo período de tempo. Durante o intervalo de 1-10 horas, observa-se um aumento de ~0,25 lesões/10kb no núcleo de ambas as formas. Entretanto, ao fim do intervalo de tempo analisado, a frequência de lesões persistentes no núcleo é significativamente maior na forma procíclica, quando comparada à forma sanguícola.

Já na curva de reparo mitocondrial (Figura 1.7b), observa-se um reparo rápido e muito eficiente no DNA da forma sanguícola, de maneira que o número de lesões, após o período de 1 hora de recuperação, é inferior ao número de lesões presentes na mitocôndria da célula em estado basal. Na forma procíclica, o reparo mitocondrial é mais lento, ocorrendo ao longo do período de 10 horas de recuperação, e pouco eficiente, já que não há remoção total das lesões geradas na mitocôndria.

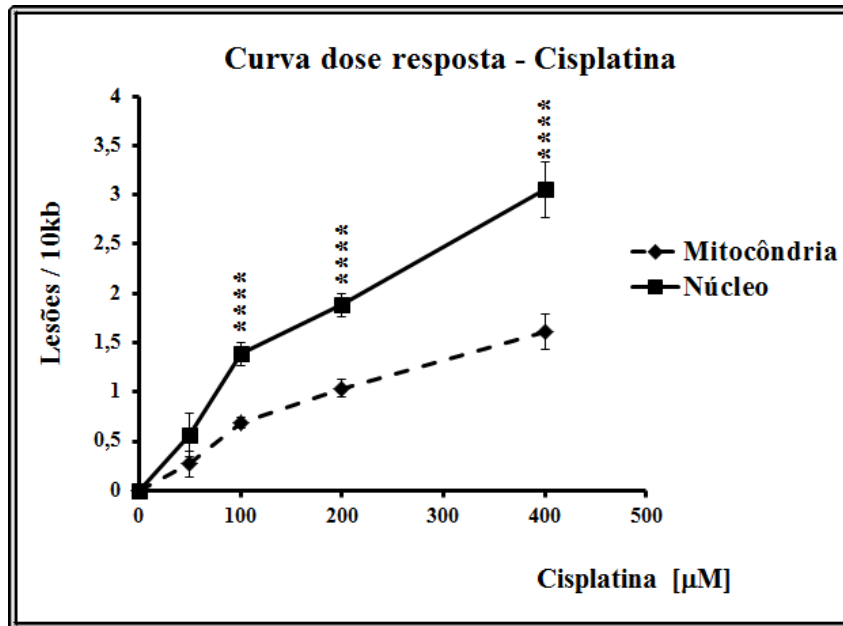
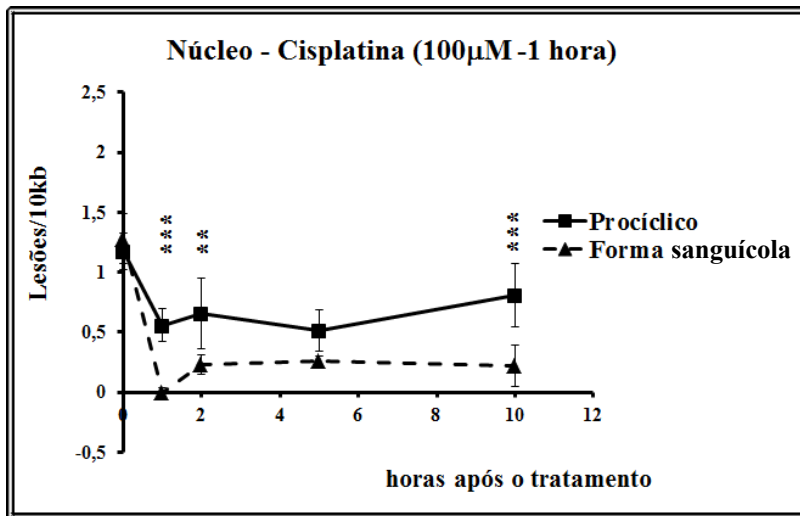


Figura 1.6: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de cisplatina nas quais os parasitos da forma sanguícola foram tratados por 1 hora (0, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$ ). Linha preta com quadrados: DNA nuclear. Linha tracejada com losangos: DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .

a-)



b-)

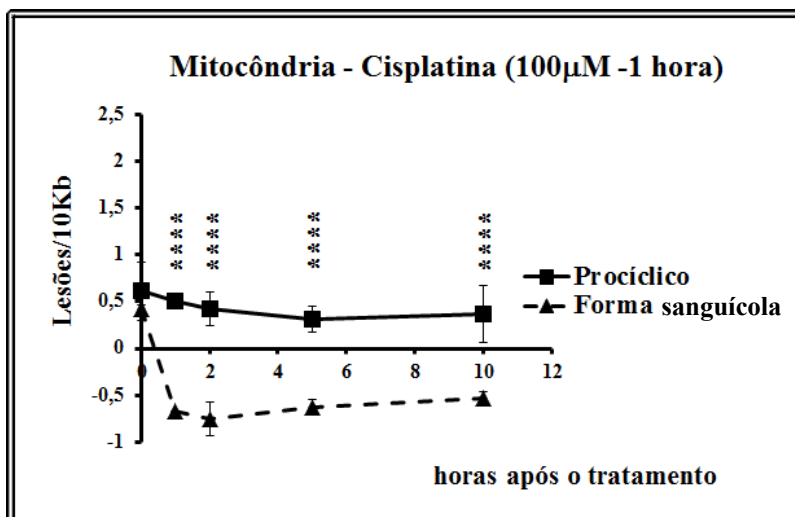


Figura 1.7: Curva da cinética de reparo de DNA após o tratamento das formas sanguícola (linhas tracejadas com triângulos) e procíclica (linhas pretas com quadrados) do *T. brucei* com 100 µM de cisplatina por 1 hora. a-) DNA nuclear. b-) DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* representam  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

Após a análise da cinética de reparo, entre as duas formas do *T. brucei*, analisamos o crescimento dos parasitos, após o tratamento com a mesma dose de cisplatina utilizada nos experimentos de reparo de DNA. Além disso, utilizamos o dobro e o quádruplo dessa mesma nas curvas de crescimento. Considerando a diferença observada na eficiência do reparo de lesões geradas por cisplatina, entre as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*, pretendemos agora analisar o perfil de resposta a danos no DNA, apresentado em cada uma dessas formas.

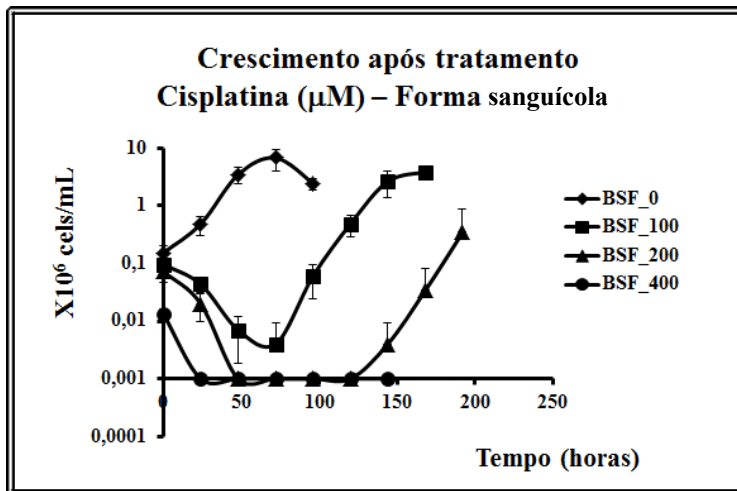
Nas primeiras 4-10 horas, após o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de cisplatina, não há morte em nenhuma das duas formas do parasito. Embora o reparo de cisplatina tenha sido altamente eficiente tanto no DNA mitocondrial, quanto no DNA nuclear da forma sanguícola, após o tratamento com essa mesma dose, observa-se grande porcentagem de morte na população desses parasitos, após 24 horas do período de recuperação. A população sobrevivente retoma o crescimento após 72 horas. Já no procíclico, onde o reparo mostra-se menos eficiente, não houve morte após o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de cisplatina, mas ocorre a parada do crescimento celular, em até 72 horas, a partir do tempo “0 hora”. Após esse período de parada do crescimento, a população retoma o crescimento (Figuras 1.8a e 1.8b, linhas com quadrados). Na dose de 200  $\mu\text{M}$  de cisplatina, ocorre ~50% de morte do procíclico no ponto de 72 horas após o tratamento, sendo que a porcentagem de morte na forma sanguícola é próxima de 100%. Após o 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia, ocorre a recuperação do crescimento das populações da forma procíclica e sanguícola, respectivamente (Figuras 1.8a e 1.8b, linhas com triângulos). A dose de 400  $\mu\text{M}$  de cisplatina induz, durante as primeiras 10 horas, a morte de aproximadamente 30 e 90% dos parasitos na forma procíclica e sanguícola, respectivamente. Após esse período inicial pós-tratamento, não há recuperação do crescimento da forma sanguícola, enquanto que, no procíclico, é observada, no 3<sup>o</sup> dia, a morte de 80% da população. A retomada do crescimento dos procíclicos sobreviventes ocorre após o 4<sup>o</sup> dia (Figuras 1.8a e 1.8b, linhas com círculos).

Levando em consideração que 99% das lesões geradas por cisplatina são atribuídas a *crosslinks* na mesma fita, sugerimos que tais lesões correspondam àquelas removidas durante a primeira hora de reparo através do NER. As lesões remanescentes, compostas por *crosslinks* entre diferentes fitas do DNA e que correspondem a 1% do total das lesões geradas por



cisplatina, não são reparadas pelo NER. Ao persistirem até o momento da replicação, elas promoveriam a parada do ciclo celular, o que induziria morte na forma sanguícola, mas não na forma procíclica. No procíclico, mecanismos de tolerância à lesão, tal como a síntese translesão, seriam acionados, resgatando a célula da morte.

a-)



b-)

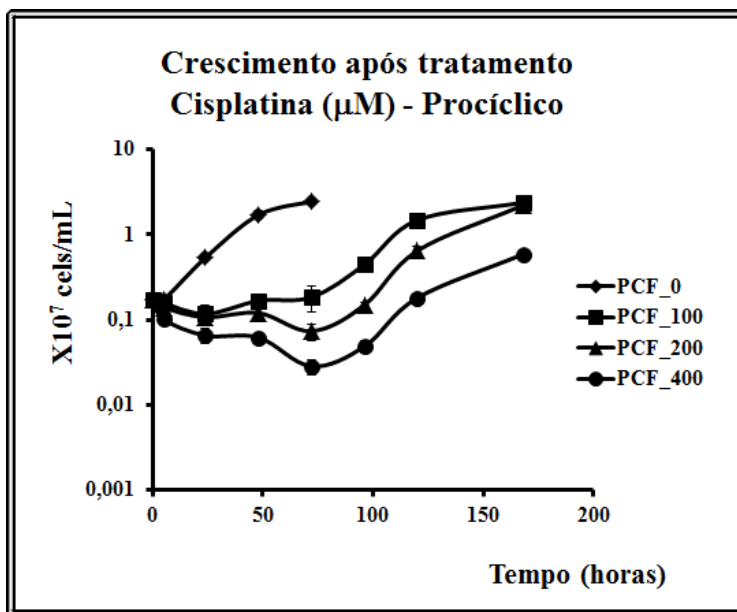


Figura 1.8: Curva de crescimento do *T. brucei* após tratamento com 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 1 hora. a-) Forma sanguícola (número de parasitos  $\times 10^6$  células/ml versus tempo em horas). b-) Forma procíclica (número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas). Linha com losangos, linha com quadrados, linha com triângulos e linha com círculos representam, respectivamente, controle não tratado e células tratadas com 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 1 hora. Estas curvas de crescimento são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 1.4.1.2 Os tratamentos com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e metilmetanosulfonato (MMS)

Os agentes genotóxicos peróxido de hidrogênio e metilmetanosulfonato causam lesões nas bases nitrogenadas do DNA, que são reparadas primariamente pelo BER, visto que tais modificações não geram grande distorção na estrutura da dupla hélice (Robertson et al., 2009). Pretendemos, com esses tratamentos, comparar a resposta a danos no DNA entre as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*, em um contexto em que outra via de reparo poderia ser acionada.

O tratamento com peróxido de hidrogênio induz a formação de radicais hidroxila altamente reativos, após esse grupamento receber um elétron proveniente da oxidação de Fe (II) a Fe (III) (reação de Fenton) (Prousek et al., 2007). Os radicais hidroxila podem danificar quaisquer das moléculas biológicas, incluindo o DNA, causando quebra simples no esqueleto açúcar-fosfato e levando à oxidação de bases nitrogenadas (Jomova & Valko, 2011). Mais de 100 produtos da oxidação de bases nitrogenadas foram identificados até o momento, sendo que o mais frequente é a 8-oxoguanina, uma lesão caracteristicamente mais mutagênica do que citotóxica (Dizdaroglu & Jaruga, 2012, England et al., 1998). Uma vez presentes no DNA, essas lesões são reparadas pelo BER, após a ativação dessa via por mecanismos dependentes de ATM (Ray et al., 2012).

Embora o objetivo central do tratamento com peróxido de hidrogênio seja avaliar a eficiência do BER no reparo de lesões resultantes do dano por oxidação de bases nitrogenadas, bem como a maneira pela qual as diferentes formas do parasito lidarão com esse tipo de dano, vale ressaltar que a indução de ROS ainda conta com profundas modificações em outros processos celulares, tais como, proliferação, metabolismo e diferenciação (Ray et al., 2012).

O tratamento com peróxido de hidrogênio, realizado na faixa de 50 a 400  $\mu\text{M}$  por 15 minutos, não resultou em um aumento considerável, que pudesse ser detectado pela técnica de PCR quantitativa, da frequência de lesões no núcleo da forma sanguícola do parasito (Figura 1.9a). Ao aumentarmos o tempo de tratamento para 1 hora, porém utilizando-se das mesmas doses, verificamos um aumento de 1 lesão/10kb na frequência de lesões do núcleo da forma sanguícola, já na menor dose de peróxido de hidrogênio utilizada. As doses de 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  induzem uma frequência similar de lesões, em torno de 1,5 lesões/10kb, configurando um platô no nível de dano gerado a partir da dose de 50  $\mu\text{M}$ . Embora estes tratamentos tenham induzido níveis detectáveis de lesões no núcleo do parasito, nenhum deles foi capaz de aumentar a frequência de lesões no DNA mitocondrial (Figura 1.9b).

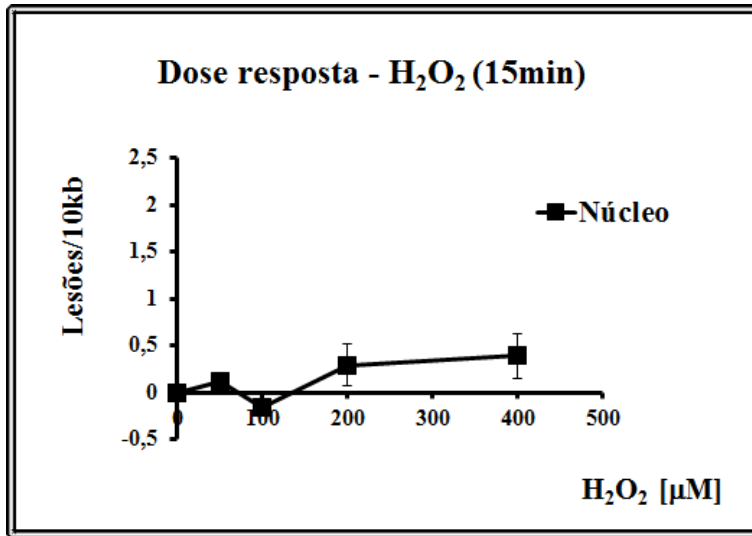
A partir da curva dose resposta, escolhemos a dose de 100  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para realizarmos as curvas de cinética de reparo. A frequência de lesões geradas no núcleo do parasito, após o tratamento com a dose selecionada, é a mesma tanto a forma sanguícola, quanto para a forma procíclica do parasito (Figura 1.10a). Na forma sanguícola do parasito, há queda de cerca de um terço da frequência de lesões, em 1 hora após o tratamento, com posterior aumento dessa frequência para  $\sim 1,5$  lesões/10kb, nas quatro horas subsequentes. A partir de 5 horas após o tratamento, ocorre uma queda de aproximadamente 50% das lesões. Já no procíclico, ocorre redução de um terço do número das lesões iniciais, no ponto de 2 horas pós-tratamento. Após esse ponto, o número de lesões permanece estável. Ao final do período analisado, não há diferença significativa entre o número de lesões persistentes no DNA nuclear de ambas as formas do parasito.

Na mitocôndria, de modo compatível aos dados obtidos pela curva dose resposta, o aumento da frequência de lesões é indetectável no ponto zero hora pós-tratamento. O mesmo fenômeno é observado no DNA mitocondrial do procíclico (Figura 1.10b). Após o tempo zero, ocorre um aumento do número de lesões em ambas as formas, porém esse aumento é significativamente mais rápido no procíclico, quando comparado ao aumento observado na forma sanguícola. Dessa forma, o dano no DNA mitocondrial do *T. brucei* é induzido indiretamente pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. Após o aumento da frequência de

lesões, observado em ambas as formas do parasito, o nível de danos no DNA mitocondrial da forma sanguícola retorna para valores próximos ao basal, enquanto que as injúrias geradas no kDNA do procíclico permanecem irreparadas. Com isso, a remoção de danos no DNA mitocondrial, induzidos indiretamente pelo tratamento com peróxido de hidrogênio, mostra-se mais eficaz na forma sanguícola, quando comparada ao que ocorre no procíclico.

Durante as primeiras 4-10 horas, o procíclico mostra-se mais resistente ao tratamento com peróxido de hidrogênio, quando comparado à forma sanguícola (Figuras 1.11a e 1.11b). Após esse período inicial, a dose de 50  $\mu\text{M}$  por 30 minutos causa maior mortalidade no procíclico, quando comparada à mortalidade observada na população da forma sanguícola. Já nas doses de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , por 60 minutos, a percentagem de morte de ambas as populações é similarmente alta. Após 24 horas, a recuperação do procíclico mostra-se mais lenta, quando comparada à recuperação apresentada pela forma sanguícola, em todas as doses testadas. Dessa forma, a maior eficiência de reparo do DNA mitocondrial apresentada pela forma sanguícola, em relação à procíclica, pôde ser correlacionada à recuperação mais rápida da primeira, nas curvas de crescimento, em detrimento à segunda.

a-)



b-)

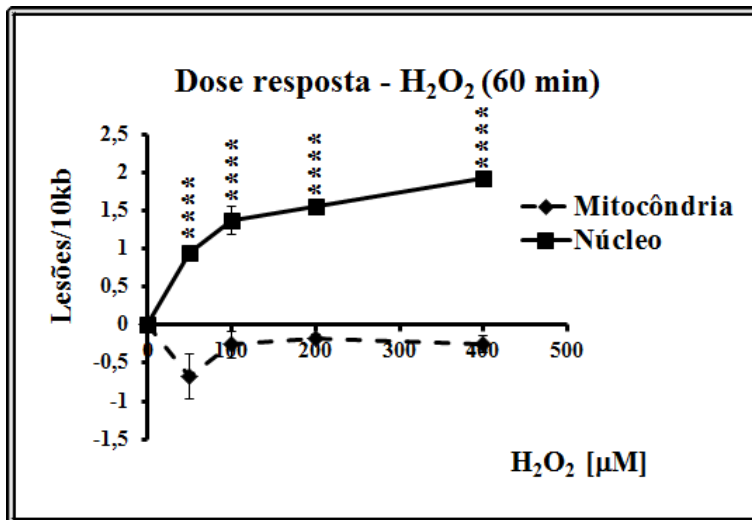
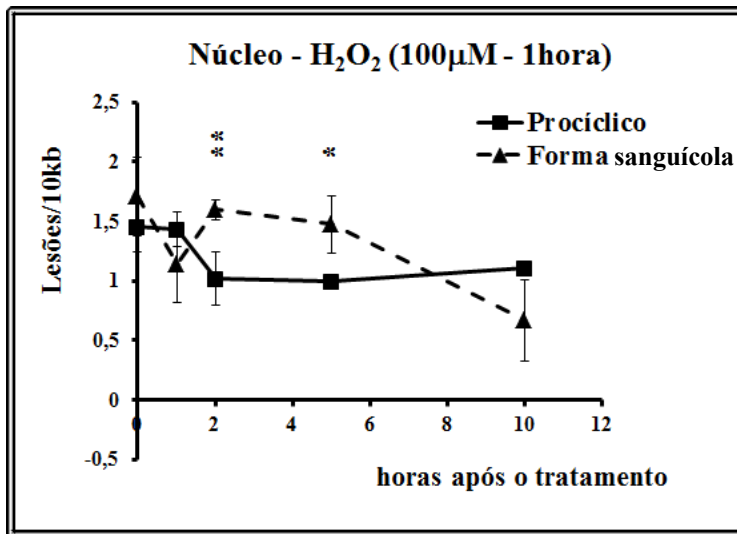


Figura 1.9: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de peróxido de hidrogênio nas quais os parasitos da forma sanguicola foram tratados (0, 50, 100, 200 e 400 µM). Linhas pretas com quadrados: DNA nuclear. Linha tracejada com losangos: DNA mitocondrial. a-) Exposição por 15 minutos. b-) Exposição por 60 minutos. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .

a-)



b-)

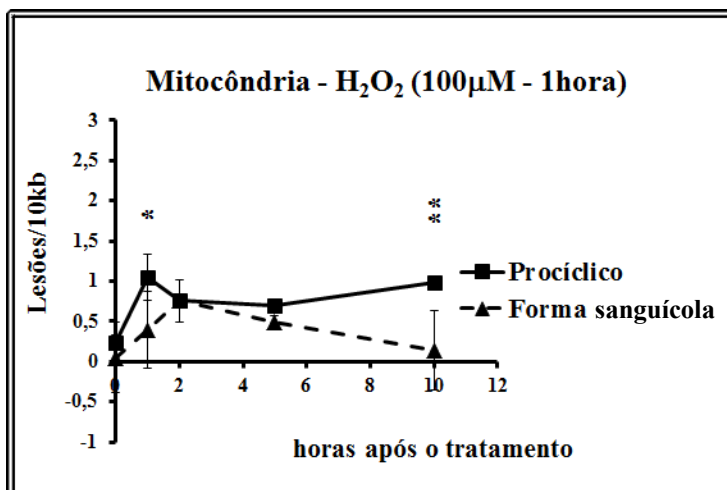
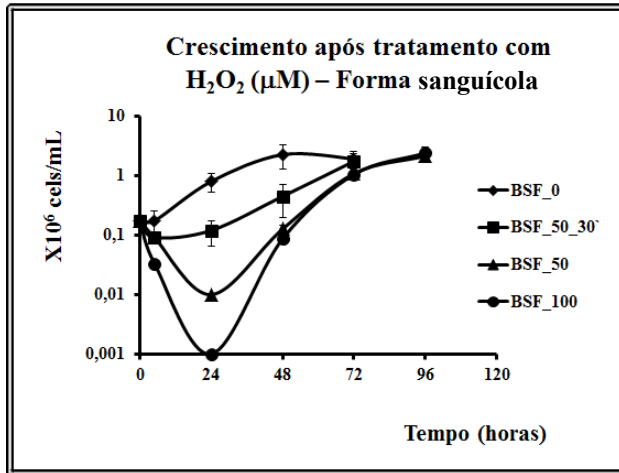


Figura 1.10: Curva da cinética de reparo após o tratamento das formas sanguícola (linhas tracejadas com triângulos) e procíclica (linhas pretas com quadrados) do *T. brucei* com 100  $\mu$ M peróxido de hidrogênio, por 1 hora. a-) DNA nuclear. b-) DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \* e \*\* representam  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ; respectivamente.

a-)



b-)

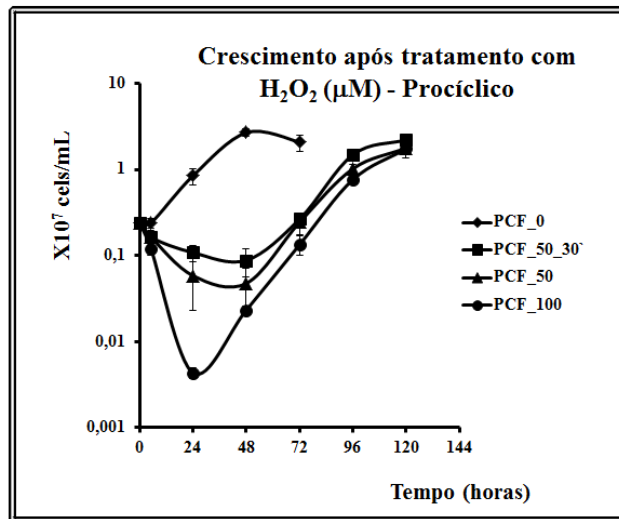


Figura 1.11: Curva de crescimento do *T. brucei* após tratamento com 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por 30 minutos e 50/100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por 60 minutos. a-) Forma sanguícola (número de parasitos  $\times 10^6$  células/ml versus tempo em horas) b-) Forma procíclica (número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas). Linhas com losangos, quadrados, triângulos e círculos representam, respectivamente, controle não tratado e células tratadas com 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por 30 minutos e 50/100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por 60 minutos. Estas curvas de crescimento são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata.



O MMS é um agente alquilante que causa basicamente dois tipos de lesões: a 7-metilguanina e a 3-metiladenina. A 7-metilguanina é a modificação mais frequente induzida por esse agente, correspondendo a 82% do total de lesões. Essa lesão é relativamente inócua, já que ela não causa bloqueio na atividade da DNA polimerase ou provoca erros de pareamento. No entanto, a 7-metilguanina é mais susceptível à depurinação, gerando sítios abásicos, altamente mutagênicos e fortes bloqueadores da DNA polimerase (Ezaz-Nikpay & Verdine, 1994). Já a 3-metiladenina é considerada uma lesão tóxica, por bloquear a atividade da DNA polimerase. Além disso, essa modificação induz transversões do tipo A:T - T:A (Fronza & Gold, 2004).

A resposta a danos no DNA induzida por MMS, assim como aquelas induzidas por outros agentes genotóxicos, é bastante complexa, visto que esse composto alquilante pode reagir com qualquer componente celular que possua caráter nucleófilo. Como exemplo disso, a resposta ao MMS, em levedura, pode alterar o padrão de expressão de mais de 1000 genes, sem que os mesmos estejam necessariamente relacionados à sobrevivência da célula, após a exposição a esse agente (Fry et al., 2005). Além disso, é descrito na literatura, que a resposta ao MMS pode funcionar através de vias de sinalização distintas, dependentes e independentes da presença de lesões no DNA (Fritz & Kaina, 2006).

Ao tratarmos a forma sanguícola do *T. brucei* com 0,5; 1; 1,5 e 2 mM de MMS, por 1 hora, vimos que o número de lesões gerado na mitocôndria é significativamente menor, comparado àquele visto no núcleo do parasito. O número de lesões geradas é diretamente proporcional à dose administrada, tanto no núcleo quanto na mitocôndria, seguindo um padrão dose dependente (Figura 1.12). A partir da curva dose resposta de MMS, decidimos tratar os parasitos com a dose de 1,5 mM por 1 hora, de modo a obter 1,5 lesões/10kb, a mesma frequência de adutos adotada nos tratamentos prévios.

Uma diferença significativa pôde ser observada nos tratamentos das formas sanguícola e procíclica do *T. brucei* com 1,5 mM de MMS, por 1 hora: uma dose que causa uma frequência de lesões 1,5 lesões/10kb na forma sanguícola praticamente não afeta o nível de adutos no DNA

da forma procíclica. Esse mesmo fenômeno foi observado tanto no DNA nuclear, quanto no DNA mitocondrial, da forma procíclica (Figuras 1.13a e 1.13b). Na forma sanguícola, o reparo pode ser dividido em duas fases, tanto no DNA nuclear, quanto no DNA mitocondrial: uma fase rápida, que ocorre em 1 hora após o tratamento; e outra lenta que ocorre nas horas subsequentes. Na fase rápida de reparo, o intermediário gerado, após o processamento da lesão inicial, não bloqueia a DNA polimerase utilizada no ensaio de PCR quantitativa, resultando em uma aparente ausência de lesões. Em seguida, o intermediário gerado na fase rápida é processado em outro que bloqueia a DNA polimerase. O processamento desse segundo intermediário ocorre nas horas subsequentes, até que no ponto de 10 horas, a frequência de adutos volta para os níveis basais. Já no procíclico, a frequência de lesões logo após o tratamento é muito próxima daquela observada nos níveis basais de ambos os genomas do parasito. Entretanto, durante o tempo de recuperação após o tratamento, observa-se um leve aumento no número de danos no DNA.

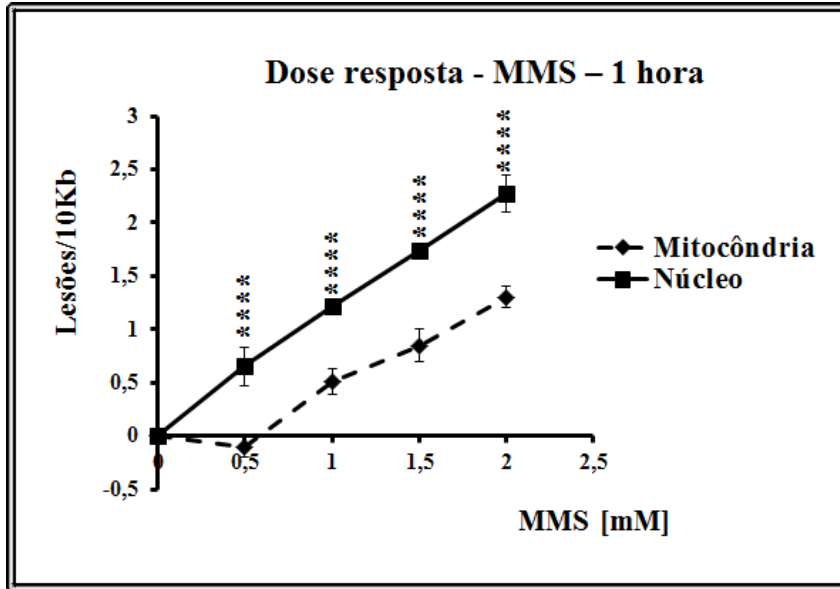
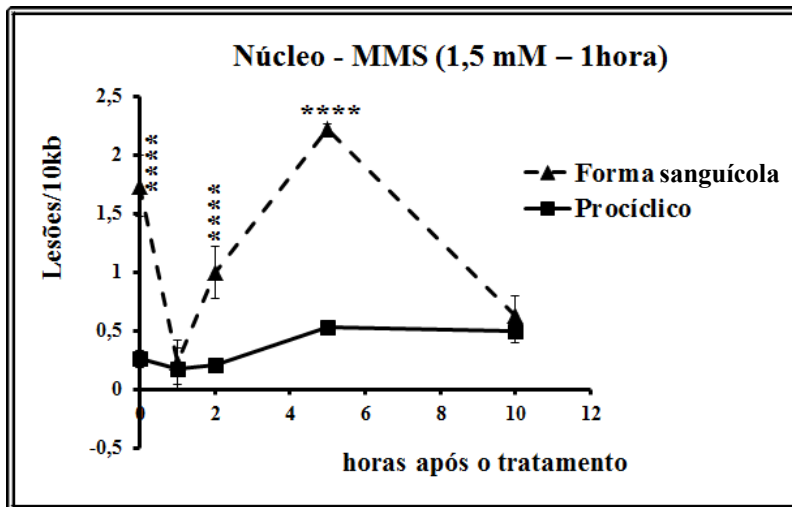


Figura 1.12: Curva dose resposta do número de lesões/10 kb versus as doses de MMS nas quais os parasitos da forma sanguícola foram tratados por 1 hora (0,5; 1; 1,5 e 2 mM). Linha preta com quadrados: DNA nuclear. Linha tracejada com losangos: DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .

a-)



b-)

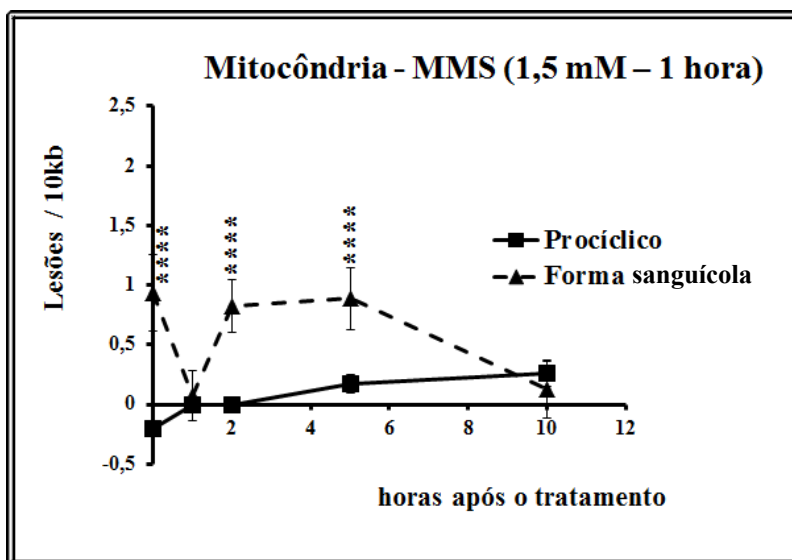


Figura 1.13: Curva da cinética de reparo após o tratamento das formas sanguícola (linhas tracejadas com triângulos) e procíclica (linha pretas com quadrados) do *T. brucei* com 1,5 mM de MMS, por 1 hora. a-) DNA nuclear. b-) DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .

Ao constatarmos que a dose de MMS de 1,5 mM por 1 hora, capaz de gerar 1,5 lesões/10kb no núcleo da forma sanguícola, praticamente não leva à geração de adutos no procíclico, decidimos realizar uma curva dose resposta de MMS com o procíclico. Entretanto, em vez de utilizarmos uma faixa de 0,5-2 mM de MMS por 1 hora, tratamos os parasitos com 1,5-12 mM de MMS por 1 hora (Figura 1.14). Nesta curva dose resposta, o tratamento da forma procíclica com 1,5 mM de MMS, por 1 hora, novamente não aumentou a frequência de lesões em nenhum dos dois genomas do parasito, condizendo com os resultados obtidos previamente. A partir dessa dose, o aumento na frequência de lesões não se comporta de maneira dose dependente, obedecendo a um padrão de limiar, em que doses menores que 1,5 mM de MMS não aumentam a frequência de lesões no DNA do procíclico, ao contrário das doses acima de 1,5 mM de MMS. Com isso, vimos que as doses acima de 1,5 mM provocam uma frequência de lesões de ~2-3 lesões/10 kb no núcleo e de 1,5 lesões/10kb no kDNA.

Foi realizado um tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora (Figuras 1.15a e 1.15b) para analisarmos os fenótipos de sobrevivência e recuperação do crescimento nas duas formas do parasito. Observamos, então, que esse tratamento leva a uma grande mortalidade na população da forma sanguícola, durante as primeiras 4-10 horas, ao passo que ele não causa morte no procíclico. Embora em menor proporção, ao compararmos a dose de 1,5 mM com a dose de 0,5 mM, observamos que esta última também causa intensa mortalidade na população da forma sanguícola do *T. brucei*, durante as primeiras 4-10 horas. A retomada do crescimento dos parasitos sobreviventes ocorre, respectivamente, com 72 e 96 horas após o tratamento com ambas as doses de MMS (Figura 1.15a). Entretanto, nenhuma das doses testadas induziu morte celular no procíclico. As células tratadas com 0,5 mM de MMS, por 1 hora, apresentam crescimento mais lento, quando comparadas com o controle não tratado. Já as células tratadas com 1,5 mM, por 1 hora, apesar de também não apresentarem morte na população, são incapazes de retomarem o crescimento, durante todo o período de tempo analisado (seis dias) (Figura 1.15b).

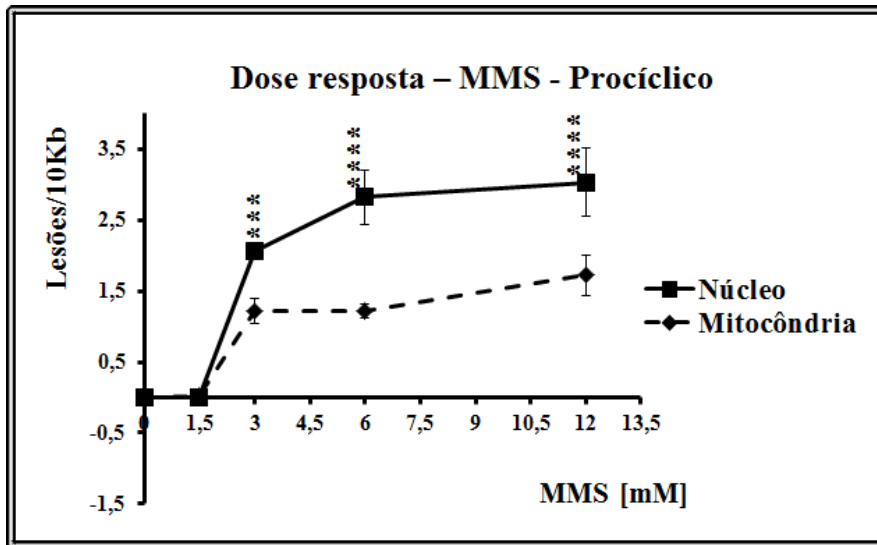
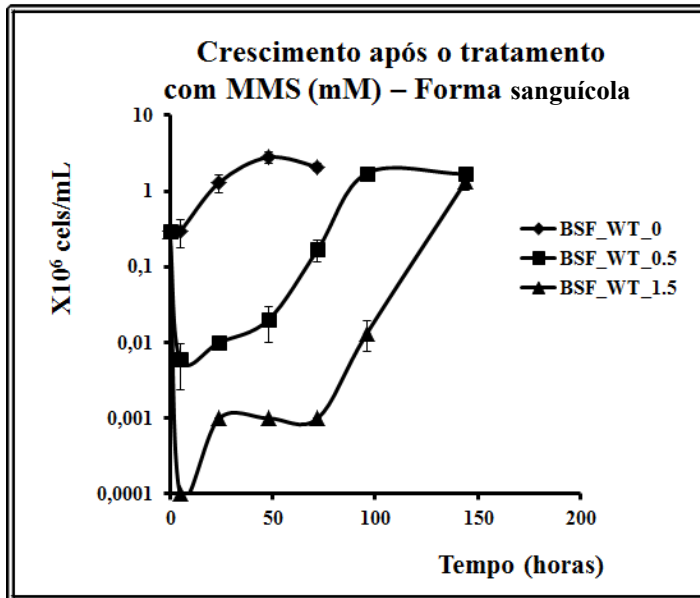


Figura 1.14: Curva dose resposta do número de lesões/10kb versus as doses de MMS nas quais os parasitos da forma procíclica foram tratados por 1 hora (1,5; 3; 6 e 12 mM). Linha preta com quadrados: DNA nuclear. Linha tracejada com losangos: DNA mitocondrial. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*\* e \*\*\*\* representam, respectivamente,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ .

a-)



b-)

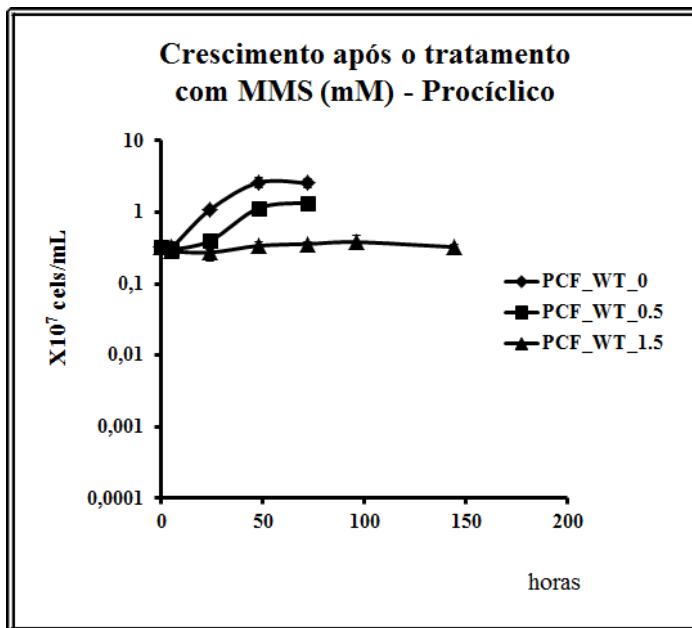


Figura 1.15: Curva de crescimento do *T. brucei*, após tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora. a-) Forma sanguícola (número de parasitos  $\times 10^6$  células/ml versus tempo em horas). b-) Forma procíclica (número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas). Linha com losangos, linha com quadrados e linha com triângulos representam, respectivamente, controle não tratado e células tratadas com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora. Estas curvas de crescimento são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Os intermediários do BER, gerados a partir da ação da primeira glicosilase, responsável pela remoção da base nitrogenada danificada, até a ação da DNA ligase, que promove a ligação final do arcabouço açúcar-fosfato, são mais citotóxicos quando comparados à lesão original, gerada pela alteração química da base nitrogenada. Em virtude disso, qualquer alteração do BER, que aumente a permanência desses intermediários no DNA da célula, induz maior mortalidade, após exposição a genotoxinas (Fu et al., 2012). Na maioria dos organismos estudados até o momento, as lesões geradas por MMS são majoritariamente reparadas pelo BER. Intermediários do BER, que persistem até a replicação do DNA, induzem o colapso da forquilha de replicação, levando à formação de quebras duplas no DNA (Fu et al., 2012). As quebras duplas no DNA podem ser reparadas por recombinação homóloga, durante a fase S do ciclo celular, onde a proteína Rad51 é um elemento chave desta via. Alternativamente, Rad51 poderia facilitar os mecanismos de tolerância a lesões por alquilação, durante a fase S. Neste cenário, a ligação de Rad51 nos sítios de bloqueio da replicação levaria à formação de um gap frente à lesão. Este gap, juntamente com a lesão, só seriam reparados na fase G2, por recombinação homóloga. Tal mecanismo evitaria a formação de aberrações cromossômicas, formadas quando a maquinaria de recombinação homóloga reconhece como substrato, durante a fase S, os intermediários do BER/NER resultantes do reparo incompleto de bases alquiladas. Além disso, a inibição do preenchimento deste gap, na fase S, por síntese translesão, evitaria a indução de mutações frente à base alquilada (Gonzalez-Prieto et al., 2013).

Voltando para a curva de reparo de MMS da forma sanguícola do *T. brucei*, especulamos que a fase rápida de reparo das lesões geradas por esse agente seja realizada pelo NER e não pelo BER. Isso porque além do *T. brucei* não apresentar as glicosilases necessárias para a remoção de bases nitrogenadas alquiladas, a linhagem desse parasito nocaute para APE1 não é mais sensível ao MMS (Charret et al., 2011). Além disso, a eficiência de reparo das lesões geradas por MMS é mais próxima da eficiência vista na curva de cisplatina do que aquela observada na curva de reparo após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sugerimos também, que a etapa lenta do reparo de MMS esteja relacionada ao processamento de quebras duplas/simples, dependente de Rad51. Dessa forma, ao tratarmos com MMS as células da forma sanguícola do *T. brucei* nocautes para Rad51 pretendemos avaliar a contribuição dessa proteína, assim como analisar o envolvimento da via de recombinação homóloga durante o processamento de bases alquiladas.

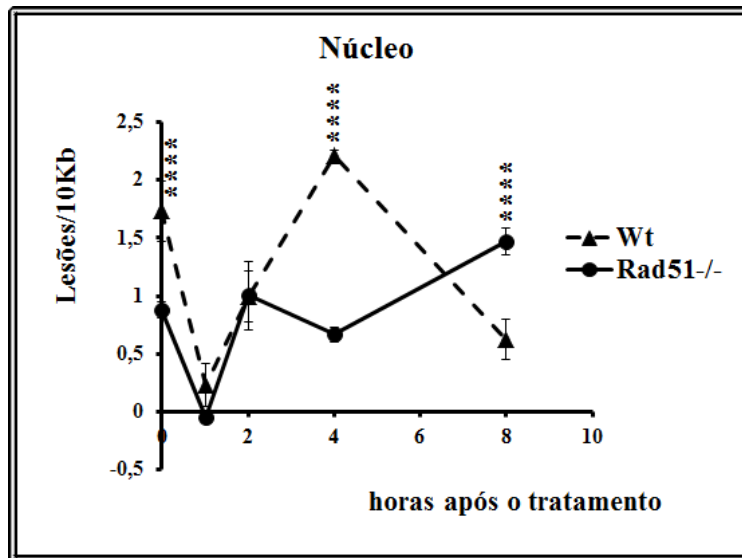


A ausência de Rad51 não modifica a eficiência da fase rápida de reparo ocorrida durante a primeira hora pós-tratamento com MMS (Figura 1.16a). No entanto, a eficiência da segunda etapa de processamento das lesões geradas por MMS é bastante comprometida na ausência de Rad51. No ponto de 4 horas, após o tratamento, diferentemente do que foi observado na linhagem selvagem, não ocorre um aumento no número de lesões no núcleo das células nocaute para Rad51. Entretanto, no ponto de 10 horas pós-tratamento, há uma queda expressiva na frequência de lesões do núcleo da cepa selvagem, enquanto no núcleo das células Rad51 *-/-* ocorre exatamente o inverso. Já no DNA mitocondrial da cepa nocaute para Rad51, há um grande acúmulo de lesões, inclusive nas células em estado basal, contrastando com a baixa frequência de danos encontrados no DNA mitocondrial da cepa selvagem (Figura 1.16b).

A ausência de Rad51 na forma sanguícola do *T. brucei*, assim como descrito para outros organismos, aumenta a sensibilidade a MMS (McCulloch et al., 1999). No entanto, era nosso objetivo definir se a intervenção de Rad51 no reparo de lesões geradas por MMS, ocorrida entre 1-10 horas pós-tratamento, afetaria a mortalidade dos parasitos neste mesmo momento, ou se o reparo dependente de Rad51 afetaria a retomada do crescimento após exposição ao MMS.

Ao analisarmos a porcentagem de sobrevivência, por volta de 10 horas após exposição a 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora, não detectamos nenhuma diferença entre as formas selvagem e Rad51*-/-* do *T. brucei* sanguíneo (Figura 1.17a). Entretanto, ao analisarmos a retomada do crescimento das células, após esses mesmos tratamentos, vimos que a ausência de Rad51 compromete fortemente a recuperação da população de parasitos (Figura 1.17b). Ao passo que a linhagem selvagem se recupera com 48 e 72 horas, após o tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS, respectivamente, (Figura 1.15a) a linhagem Rad51 *-/-* só retoma o crescimento seis dias após a exposição a 0,5 mM de MMS, não sendo capaz de se recuperar na dose de 1,5 mM, durante o período de tempo analisado (Figura 1.17b).

a-)



b-)

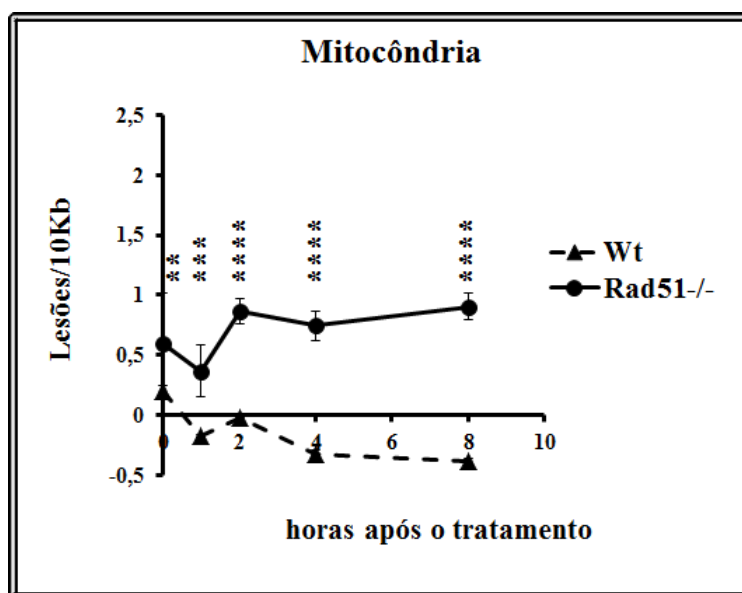
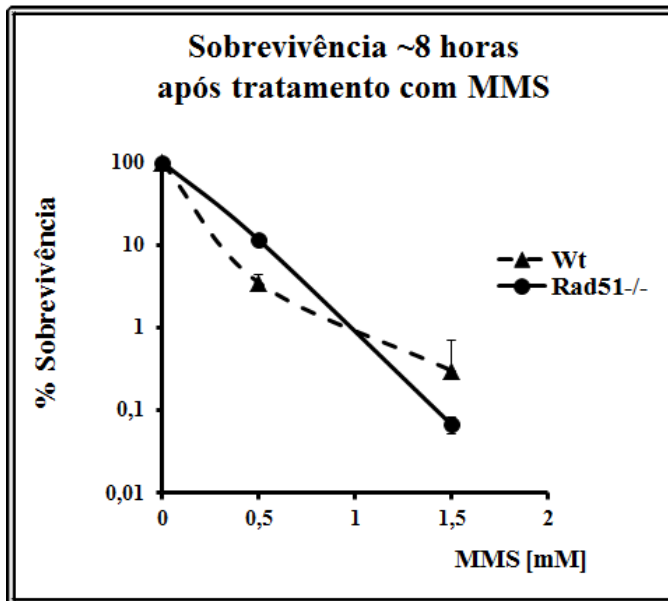


Figura 1.16: Curva da cinética de reparo, após o tratamento das formas sanguícolas selvagem (linhas tracejadas com triângulos) e Rad51 -/- (linha pretas com círculos) do *T. brucei* com MMS. a-) DNA nuclear. Tratamento com MMS, por 1 hora, a 0,5 mM para a linhagem Rad51-/- e a 1,5 mM para a linhagem Wt. b-) DNA mitocondrial. Tratamento com MMS a 0,5 mM, por 1 hora, tanto para a linhagem Wt, quanto para a linhagem Rad51-/. Cada ponto desta curva representa a média de duas réplicas biológicas, cujos valores de amplificação foram medidos independentemente duas vezes. Os valores de desvio padrão foram obtidos a partir das duas medições de cada uma das réplicas biológicas. \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* representam  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

a-)



b-)

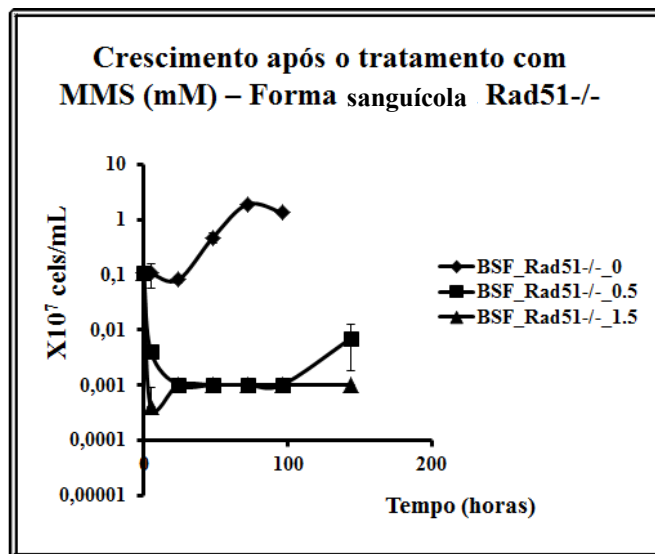


Figura 1.17: Tratamento com MMS da forma sanguícola do *T. brucei*, nocaute para o gene Rad51. a-) Curva de sobrevivência 8-10 horas, após tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora. Linha tracejada com triângulos e linha preta com círculos representam, respectivamente, a linhagem selvagem e a Rad51-/- da forma sanguícola do *T. brucei*. b-) Curva de crescimento da linhagem Rad51-/- da forma sanguícola do *T. brucei*, após tratamento com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos  $\times 10^6$  células/ml versus tempo em horas. Linha com losangos, quadrados e triângulos representam, respectivamente, o controle não tratado e as células tratadas com 0,5 e 1,5 mM de MMS por 1 hora. Estas curvas são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata.

## 1.5 Discussão

Neste capítulo da tese, apresentamos uma análise comparativa da resposta a danos no DNA, apresentada pelas formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*. Para isso, avaliamos a cinética de reparo nos genomas nuclear e mitocondrial de ambas as formas do parasito, após o tratamento com diversos agentes genotóxicos. Além disso, analisamos a recuperação e retomada do crescimento dessas formas do parasito, após a indução de danos no DNA.

Na primeira seção deste capítulo, detectamos diferenças entre a indução de danos no kDNA e no DNA nuclear, por irradiação com UV, assim como também observamos diferenças na indução de fotolesões, entre as diferentes formas do parasito. Entretanto, mais experimentos serão necessários para investigarmos se tais diferenças são derivadas de algum artefato da técnica, ou se elas realmente possuem alguma relevância biológica. Posteriormente, observamos que não houve reparo das lesões induzidas por UV, no núcleo da forma sanguícola do *T. brucei*, em até 10 horas após irradiação. A mesma ineficiência de reparo de fotolesões foi observada no núcleo de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Rajao, Tese de Doutorado; Figura 2.16c do capítulo 2). Já no DNA nuclear do procíclico, ocorre o reparo de cerca de 50% das lesões induzidas por UV, a partir do ponto de 5 horas pós-irradiação. Ao considerarmos o reparo no genoma mitocondrial do *T. brucei*, observamos que ambas as formas do parasito falham em remover este tipo de dano do kDNA, diferentemente do que foi visto em formas epimastigotas de *T. cruzi*, capazes de promover o reparo de fotolesões no DNA mitocondrial (Rajao, Tese de Doutorado). Mesmo ao observarmos o reparo de fotolesões no kDNA de *T. cruzi* e no núcleo da forma procíclica do *T. brucei*, concluímos que, de modo geral, o reparo deste tipo de dano não atua de maneira eficiente, nem em todo o conteúdo genético destes parasitos e nem durante todo o ciclo de vida dos mesmos. O reparo de baixa eficiência endereçado às fotolesões, presente em tripanossomatídeos, poderia ser atribuído a enzimas da família das fotoliasas, que atuam no reparo por reversão direta. *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* apresentam uma fotoliase semelhante às fotoliasas de fita simples, previamente classificadas como criptocromos DASH. Em *T. cruzi*, esta proteína está presente apenas nas formas epimastigotas do parasito, durante a fase logarítmica de crescimento, localizando-se nos dois lados do kDNA. Já *T. brucei* e *L.*

*major*, apresentam um tipo adicional de fotoliase, pertencente ao grupo de fotoliasas CPD classe I (Carolaing Gabaldon et al., 2009, Lucas-Lledo & Lynch, 2009). Entretanto, não se sabe se tais enzimas são efetivamente capazes de reverterem lesões geradas por UV, ou se as mesmas poderiam ter evoluído para alguma outra função em tripanossomatídeos, cuja pressão seletiva para reparo de fotolesões é mais fraca, quando comparada à pressão que tais danos representam para os cinetoplastídeos de vida livre. Alternativamente, a diversificação dos genes da via de reparo de fotolesões, com concomitante perda de função dos mesmos, pode ter ocorrido antes mesmo da divergência dos tripanossomatídeos, uma vez que a mesma ineficiência no reparo de lesões induzidas por UV foi observada em *Bodo saltans* (Sommaruga & Buma, 2000), um cinetoplastídeo de vida livre, representante do táxon mais próximo ao grupo dos tripanossomatídeos (Simpson, 2006).

Durante as primeiras 10 horas pós-irradiação com UVC, observa-se a morte de aproximadamente 50% da população de parasitos. Ocorre também intensa mortalidade em ambas as formas do parasito 24 horas após o tratamento, embora a morte observada na forma sanguícola tenha sido mais pronunciada. Tanto no procíclico, quanto na forma sanguícola, os parasitos sobreviventes à dose de  $30 \text{ J/m}^2$  são capazes de retomarem o crescimento da população 48 horas após a irradiação. O fato dos parasitos apresentarem reparo ineficiente das lesões geradas por UV, embora sejam capazes de retomarem o crescimento, levanta uma séria de implicações. Primeiramente, seria preciso determinar se há reparo dessas lesões, até o momento em que as populações de ambas as formas do parasito retomam o crescimento, ou seja, com 48 horas. Posteriormente, a recuperação das populações de parasitos, portando alta frequência de fotolesões tanto no DNA nuclear, quanto no DNA mitocondrial, implicaria no acionamento de mecanismos de tolerância à lesão, de modo a garantir a sobrevivência destas células. As lesões do tipo CPDs e 6-4 PPs, quando não reparadas, podem bloquear a atividade da RNA polimerase e da DNA polimerase. Em relação ao bloqueio da transcrição, propusemos no capítulo seguinte que duas proteínas do NER (CSB e XPBz) estariam envolvidas no processo de transcrição translesão, e que este processo seria livre de erros, promovendo a sobrevivência dos parasitos, ao resolverem o bloqueio da transcrição pela presença das fotolesões. Já em relação ao bloqueio da replicação do DNA, propomos que mecanismos de síntese translesão estejam ocorrendo, garantindo a conclusão da fase S, mesmo em um genoma repleto de fotolesões. No entanto, a

superexpressão de Pol $\eta$  em *T. cruzi*, responsável pela síntese translesão através de danos causados por UV, não confere vantagem para o parasito lidar com esse tipo de lesão (Moura et al., 2009). Todavia, esse fato não excluiria a possibilidade de que pequenas quantidades de Pol $\eta$  já seriam suficientes para que ocorresse, eficientemente, no DNA do *T. cruzi*, a via de síntese translesão através de CPDs e 6-4 PPs. Dessa forma, as cepas superexpressoras de Pol $\eta$  não apresentariam nenhuma vantagem, em relação à cepa selvagem, na sobrevivência à luz UV.

A indução de lesões pelo tratamento com cisplatina no kDNA é significativamente menor do que a indução no DNA nuclear da forma sanguícola, pelo menos em três das quatro doses testadas. O mesmo foi observado na forma procíclica, após o tratamento com 100  $\mu$ M de cisplatina por 1 hora. Na forma epimastigota de *T. cruzi*, não houve diferença entre o kDNA e o DNA nuclear, na curva dose resposta de indução de adutos por cisplatina. Pelo menos em células de ovário de hamster, a formação de adutos no DNA mitocondrial é maior, quando comparada à indução de danos no DNA nuclear, após exposição à cisplatina. Essa diferença, encontrada em células de mamíferos, é associada à maior eficiência de reparo do DNA nuclear, comparada à eficiência de reparo do DNA mitocondrial (Olivero et al., 1997). Entretanto, em outro estudo, utilizando o mesmo modelo celular, os níveis de dano induzidos por cisplatina nos DNAs nuclear e mitocondrial não apresentaram diferença (LeDoux et al., 1992). Já em *T. cruzi*, o reparo de lesões geradas por cisplatina no kDNA ocorre com eficiência similar ao reparo do DNA nuclear (Rajao, Tese de Doutorado). Em *T. brucei*, observamos que o reparo de adutos de cisplatina no kDNA ocorre com eficiência igual (no procíclico) ou maior (na forma sanguícola) à eficiência do reparo deste tipo de lesão no núcleo. A maior eficiência de reparo no kDNA, quando comparada a eficiência de reparo do nDNA (DNA nuclear), poderia explicar a menor frequência de lesões observadas no DNA do cinetoplasto.

Ao compararmos as eficiências de reparo de adutos de cisplatina, entre as duas formas do *T. brucei*, verificamos que o reparo na forma procíclica é muito menos eficiente, quando comparado ao reparo da forma sanguícola, tanto no nDNA, quanto no kDNA. O reparo eficiente de adutos de cisplatina é também evidenciado na forma epimastigota do *T. cruzi*, em que todas as lesões induzidas por esse composto são reparadas em 1 hora, tanto no núcleo, quanto na

mitocôndria (Rajao, Tese de Doutorado). Em mamíferos, o reparo de cisplatina é realizado no genoma nuclear pelo NER e pela recombinação homóloga (Wang & Lippard, 2005, Helleday et al., 2008), enquanto que no DNA mitocondrial, o reparo desse tipo de lesão é realizado apenas por essa última. Já em tripanossomatídeos, como discutiremos no capítulo a seguir, tal reparo seria realizado por uma subvia do NER, o TC-NER (reparo por excisão de nucleotídeos, acoplado à transcrição), no núcleo, e pela recombinação, na mitocôndria. Tal hipótese é baseada no fato de que várias proteínas chave do NER, em formas epimastigotas de *T. cruzi*, localizam-se apenas no núcleo, enquanto que várias proteínas de recombinação foram localizadas na mitocôndria (Rajao, Tese de Doutorado). Entretanto, o reparo de danos gerados por cisplatina, via recombinação, é provavelmente independente de Rad51, uma vez que a cepa de *T. brucei* nocaute para esta recombinase não apresenta maior sensibilidade à cisplatina (Passos-Silva, Tese de Doutorado). Poderíamos sugerir, dessa forma, que o TC-NER seria mais eficiente no DNA nuclear da forma sanguícola, quando comparado ao TC-NER no núcleo do procíclico. O mesmo valeria para o reparo recombinacional no kDNA, sendo mais eficiente no primeiro caso, ao ser comparado com o segundo.

Até o período inicial de 10 horas, após a exposição a 100  $\mu$ M de cisplatina, não há morte em nenhuma das formas do parasito. Após 24 horas do tratamento, observa-se intensa mortalidade apenas na forma sanguícola. As células sobreviventes retomam o crescimento após 72 horas. Enquanto isso, ocorre parada de crescimento da população do procíclico, por 72 horas pós-tratamento, porém praticamente não há morte dos parasitos. A princípio, tais resultados parecem paradoxais, uma vez que a forma do parasito que possui reparo mais eficiente é mais sensível, enquanto que a forma que repara menos eficientemente é mais resistente à cisplatina. Levando em consideração que 99% das lesões geradas por cisplatina são atribuídas a crosslinks na mesma fita, especulamos que tais lesões correspondam àquelas removidas durante a primeira hora de reparo através do NER. As lesões remanescentes, compostas por *crosslinks* entre diferentes fitas do DNA e que correspondem a 1% do total das lesões geradas por cisplatina, poderiam ser endereçadas para outra via de reparo. Ao persistirem até o momento da replicação, elas promoveriam a parada do ciclo celular, o que induziria morte na forma sanguícola, mas não na forma procíclica. Já no procíclico, ocorreria parada do crescimento, até que o reparo das lesões do tipo ICLs fosse concluído, ou alternativamente, mecanismos de tolerância à lesão

poderiam ser acionados, tal como a síntese translesão, resgatando a célula da morte. Sugerimos, com isso, que os mecanismos efetores da DDR em *T. brucei*, após exposição à cisplatina, são diferencialmente acionados entre as fases procíclica e sanguícola deste parasito.

A exposição por 15 minutos a uma faixa de 50-400  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio não gera lesões detectáveis no DNA nuclear, nem no DNA mitocondrial da forma sanguícola. Ao aumentarmos o tempo de exposição para 1 hora, sob as mesmas condições, detectamos lesões apenas no núcleo do parasito, mas não no DNA mitocondrial. A menor indução de danos no kDNA poderia estar associada à ação de peroxidases mitocondriais, que estão ausentes no núcleo do *T. brucei* (Schlecker et al., 2005). Isso difere do padrão observado em formas epimastigotas de *T. cruzi* que, após 15 minutos de exposição a 200 e 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi relatada a formação de lesões em ambos os genomas. Além disso, essas doses induzem, em *T. cruzi*, maior quantidade de danos no DNA nuclear do que no kDNA (Rajao, Tese de Doutorado). Em outros organismos, a relação de indução de danos entre DNA nuclear e mitocondrial, após exposição à água oxigenada, é diferente do observado em tripanossomatídeos. O tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz, em células de humanos e *C. elegans*, maior frequência de lesões no DNA mitocondrial do que no DNA nuclear (LeDoux et al., 1999, Hunter et al., 2012). Tais diferenças, observadas entre esses dois tripanossomatídeos, poderiam estar atribuídas a variações dos mecanismos de destoxificação de peróxido de hidrogênio, ocorridas ao longo do ciclo de vidas destes organismos, ou a variações nas eficiências de destoxificação entre esses dois parasitos, ou a variações nas eficiências de destoxificação entre o núcleo e a mitocôndria dos mesmos. A abundância de peroxidases, em tripanossomatídeos, é maior nas formas associadas ao hospedeiro vertebrado do que nas formas derivadas do inseto vetor (Comini et al., 2007, Gadelha et al., 2012). Entretanto, independentemente dessa diferença, a indução de lesões, após a exposição a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 1 hora, foi a mesma para ambas as formas do *T. brucei*, tanto no kDNA, quanto no DNA nuclear.

A eficiência de reparo dos danos gerados por água oxigenada foi menor, comparada à eficiência de reparo após o tratamento com cisplatina. A baixa eficiência de reparo das lesões geradas por peróxido de hidrogênio pode estar refletindo os danos gerados nas outras estruturas



celulares, além do DNA. O dano induzido em outras estruturas celulares que não o DNA pode ter sido causado pela intensa exposição a esse agente, para que pudéssemos detectar lesões nos ácidos nucleicos de uma célula, que pode ter um mecanismo muito eficiente de proteção do DNA contra a ação de ROS. Novamente, ao associarmos a resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aos perfis de resposta à cisplatina, os mecanismos de manutenção da integridade genômica são mais eficientes na forma sanguícola do que na forma procíclica. Essa diferença de eficiência é bastante evidente, ao observarmos a dinâmica de indução e reparo de danos no kDNA em ambas as formas. Em 1 hora após o tratamento, o nível de lesões no kDNA é maior no procíclico, comparado à forma sanguícola. Além disso, as lesões geradas indiretamente pelo estresse oxidativo são prontamente removidas, após 10 horas do período de recuperação, apenas nesta última.

Uma possível explicação, para a maior eficiência de reparo na forma sanguícola, seria a maior abundância de proteínas responsáveis pelas etapas limitantes do BER e do NER nesta forma do parasito. Além disso, modificações pós-traducionais nas proteínas chave destas vias poderiam contribuir para a modulação do funcionamento das vias de reparo entre as diferentes formas do parasito. A modulação das vias de reparo, dependente de diferenciação celular, é um fenômeno observado em células de mamíferos. Células-tronco adultas, ao se diferenciarem em células tecido-específicas, possuem menor habilidade em repararem lesões endereçadas ao BER e NER (Rocha et al., 2012). Por exemplo, células neurais progenitoras, durante o processo de diferenciação, diminuem a expressão das glicosilases OGG1 e Neil1, resultando em menor eficiência de remoção de 8-oxoguanina (Hildrestrand et al., 2007). O não funcionamento das vias longa e curta do BER também foi relatado em células musculares terminalmente diferenciadas. Tais células apresentaram menores níveis de XRCC1, DNA ligase III e DNA ligase I, além de acumularem maiores quantidades de quebras de fita simples e foci de  $\gamma$ -H2AX, após exposição ao peróxido de hidrogênio (Narciso et al., 2007). Em neurônios e macrófagos humanos, o GG-NER (subvia do NER, endereçada ao reparo global do genoma) é fortemente atenuado devido a um estado de hipofosforilação da enzima E1, ativadora de ubiquitina (Nospikel & Hanawalt, 2006).

Durante o período inicial, após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorre intensa mortalidade da forma sanguícola, enquanto que no procíclico ocorre a morte de cerca de 50% da população. Após 24 horas, este quadro se inverte, ocorrendo intensa mortalidade da forma procíclica, enquanto que a forma sanguícola começa a se recuperar. Em seguida, nota-se que a recuperação do crescimento da forma sanguícola é mais rápida, comparada a do procíclico. Neste caso, a maior eficiência de reparo apresentada pela forma sanguícola, em relação à procíclica, corresponde à recuperação mais rápida do crescimento na primeira forma do parasito, em detrimento à segunda. A exposição ao peróxido de hidrogênio induz morte celular programada em ambas as formas do *T. brucei*. Um dos fatores que está associado ao processo de morte celular programada neste parasito é a perda de motilidade (Ridgley et al., 1999). Após o tratamento da forma procíclica com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também observamos perda de motilidade na maior parte das células tratadas (dados não mostrados), igualmente aos resultados previamente publicados por Ridgley e colaboradores. O mesmo não foi observado na forma sanguínea, provavelmente porque a grande mortalidade apresentada por esta forma, logo nas primeiras horas pós-tratamento, tenha mascarado este fenômeno. Essa diferença de comportamento, entre as formas do parasito, poderia sugerir que os mecanismos de morte celular programada induzida por estresse oxidativo, atuam mais rapidamente na forma sanguícola, quando comparados aos da forma procíclica. Isso poderia ter implicações importantes, no que diz respeito à biologia do parasito e aos mecanismos empregados por ele, para lidar com as defesas dos hospedeiros vertebrado e invertebrado, durante o seu ciclo de vida.

No tratamento com MMS, a frequência de lesões geradas no kDNA foi menor do que a frequência de danos no DNA nuclear, em todas as doses testadas. Esse mesmo padrão de indução de danos, por MMS, foi descrito para *C. elegans*, embora, em células de ovário de hamster chinês, ocorra o contrário (Hunter et al., 2012, Pirsal & Bohr, 1993). A exposição a outro agente alquilante, o N-metil-N-nitrosourea (MNU), também induz maior quantidade de danos no DNA mitocondrial, do que no DNA nuclear (LeDoux, 1992). Tais diferenças também foram atribuídas a menor capacidade de reparo na mitocôndria, comparada à capacidade de reparo no núcleo, nas células de ovário de hamster chinês (Pirsal & Bohr, 1993). Já em formas epimastigotas de *T. cruzi*, não há diferenças entre a indução de danos no DNA nuclear e no kDNA (Rajao, Tese de Doutorado).

A dose de 1,5 mM é capaz de gerar grandes quantidades de lesões no DNA da forma sanguícola. No entanto, essa mesma dose não é suficiente para gerar lesões detectáveis no DNA do procíclico. Ao aumentarmos a faixa das doses de MMS, para analisar a formação de lesões no DNA do procíclico por esse composto, concluímos que, neste caso, tal processo não ocorre de maneira dose-dependente. A formação de lesões no DNA do procíclico somente pôde ser detectada em doses acima de 1,5 mM por 1 hora. Esse resultado sugere que o mecanismo de proteção apresentado pelo procíclico, contra o agente alquilante MMS, baseia-se na restrição do acesso desse agente ao DNA. Isso poderia ser feito através da exclusão do MMS do núcleo e da mitocôndria, ou por meio de interações desse composto com algum fator presente no citoplasma (Jenkins et al., 2005). Em procariotos, existe um operon relacionado à proteção contra agentes alquilantes, chamado de “Resposta Ada”. Neste operon, há uma proteína cuja função é pouco compreendida, a AidB, que pode estar relacionada à inativação de compostos alquilantes (Rippa et al., 2011). AidB é homóloga a proteína acetil-CoA desidrogenase (ACAD) de mamíferos, embora o papel desse homólogo na proteção contra agentes alquilantes não tenha sido estabelecido (Landini & Volkert, 2000). É provável que a forma procíclica do *T. brucei* possua proteínas responsáveis pela inativação de agentes alquilantes e que essas supostas proteínas sejam menos expressas na forma sanguícola. Isso seria de grande relevância biológica para o parasito, visto que a forma procíclica do *T. brucei* é mais sujeita a condições de estresse nutricional, comparada à forma sanguícola, uma vez que a mesma encontra-se no intestino médio do hospedeiro invertebrado. O estresse nutricional é um fator ambiental conhecido por elevar os níveis de S-adenosilmetionina (Pluskal et al., 2011), o mais eficiente agente alquilante produzido endogenamente. Dessa forma, os elementos que conferem proteção contra MMS, vistos na forma procíclica do *T. brucei*, podem estar refletindo mecanismos fisiológicos de proteção contra a alquilação por S-adenosilmetionina, gerada em condições de estresse nutricional no hospedeiro invertebrado.

O tratamento com MMS induz intensa mortalidade na forma sanguícola, que ocorre logo nas primeiras horas do período de recuperação. A recuperação do crescimento, nesta forma do parasito, após exposição às doses de 0,5 e 1,5 mM por 1 hora, ocorre respectivamente, com 72 e 96 horas pós-tratamento. Entretanto, a resposta do procíclico à exposição ao MMS é muito diferente, uma vez que tais condições não causam morte nesta forma. Embora a dose de 1,5 mM

não induza morte na população de procíclicos, nem induz quantidades detectáveis de lesões no DNA dessas células, eles ficam inaptos a retomarem o crescimento. O MMS é capaz de ativar vias de sinalização envolvidas com a resposta celular à genotoxinas, independentemente da presença de lesões no DNA (Fritz & Kaina, 2006). Uma vez ativadas, tais vias de sinalização poderiam induzir a parada do ciclo celular. Isso poderia estar relacionado à parada do crescimento do procíclico, mesmo na ausência de lesões no DNA, após o tratamento com 1,5 mM de MMS. Alternativamente, mesmo um baixo número de lesões gerado pela exposição de 1,5 mM de MMS, por 1 hora, poderia ser suficiente para induzir a parada do crescimento na forma procíclica. O perfil da DDR, após exposição ao MMS, foi similar aos resultados observados no tratamento com cisplatina, em que a indução de dano por tais agentes induzem morte na forma sanguícola, mas não na forma procíclica.

O reparo das lesões geradas por MMS na forma sanguícola possui pelo menos duas etapas distintas: uma mais rápida, independente de Rad51, que ocorre na 1ª hora de recuperação; e outra mais lenta, dependente de Rad51, que ocorre a partir de 4 horas de recuperação. As lesões geradas pela alquilação de bases nitrogenadas são tipicamente reparadas pelo BER (Fu et al., 2012). Entretanto, células de *T. brucei* nocautes para AP- endonuclease 1 não apresentam sensibilidade a MMS (Charret et al., 2011). Considerando que os sítios abásicos (AP), gerados após a remoção da base nitrogenada, são mais citotóxicos do que a lesão original, era de se esperar que a ausência da APE-1 induziria sensibilidade a agentes alquilantes, por promover o acúmulo de seu substrato. Este fato poderia indicar que o reparo de bases alquiladas na forma sanguícola do *T. brucei*, correspondendo à etapa rápida do reparo de lesões geradas por MMS, seria catalisado pelo NER. Trabalhos recentes indicam que CSB e XPC (proteínas chave do NER) participam do reparo de lesões geradas por MMS, via TC-NER, o que corrobora com a nossa hipótese (Kanamitsu & Ikeda, 2011). Além disso, a linhagem de *T. brucei*, silenciada para TbCSB, apresenta maior sensibilidade ao MMS (dados não mostrados). Dessa forma, sugerimos que a etapa rápida de reparo das lesões geradas por MMS possa estar relacionada à ação do NER, que ocorre em 1 hora após o tratamento. Entretanto, especulamos que, de alguma forma, o reparo das lesões geradas por MMS não tenha sido totalmente concluído até o ponto de 1 hora pós-tratamento, visto que a frequência de danos aumenta após este ponto. Esse aumento do número de lesões, dessa forma, poderia estar relacionado ao processamento dos

danos no DNA remanescentes do ponto de 1 hora pós-tratamento. Além disso, o aumento no número de lesões, situado no intervalo de 1-4 horas após exposição ao MMS, poderia, por outro lado, estar relacionado à intensa mortalidade, observada na população de parasitos, durante esse período (dados não mostrados). A menor frequência de lesões, da linhagem nocaute para Rad51, no ponto de 4 horas após exposição ao MMS, talvez esteja relacionada ao papel exercido por esta proteína ao inibir o reparo recombinacional, durante a fase S, dos *gaps* gerados frente ou às lesões de bases alquiladas, ou frente aos sítios abásicos derivados destas lesões (Gonzalez-Prieto et al., 2013). Já no ponto de 10 horas, após exposição ao MMS, a ausência de Rad51 resultaria na deficiência do reparo de quebras duplas, decorrentes do colapso da forquilha de replicação, após as lesões geradas por alquilação persistirem até a fase S (Fu et al., 2012). Ou alternativamente, a ausência de Rad51 inviabilizaria o reparo, por recombinação homóloga, dos *gaps* mantidos até a fase G2 (González-Prieto, 2013). Ambos os cenários explicariam, com isso, a maior frequência de lesões vista no núcleo da linhagem Rad51 *-/-*, quando comparada à linhagem selvagem, durante o ponto de 10 horas após exposição ao MMS. A ausência de Rad51, na forma sanguícola do parasito, também afetou o reparo do kDNA, após exposição a MMS. Embora não haja nenhuma evidência sobre a localização de Rad51 na mitocôndria do *T. brucei*, mesmo após a exposição do parasito a agentes genotóxicos, essa possibilidade ainda não pode ser descartada. A localização de Rad51 entre os tripanossomatídeos é variável. Em *T. brucei*, não há sinal de marcação da proteína por microscopia de fluorescência, em parasitos não tratados. Após tratamento com agentes radiomiméticos, ocorre a formação de foci nucleares desta proteína (Hartley & McCulloch, 2008, Trenaman et al., 2012). Em *L. infantum*, a Rad51 é endereçada para o núcleo, de maneira dependente de BRCA2, mesmo na ausência de danos no DNA (Genois et al., 2012). Já em *T. cruzi*, Rad51 encontra-se espalhada pelo corpo do parasito e acumula-se no núcleo, após a indução de quebras duplas no DNA (Passos-Silva, Tese de Doutorado). Nenhum desses trabalhos, entretanto, exclui a possibilidade de que pequenas quantidades de Rad51 possam estar na mitocôndria desses parasitos, tanto na ausência de dano, quanto após a exposição a outros agentes genotóxicos não-radiomiméticos. Apesar do papel de Rad51 durante a recombinação homóloga no núcleo de células eucariotas ser muito bem caracterizado, a presença dessa proteína, bem como a atuação dessa via, foram descritas apenas recentemente na mitocôndria de células humanas (Sage et al., 2010).

O formato da curva de cinética de reparo da cepa Rad51<sup>-/-</sup>, após dano induzido por MMS no núcleo do parasito, está condizente com o perfil de crescimento dessa linhagem, após exposição a esse agente, uma vez que a ausência de Rad51<sup>-/-</sup> não interfere na primeira etapa do reparo, nem na percentagem de morte, ocorrida logo nas primeiras horas. Entretanto, a permanência das lesões, após o ponto 8-10 horas, corresponde à incapacidade dessa cepa em retomar o crescimento nos dias subsequentes.

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem que o *T. brucei* apresenta diferenças, durante o seu ciclo de vida, na maneira como ele administra a resposta a danos no DNA. De modo geral, a forma sanguícola do parasito apresenta maior eficiência de reparo de DNA, em relação à forma procíclica. Além disso, todos os tratamentos empregados induzem morte nesta primeira forma do parasito, mas não necessariamente naquela última. Vários mecanismos da biologia celular e molecular, que variam ao longo do ciclo de vida do parasito, poderiam estar envolvidos na regulação diferencial da resposta a danos no DNA, entre as formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*. Entre eles, citaremos alguns mecanismos que apresentam diferenças substanciais entre as formas do *T. brucei*, e que em outros organismos, estão associados à modulação da DDR.

A base J, exclusiva de tripanossomatídeos e de alguns grupos relacionados, ocorre apenas na forma sanguícola, mas não na forma procíclica do *T. brucei* (Borst & Sabatini, 2008). O intermediário metabólico da base J, a 5- hidroximetiluracila, é reconhecido como lesão no genoma de outros organismos. O uso de 5- hidroximetiluracila, como intermediário na síntese de base J, poderia estar associado à perda de homólogos funcionais para a glicosilase TDG, e consequentemente, à deficiência de reparo de eteno-citosina em tripanossomatídeos, uma lesão altamente mutagênica (Ulbert et al., 2004). A ausência de base J em uma das fases do ciclo de vida é uma característica exclusiva de *T. brucei*, não sendo observada em *T. cruzi* e *Leishmania* spp, e que nos leva a especular se tal característica estaria em função de alguma modificação no funcionamento do BER, ao longo do ciclo de vida deste parasito.

O metabolismo energético da forma sanguícola é centrado na via glicolítica, que ocorre dentro dos glicosomos, enquanto que no procíclico, a fosforilação oxidativa é a principal via de obtenção de energia. Além disso, a expressão de peroxidases na forma associada ao hospedeiro vertebrado é maior, quando comparada à expressão na forma procíclica (Comini et al., 2007). Isso traria uma vantagem citoprotetora à forma sanguícola, quando comparada à forma procíclica, já que a primeira estaria menos exposta ao efeito tóxico das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, derivadas do metabolismo oxidativo, que induzem danos no DNA (Rocha et al., 2012). A menor quantidade de lesões geradas pelo estresse oxidativo, na forma sanguícola, poderia, dessa forma, estar associada à otimização do reparo de DNA, ou à maior eficiência de remoção das lesões, observados nesta forma do parasito.

Na forma sanguícola, a expressão de HSPs (*heat shock proteins*) é de 25 a 100 vezes maior, quando comparada à expressão na forma procíclica. A maior expressão de HSPs, nas formas associadas ao hospedeiro vertebrado, poderia implicar em adaptação à diferença de temperatura, entre os hospedeiros vertebrado (37° C) e invertebrado (28° C) (Van der Ploeg et al., 1985). A indução da expressão de HSPs está associada, em células de mamíferos, à resistência a drogas quimioterápicas e irradiação gama, sobretudo devido a ativação de mecanismos anti-apoptóticos (Calderwood et al., 2006). Embora a forma do *T. brucei*, cuja expressão de HSPs está aumentada, seja exatamente a forma mais sensível a agentes genotóxicos, a correlação entre essa família de proteínas e a DDR em tripanossomatídeos seria um tópico para investigações futuras.

O controle do ciclo celular é regulado diferencialmente entre as formas do parasito, visto que apenas no procíclico há perda do *checkpoint* entre mitose e citocinese. Mesmo que a mitose seja bloqueada, o procíclico prossegue com a cinetocinese, originando células anucleadas, ou zoóides (Hammarton, 2007). Tais mecanismos de controle do ciclo celular, diferencialmente regulados nas formas sanguícola e procíclica do *T. brucei*, poderiam explicar as diferenças de parada de crescimento e indução de morte nestas formas do parasito, após a indução de estresse genotóxico.

A diferença da resposta a danos no DNA entre as formas do *T. brucei* também poderia ser um reflexo da estratégia de sobrevivência, que este parasito possui para evadir o sistema imunológico adquirido do hospedeiro vertebrado, ou seja, o mecanismo de troca de VSGs. Esse mecanismo é adaptado para que o parasito recolonize o hospedeiro, desde que ocorra a sobrevivência de pelo menos uma célula. Com isso, especulamos que a forma sanguícola do *T. brucei* tenha evoluído para duplicar o seu genoma com o mínimo controle sobre a replicação, reprimindo mecanismos celulares que bloqueiem o crescimento. Isso seria potencialmente deletério, pois implicaria em grande instabilidade genômica, dependente de danos no DNA, a menos que os sistemas de reparo permanecessem exacerbadamente ativados. Já a forma procíclica, presente no hospedeiro invertebrado, que é desprovido de imunidade adquirida, manteria o perfil clássico de DDR, ativando o checkpoint dependente de danos no DNA, até que o reparo fosse concluído.

A análise comparativa da resposta a danos no DNA, entre diferentes formas do ciclo de vida de *T. brucei*, realizada nesta parte do trabalho, abre uma importante discussão sobre como as vias do metabolismo de DNA poderiam estar adaptadas, nestes organismos, para o modo de vida parasitário. O estudo dessas vias, em tripanossomatídeos, possui grande importância para o entendimento da evolução dos sistemas empregados pelos seres vivos na manutenção da estabilidade genômica, já que este grupo representa um ramo altamente divergente dos principais eucariotos modelo. Além disso, a caracterização das vias de metabolismo de DNA, encontradas nestes organismos causadores de doenças em humanos e animais, possibilitaria a descoberta de novos meios de combate às doenças causadas por eles.



## 1.6 Perspectivas

Identificar as proteínas chave, que estão regulando diferencialmente a resposta a danos no DNA, nas diferentes formas do *T. brucei*. Para isso, faríamos o silenciamento de genes chave das principais vias de reparo pré-replicacional (TbXPG para o TC-NER, DNA polimerase beta para o BER) e das vias de sinalização após o dano no DNA (ATM, ATR, CHK1, CHK2), tanto na forma procíclica, quanto na forma sanguícola, avaliando o crescimento e a frequência de lesões, em cada uma destas linhagens geradas, na presença e ausência de agentes genotóxicos.

Avaliar se nas culturas que apresentam parada do crescimento, após tratamento com agentes genotóxicos, há atraso em alguma fase do ciclo celular.

Avaliar se há alguma evidência de morte celular programada (exposição de fosfotidilserina, perda do potencial de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA genômico), em ambas as formas do parasito, após a exposição aos agentes genotóxicos.

## Capítulo 2: Caracterização do NER em *T. brucei*: especialização do reparo acoplado à transcrição em função da transcrição multigênica

### 2.1 Introdução

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é responsável por remover uma ampla variedade de lesões no DNA, incluindo adutos volumosos covalentemente ligados ao DNA e outras formas de dano que distorçam a estrutura da dupla hélice (Naegeli & Sugawara, 2011). Defeitos do NER em humanos estão associados à síndrome de alta propensão ao câncer, *Xeroderma Pigmentosum* (XP) e a síndromes que comprometem o desenvolvimento, Síndrome de Cockayne (CS) e Tricotiodistrofia (TTD) (Emmert et al., 2009, Vermeulen et al., 2001, Lehmann, 2001, Cameroni et al., 2010). O NER é constituído por duas sub-vias: reparo por excisão de nucleotídeos no genoma global (GG-NER), que detecta lesões distribuídas em todo o genoma; e reparo acoplado à transcrição (TC-NER), que reconhece lesões capazes de bloquear a RNA polimerase em genes transcricionalmente ativos (Naegeli & Sugawara, 2011) (Figura 2.1).

Durante o GG-NER em humanos, a proteína XPC, juntamente com as proteínas RAD23 e centrina-2 (Araujo et al., 2000, Mu et al., 1995, Araki et al., 2001, Nishi et al., 2005), reconhecem segmentos de fita simples de DNA associados a lesões que distorcem a estrutura da dupla hélice (Min & Pavletich, 2007).

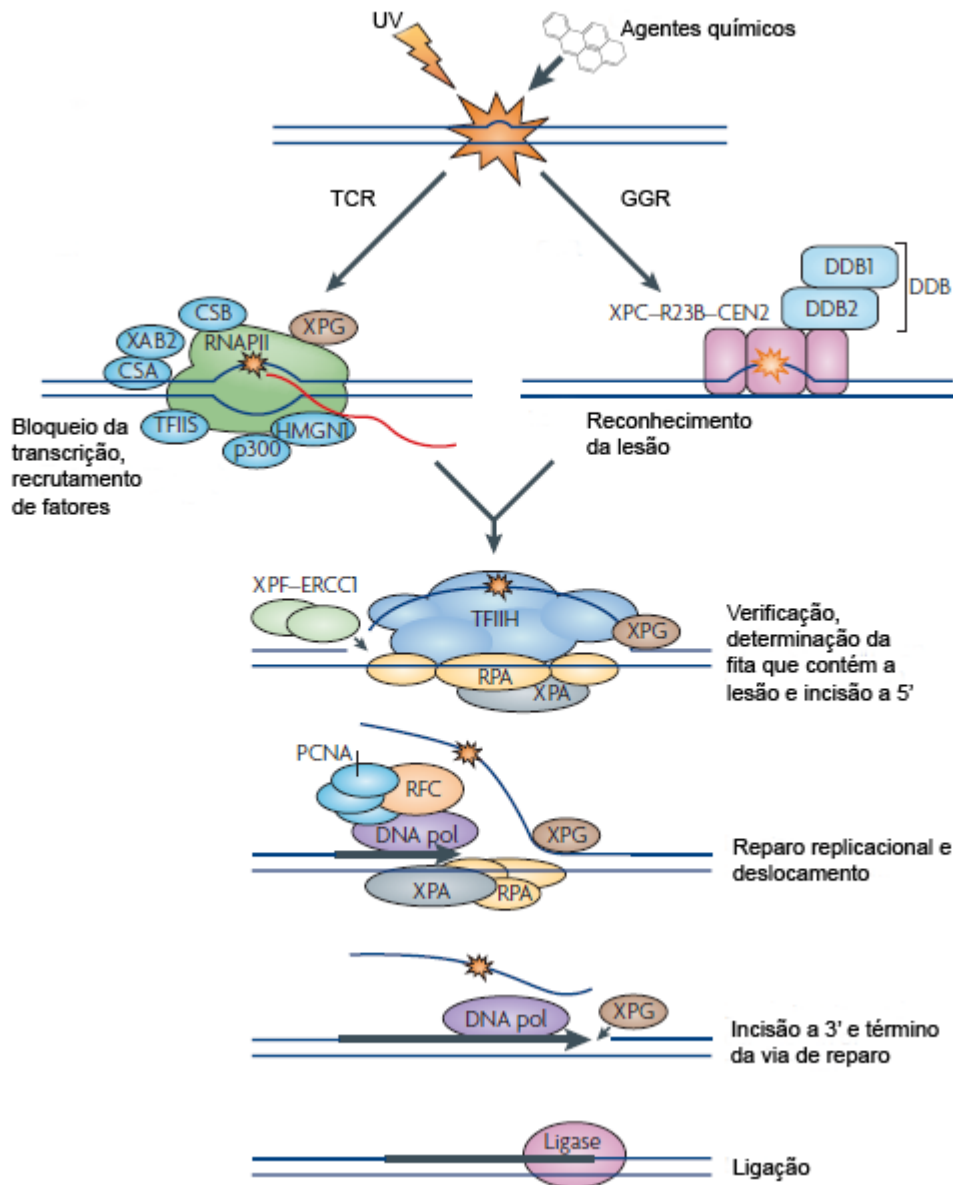


Figura 2.1: Provável sequência de eventos do TC-NER e GG-NER em mamíferos. As lesões são inicialmente reconhecidas tanto pelo bloqueio da RNA polimerase, no caso do TC-NER; quanto pela ligação da proteína DDB2 (XPE). Essa proteína forma um dímero, com a proteína DDB1, conhecido como complexo DDB. A detecção de lesões no DNA, durante o GG-NER, pode ocorrer com ou sem a participação do complexo XPC, RAD23B e centrina-2. Após a etapa de reconhecimento, as subvias do NER convergem para o recrutamento de TFIIH, contendo as helicases XPB e XPD e endonucleolase XPG. RPA e XPA estabilizam a bolha então formada, ao protegerem o trecho de DNA fita simples. O dímero XPF-ERCC1 cataliza a incisão a 5' da lesão, enquanto que a XPG promove a incisão a 3'. RFC auxilia no recrutamento do PCNA, promovendo a acomodação das DNA polimerases  $\delta$ ,  $\epsilon$  e/ou  $\kappa$ , que executarão o reparo replicativo. Na etapa final, a ligação do DNA é realizada pela ligase I ou ligase III. Modificado de Hanawalt & Spivak, 2008.

O recrutamento de XPC aos sítios de lesão pode ser auxiliado pelo dímero UV-DDB, composto pelas proteínas DDB1 e DDB2 (ou XPE), sendo que esta última reconhece especificamente lesões induzidas por UV (Chu & Chang, 1988, Feldberg & Grossman, 1976). Após o reconhecimento da lesão por XPC e UV-DDB, ocorre a associação do fator de transcrição TFIIH ao local do dano no DNA. O fator de transcrição TFIIH é um complexo composto por dez diferentes proteínas, dividido em dois sub-complexos: o cerne, contendo as helicases XPB e XPD, além de mais cinco outras proteínas associadas (p62, p52, p44, p34 e p8/TTD-A); e o CAK, complexo ativador de cinase (Compe & Egly, 2012). TFIIH é então recrutado pela interação de XPC com as proteínas XPB e p62, iniciando o processo de excisão pela abertura da dupla hélice em torno do sítio de dano. Tanto XPB, quanto XPD, atuam nesse processo, em que XPD é crucial para a atividade de helicase e XPB promove a hidrólise de ATP (Oksenysh & Coin, 2009). Após a separação das fitas do DNA, ocorre a associação de RPA, para assegurar a estabilização da bolha. XPA é também recrutada com o propósito de estabilizar o complexo TFIIH-XPC e promover a liberação do sub-complexo CAK, o que coincide com a chegada das endonucleases XPF/ERCC1 e XPG, que realizarão, respectivamente, incisões a 5' e a 3' da lesão, levando à remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão. O corte a 3' da lesão ocorre após o recrutamento de RFC (Replication Factor C) e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), que coordenarão o acesso da maquinaria de replicação ao sítio de reparo. O preenchimento do espaço deixado pela saída do oligonucleotídeo contendo a lesão é realizado pelas DNA polimerases delta (Pol $\delta$ ) e kappa (Pol $\kappa$ ), em células quiescentes, e pela DNA polimerase épsilon (Pol $\epsilon$ ), nas células em divisão (Ogi et al., 2010). Após a ação das DNA polimerases, as quebras remanescentes são seladas pelas DNA ligases I e III, respectivamente, em células em divisão e nas células quiescentes (Fagbemi et al., 2011).

O TC-NER difere do GG-NER durante o passo de reconhecimento da lesão no DNA, o qual é realizado através da identificação, em genes transcricionalmente ativos no genoma, da parada da RNA polimerase no sítio da lesão. O bloqueio da RNA polimerase II, e talvez da RNA Polimerase I, pela lesão no DNA aumenta a sua afinidade com a proteína CSB (Cockayne syndrome type B), uma SNF2 ATPase, que possivelmente atua como a proteína Mfd bacteriana ao estimular a translocação da RNA polimerase ao longo da fita de DNA, permitindo com que o complexo TFIIH tenha acesso ao local do dano (Hanawalt & Spivak, 2008). A partir desse

passo, as sub-vias TC-NER e GG-NER convergem para a mesma via bioquímica. No caso do TC-NER, a transcrição pode ser abortada, caso a RNA polimerase se desligue da fita molde, ou pode retornar, caso o complexo enzima-substrato mantenha-se estável, o que pode requerer a ação de CSA, que provavelmente possui ação antagônica a CSB (Hanawalt & Spivak, 2008). A interação de XPG com CSB e a RNA polimerase II também poderia permitir com que o NER ocorra sem a liberação da RNA polimerase (Sarker et al., 2005). Entretanto, caso não ocorra a remoção das lesões pelo NER, a RNA polimerase pode inserir nucleotídeos frente às lesões e estender além do sítio da lesão de forma propensa a erros. Tal processo é descrito como mutagênese transcricional (TM), em que a transcrição através da fita molde danificada levaria à formação de transcritos contendo mutações. Embora a produção de transcritos contendo mutações possa ser tóxico para a célula, este processo regata as células da morte, uma vez que a parada da RNA polimerase é um forte sinal para a apoptose (Saxowsky & Doetsch, 2006, Bregeon & Doetsch, 2011).

A via de NER é amplamente conservada nos tripanossomatídeos, embora o sequenciamento do genoma desses parasitos tenha revelado pequenas diferenças em relação a outros organismos onde esta via é bem caracterizada. Por exemplo, ao compararmos a via de NER dos tripanossomatídeos com a de outros organismos, observamos a ausência de ortólogos para as proteínas XPA, CSA e DDB2, sendo que esta última constitui a subunidade menor do dímero UV-DDB (Ivens et al., 2005, El-Sayed et al., 2005, Berriman et al., 2005). Além disso, é possível identificar duas proteínas similares a XPB, nomeadas como XPB e XPBz (Lecordier et al., 2007). Outra diferença perceptível é a ausência do complexo CAK em TFIIH, que em tripanossomatídeos está associado a duas proteínas exclusivas desse grupo, denominadas TSP1 e TSP2 (Lee et al., 2009). As implicações dessas alterações para o funcionamento do NER em tripanossomatídeos ainda são desconhecidas, visto que a dissociação de CAK do complexo TFIIH é um passo crítico para o recrutamento de XPF-ERCC1 e XPG ao sítio da lesão (Coin et al., 2008, Svejstrup et al., 1995). O NER em tripanossomatídeos deve operar em um cenário muito particular em relação ao que acontece nos demais eucariotos, uma vez que a maior parte de seus genes, que codificam para proteínas, está organizada em unidades policistrônicas, as quais não apresentam sequências típicas de promotores reconhecidos pela RNA polimerase II. Tais unidades, ao serem transcritas pela RNA pol II, geram um único transcrito primário

multigênico, que originará mRNAs maduros, através do processo de trans-splicing (Daniels et al., 2010, Teixeira et al., 2012) (Figura 2.2). Em consequência da ausência de promotores para RNA pol II, a transcrição desses policistrons ocorre de forma constitutiva ao longo de todo o genoma (Siegel et al., 2009). Esse modo de expressão gênica parece ser único entre protozoários da família *Trypanosomatidae*. No caso dos genes codificadores das proteínas variantes de superfície (VSGs), presentes no genoma do *T. brucei*, essa unidade de transcrição poliscistrônica é ainda mais peculiar, pelo fato de ser transcrita pela RNA polimerase I, que transcreve somente genes codificadores de rRNAs nos demais eucariotos (Teixeira et al., 2012).

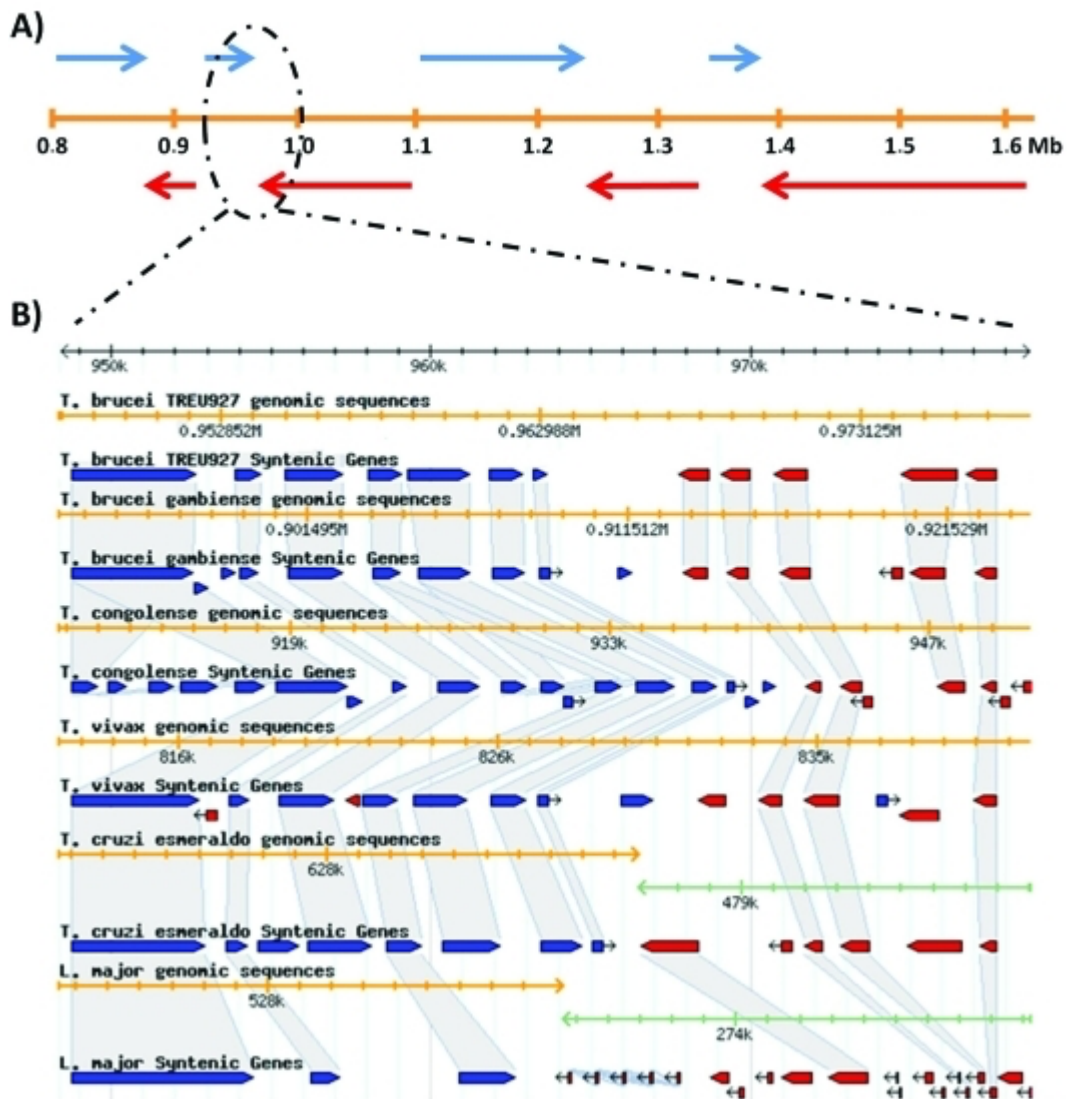


Figura 2.2: Organização dos genes nos genomas dos TriTryps. a-) Distribuição de oito unidades de transcrição policistrônica (setas azuis: fita senso e setas vermelhas: fita anti-senso) em uma região de 0,8 Mb do cromossomo 5 do *T. brucei*. b-) Visão detalhada de um trecho de cerca de 30 kb, localizado dentro da região representada em a-), destacando a sintenia gênica entre os genomas de diferentes tripanossomatídeos (setas azuis e vermelhas correspondem, respectivamente, às ORFs das fitas senso e anti-senso). Modificado de Teixeira et al., 2012.

Esta aparente perda de controle pré-transcricional é única, considerando-se que a presença de um promotor para cada gene, com níveis variados de ativação desses promotores que, conseqüentemente, implicam em diferentes taxas de transcrição de cada gene, constituem o padrão de controle da expressão gênica mais comum entre os eucariotos. As conseqüências dessa forma de organização gênica para a manutenção da integridade genômica são pouco compreendidas, visto que colisões entre as maquinarias de replicação e transcrição, em genes transcritos durante a fase S do ciclo celular, estão associadas com instabilidade cromossômica. Foi visto em bactérias e humanos, por exemplo, que a replicação e a transcrição evoluíram, em genes altamente expressos, de modo a ocorrerem na mesma direção (Kim & Jinks-Robertson, 2012). Entretanto, em *T. brucei*, foi demonstrado que as maquinarias de replicação e transcrição atuam em sentidos contrários, diminuindo a eficiência de ambos os processos, o que conseqüentemente, aumenta o custo energético para a manutenção do genoma (Tiengwe et al., 2012).

Neste capítulo, abordaremos como a organização genômica peculiar dos tripanossomatídeos influencia no funcionamento do NER. A princípio, poderia ser predito que a passagem da RNA polimerase pelos genes distais do início de uma unidade transcricional multigênica possuiria maior probabilidade de se deparar com lesões no DNA, quando comparada à passagem realizada em genes localizados em regiões proximais, ou em regiões de troca de fitas entre duas unidades transcricionais multigênicas distintas. Corroborando com essa hipótese, foi observado que, após o tratamento com UV, a transcrição de genes de VSGs que estavam posicionados na região mais distante do promotor de RNA polimerase I foi mais inibida do que a transcrição de ESAGs (*Expression Site Associated Genes*), localizados na mesma unidade de transcrição policistrônica, porém situados mais próximos ao promotor (Johnson et al., 1987, Coquelet et al., 1989). Esse mesmo efeito também foi observado em genes transcritos pela RNA polimerase II, situados em unidades de transcrição multigênicas, após a exposição à radiação UV (Martinez-Calvillo et al., 2004, Martinez-Calvillo et al., 2003). Em condições normais, ou na ausência de irradiação com UV, os níveis de mRNA dos genes de uma mesma unidade de transcrição multigênica não são afetados pela distância de cada gene em relação ao promotor (Poon et al., 2012, Morgante et al., 2005). Com base nessas observações, pretendemos nesta parte do trabalho determinar se, e como, o NER poderia contribuir para a manutenção da



expressão e função de genes organizados em estruturas transcricionais policistrônicas. Para responder a essa questão, utilizamos a estratégia de silenciamento, por RNAi, dos principais genes do NER, expressos na forma sanguícola do *T. brucei*, e analisamos o impacto desse silenciamento, tanto na presença, quanto na ausência de agentes genotóxicos, na sobrevivência dos parasitos e na abundancia de mRNAs derivados de uma unidade policistrônica transcrita pela RNA polimerase II. Além disso, avaliamos a cinética de reparo em células expostas a UV e cisplatina, agentes que causam lesões que, na maioria dos eucariotos, são reparadas pelo NER.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo geral

Caracterização funcional do NER em *Trypanosoma brucei*.

### 2.2.2 Objetivos específicos

Análisar o fenótipo de linhagens da forma sanguícola do *T. brucei*, por meio de ensaios de sobrevivência, após exposição a agentes genotóxicos, com concomitante silenciamento, por RNAi, dos genes que codificam para os principais componentes da via de NER (TbXPC, TbXPE, TbXPB, TbXPBz, TbXPD, TbXPF, TbXPG, TbERCC1 e TbCSB).

Análise do perfil de expressão gênica nas linhagens do parasito silenciadas para os principais componentes da via de NER (TbXPC, TbXPE, TbXPB, TbXPBz, TbXPD, TbXPF, TbXPG, TbERCC1 e TbCSB), na presença e ausência de danos no DNA.

## 2.3 Material e Métodos

### 2.3.1 Cultivo dos parasitos

A forma sanguícola do *T. brucei*, cepa Lister 427, foi cultivada conforme descrito no capítulo anterior.

### 2.3.2 RNAi

Os iniciadores utilizados nas construções do RNAi foram desenhados de modo a amplificarem um trecho da sequência alvo, selecionado pelo programa disponível no endereço ([http://trypanofan.path.cam.ac.uk /software/RNAit.html](http://trypanofan.path.cam.ac.uk/software/RNAit.html)). A cada iniciador *forward* e *reverse*, foram adicionados, respectivamente, os sítios de recombinação Attb1 e Attb2. As sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os cassetes de RNAi, estão na Tabela 1. Todos os iniciadores foram comprados da empresa Eurofins MWG Operon ([www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com)). Os produtos de PCR flanqueados pelos sítios Attb1 e Attb2 foram utilizados em uma única reação, permitindo com que os mesmos fossem inseridos em direções opostas no vetor pGL2084 (Figura 2.3), uma versão modificada do vetor pRPa<sup>isl</sup>, desenvolvida por Alsford e Horn em 2008 (Alsford & Horn, 2008). Desse modo, obtivemos as construções necessárias para a geração de estruturas em grampo (stem-loop), que promoverão a indução do RNAi. Para a mistura de PCR, utilizamos tampão Phusion 1x, 0,2 mM de dNTPs, 50 ng de DNA genômico de *T. brucei*, 2 µM de cada iniciador e 20 u mL<sup>-1</sup> de enzima Phusion (Invitrogen). O programa para as reações de PCR consistiu na incubação da reação por 3 minutos a 98°C, seguidos de 30 ciclos de 98°C / 30 seg, 60°C / 30 seg e 72°C / 30 seg e 10 min a 72°C.

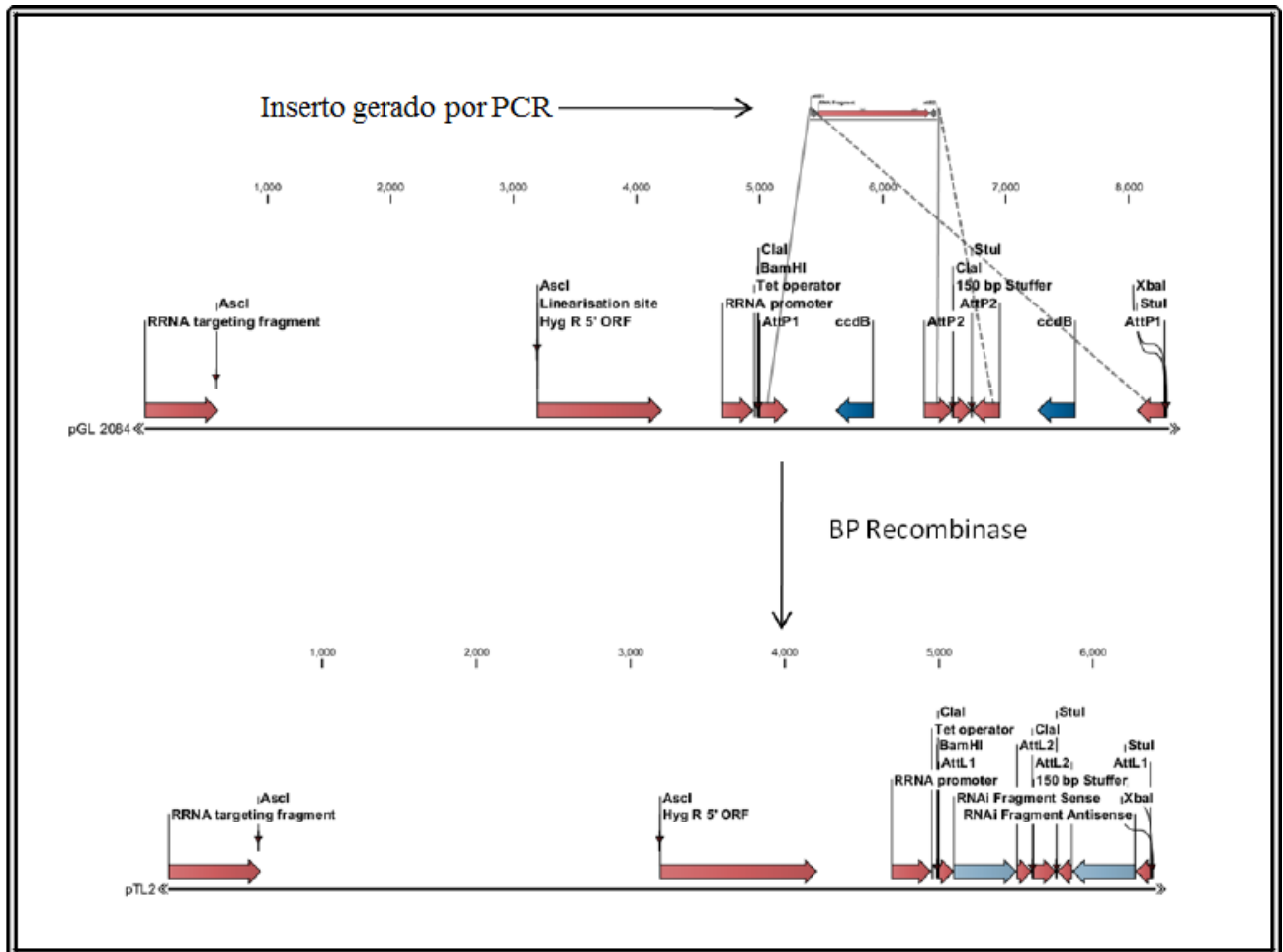


Figura 2.3: O vetor pGL2084. O amplicon gerado por PCR e flanqueado pelos sítios de reconhecimento Attb1 e Attb2 da BP clonase é recombinado em direções opostas, de modo a gerar as fitas senso e anti-senso do cassette de RNAi, induzível por tetraciclina. Os sítios de restrição acima indicados podem ser usados para a confirmação da inserção correta dos produtos de PCR e para a linearização do vetor, antes da transfecção. 150 pb stuffer: fragmento de 150 pb do gene lac Z, correspondente à região espaçadora; Tet operator: operador do operon Tet; RRNA promoter: promotor de RNA ribossômico; ccdB: gene letal para a cepa de *E. coli*, que foi utilizada durante a transformação dos produtos de reação da BP clonase. Modificado de Jones (dados não publicados).

Para a reação de montagem do vetor de RNAi foram utilizados  $\geq 10$  ng de produto de PCR, 150 ng do vetor pGL2084, 0,25  $\mu$ L da mistura da enzima BP Clonase™ (Invitrogen), Tris-HCl a 3,75 mM e EDTA a 375  $\mu$ M (pH 8,0). A mistura de reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  de máxima eficiência (Invitrogen Cat. No. 18258-012) foi utilizado 1  $\mu$ L da mistura de reação da BP clonase. Os clones então obtidos foram cultivados a 37°C, por 12-16 horas, em meio LB suplementado com ampicilina a 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. As construções do RNAi foram isoladas pelo kit Qiagen QIAprep Spin. Para testar se os plasmídeos gerados estavam corretos, realizamos dupla digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI and *Xba*I e digestões simples com *Stu*I ou *Cla*I. A correta montagem do vetor pelo processo de recombinação produzirá um plasmídeo que, ao ser digerido com *Bam*HI e *Xba*I, liberará um fragmento de 1600 pares de bases, ou alternativamente, ao ser digerido *Stu*I ou *Cla*I, liberará fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases. As construções foram linearizadas pela digestão com *Asc*I e 5  $\mu$ g do plasmídeo linearizado foram utilizados para transfectar a linhagem 2T1 da forma sanguícola do *T. brucei* (Alsford & Horn, 2008). Para a transfecção, cerca de  $1 \times 10^7$  células foram centrifugadas por 10 min a 1500 g. Após o meio ser removido os parasitos foram ressuspensos em 100  $\mu$ L de tampão *Amaxa Nucleofector T-cell* e transferidos para uma cubeta, juntamente com 10  $\mu$ L (5  $\mu$ g) do DNA linearizado. A eletroporação foi realizada utilizando-se o programa X-001 da máquina *Nucleofector II*. Os parasitos foram então transferidos para 30 mL de meio HMI-9 sem as drogas de seleção e diluídos 1:20 e 1:40 e, após 6 horas, as drogas de seleção higromicina a 2,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e fleomicina a 0,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> foram adicionadas. Após sete dias, os clones resistentes foram selecionados. Para testarmos se o cassete para induzir o RNAi foi corretamente integrado no genoma do parasito, avaliamos a sensibilidade a puromicina.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na produção das construções do RNAi e na quantificação dos níveis de mRNA

Iniciador	Função	Sequência
XPBrnai_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPB	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> AGCCACTGTTAAGAAGCGGA
XPBrnai_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPB	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CTCCACTCGAGCAAGGAAAC
XPBzrna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPBz	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ACCGACGCTTGTTTTACAC
XPBzrna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPBz	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> GCCTACTAACCTTTCAGCG
XPCrna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPC	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CCTTGTTGGGTAACCGCTAA
XPCrna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPC	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CGCCACAGAAAGGTGTAT
XPDrna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPD	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TGACGGAGCTCAAGAAAGGT
XPDrna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPD	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> ACCTTTAGCGCCTTCCTAGC
XPErna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPE (TbDDB)	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATGCACCAGGGTAGTTTTGC
XPErna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPE (TbDDB)	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> TTCTAGAGTCGGCCAAGCAT
XPFrna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPF	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GAATGGGAGCGATGGACTAA
XPFrna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPF	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CCACTAAACGAACGGCATT
ERCC1rna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbERCC1	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TGTGTTGTGCTTCTTCTCCG
ERCC1rna_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbERCC1	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> TCATAAATGCAGCGAAGTGC
XPGrna_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPG	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ACCTGGTGAAAGTGTGGAGG

XPGrna <sub>i</sub> _R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbXPG	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> <u>AACCTCCCGAGTTCGTTTTT</u>
CSBrnai_F	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbCSB	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> <u>ACCGGAGAAATACGAACGTG</u>
CSBrnai_R	Produção de RNAi para silenciamento do gene TbCSB	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> <u>CTGTTACTGCGCATCGAAAA</u>
XPCrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPC por qRT-PCR	GAAGTCGCTGCAGCCAAGA
XPCrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPC por qRT-PCR	GCGTCAGCGAAGTCATCAAG
XPEFrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPE (TbDDB) por qRT-PCR	GAATTGATTTCCGTGACGTTTCT
XPERrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPE (TbDDB) por qRT-PCR	CGGCGACCGCATTTC
XPBzrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPBz por qRT-PCR	TAACGTTAACATTGCGTTGAAGTCT
XPBzrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPBz por qRT-PCR	GCGTCAACAGCAGCGATCT
XPBrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPB por qRT-PCR	AGTTGGTGGAGGGCAATCC
XPBrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPB por qRT-PCR	AGCAAGCGGTCCACAACAG
XPDrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPD por qRT-PCR	GACTGACCAGCGTTGTGTGTACTT
XPDrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPD por qRT-PCR	CGGGCGGAGATCAAAGC
XPGrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPG por qRT-PCR	CCAGCGCCGTCAACCA
XPGrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPG por qRT-PCR	AAGTCGTCGTTGAGCAGAATCA
XPFrna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPF por qRT-PCR	TCCCGACTGGACCCCTTATC
XPFrna <sub>q</sub> _R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbXPF por qRT-PCR	GGGTTGACCTCCGGAACAG
ERCC1rna <sub>q</sub> _F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbERCC1 por qRT-PCR	CGGAACTGCCGGGTTTC

ERCC1rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbERCC1 por qRT-PCR	CGTTAAGTACGGCGTGAAGTCTT
CSBrnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de TbCSB por qRT-PCR	GAGCACTGCCGGTTGCTT
CSBrnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de TbCSB por qRT-PCR	TGCCCTCGTCAAGAATAACA
HIPB1rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de HIPB1 por qRT-PCR	ACGCTGCAAATTATGCTTTACG
HIPB1rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de HIPB1 por qRT-PCR	GGCACGTCTATCTCCAAAGAAAA
MANB2rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de MANB2 por qRT-PCR	CGGCTCGCTGTGGATCTT
MANB2rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de MANB2 por qRT-PCR	CCCAGTGGGCGTGTCAA
TCPB3rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de TCPB3 por qRT-PCR	GACCTCGCGGCTCACTTC
TCPB3rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de TCPB3 por qRT-PCR	CTTACGCAAACGGCGAATG
HIP2B4rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP2B4 por qRT-PCR	GCACAGGCGGGAAACG
HIP2B4rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP2B4 por qRT-PCR	ATCCCCATGTGCGGCAGAA
ACTA1rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de ACTA1 por qRT-PCR	CGGCTCGTGGGCTTTAAAG
ACTA1rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de ACTA1 por qRT-PCR	ACGCCGCCGTAAGTTCTG
DNATA3rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de DNATA3 por qRT-PCR	CGTGAGGAGTTGCCACAGAA
DNATA3rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de DNATA3 por qRT-PCR	TACGGCACCCACTCCTGAA
HIP3A4rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP3A4 por qRT-PCR	GTTGAGCGAATGTGCATGCT
HIP3A4rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP3A4 por qRT-PCR	CGCGCCGAAGTGTAAGC
HIP4A5rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP4A5 por qRT-PCR	CGTTGAAGACCGCGCAGTA



HIP4A5rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de HIP4A5 por qRT-PCR	GAGGCGCAGTTCAAGCATCT
GPI8rnaq_F	Avaliação dos níveis de mRNA de GPI8 por qRT-PCR	TCTGAACCCGCGCACTTC
GPI8rnaq_R	Avaliação dos níveis de mRNA de GPI8 por qRT-PCR	CCACTCACGGACTGCGTTT

Todos os nomes dos iniciadores contêm o nome do gene alvo (exceto XPE, que refere-se a DDB). A marca “rnaï” é designada para os iniciadores utilizados para a produção das construções do RNAi, enquanto que a marca “rnaq” é para todos os iniciadores utilizados durante as análises de quantificação de mRNA. “\_F” e “\_R” denotam forward e reverse, respectivamente. Os sítios de reconhecimento da BP clonase Attb1, presente nos iniciadores forward para o RNAi, e Attb2, presente nos iniciadores reverse para o RNAi, encontram-se sublinhados.

### 2.3.3 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A validação do efeito do RNAi nos mRNAs dos genes do NER foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para tal, foi realizada uma mistura equivalente a 30 reações, sendo que cada reação individual continha 12,5 ml de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*); 1 ml de cada iniciador, cujo estoque estava a 300 nM; 9,5 ml de ddH<sub>2</sub>O e 1 ml de cDNA, gerado pelo sistema *SuperScript*, de síntese da primeira fita por RT-PCR (*Invitrogen*), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas no *ABI Prism 7000 thermocycler* e os níveis de mRNA foram quantificados de acordo com as instruções do fabricante. As condições para todas as reações foram de 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 1 min. Os iniciadores GPI8 foram usados como controle normalizador de expressão endógena. Os pares de iniciadores para cada gene do NER analisado estão também disponíveis na Tabela 1. Os níveis de mRNA dos genes contidos no segmento policistrônico estudado também foram determinados por qRT-PCR (para detalhes das sequências dos iniciadores, ver Tabela 1). Todos os iniciadores foram comprados da *Eurofins MWG Operon*. Utilizamos o teste t não pareado durante as análises estatísticas empregadas nas comparações dos níveis de mRNA entre as linhagens cujo RNAi foi induzido, em relações às linhagens controles, cujo RNAi não foi induzido. O teste ordinary one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi empregado nas comparações dos níveis de mRNA após 24-48 horas de indução do RNAi para os genes TbXPF, TbERCC1 e TbCSB. Para as análises de abundância de mRNA, após indução de RNAi e de dano no DNA, utilizamos o teste Two-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism.

### 2.3.4 Tratamento das linhagens silenciadas para os genes do NER com agentes genotóxicos

O antibiótico tetraciclina era adicionado às culturas dos parasitos, a  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , de modo a atingir a concentração final de  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Após 24 horas, as células eram expostas aos agentes genotóxicos. Para a curva de sobrevivência a cisplatina, os parasitos eram tratados com 1, 2 or 5  $\mu\text{M}$  de cisplatina (Sigma). Já na curva de sobrevivência à UV, os parasitos receberam doses de 500, 1500 e 3000  $\text{J}/\text{m}^2$  de UVC utilizando-se a fonte Stratalinker® UV Crosslinker (*Stratagene*). Para a curva de ciclofosfamida (Sigma), os parasitos eram cultivados na presença de 1-10 mM dessa droga. Em seguida, as células eram contadas em câmara citométrica, 24 horas após a exposição aos agentes genotóxicos, e a taxa de sobrevivência foi calculada pela proporção de células sobreviventes nos grupos tratados, em relação aos controles não tratados.

### **2.3.5 Modelagem comparativa e análise *in silico* de interações proteína-DNA**

A estrutura da TbXPC foi gerada por modelagem comparativa. A procura por estruturas molde candidatas foi realizada pelo algoritmo BLAST no banco de dados PDB (Westbrook et al., 2003). O molde utilizado para modelagem foi a proteína Rad4 (homólogo de XPC em *Saccharomyces cerevisiae*) (Min & Pavletich, 2007). Devido à ausência de moldes estruturais, o modelo da proteína TbXPC foi baseado apenas nos domínios Rad4-*family* e  $\beta$ -*hairpin* da proteína Rad4, correspondendo às posições 400-700 da sequência completa de aminoácidos. Os alinhamentos da TbXPC com o seu molde estrutural foi gerado pelo algoritmo Promals 3D (Pei et al., 2008) e manualmente curado. A modelagem molecular foi realizada pelo programa Modeller (version 9.7; (Eswar et al., 2007)), o qual gerou centenas de possíveis estruturas. A validação dos modelos obtidos em relação à qualidade estéreo-química foi realizada pela análise dos diagramas de Ramachandran gerados pelo programa Procheck (versão 3.5.4; (Morris et al., 1992)), sendo que as características energéticas foram subsequentemente avaliadas através do ProSA (ProSa 2003; (Wiederstein & Sippl, 2007)). Para tal, comandos em *Perl* foram elaborados e usados para calcularmos a porcentagem de resíduos nas regiões mais favorecidas do diagrama de Ramachandran, bem como o score-Z do ProSA, em cada uma das 100 estruturas. Três diferentes programas foram utilizados para determinar os potenciais sítios de ligação proteína-DNA: DNABindR, BindN (e sua variação BindNPlus) e DBSPSSM (Yan et

al., 2006, Wang & Brown, 2006, Ahmad & Sarai, 2005). Os resultados foram agrupados e todos os aminoácidos preditos como sítios de ligação ao DNA, por pelo menos um dos três algoritmos, foram considerados resíduos ativos nas análises de interação proteína-DNA. Tais cálculos foram realizados pelo programa Haddock, na interface guru (Dominguez et al., 2003), que também determinou, como resíduos passivos, os aminoácidos situados em um raio de seis angstroms em torno dos resíduos ativos. Em relação à molécula de DNA, todos os nucleotídeos foram considerados como resíduos ativos na interação proteína-DNA. Em todos os parâmetros adicionais foram utilizados os valores de referência. Os complexos assim gerados foram analisados em relação às suas respectivas propriedades estereo-químicas e energéticas.

### 2.3.6 Imunofluorescência

Foram coletadas aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, que em seguida, foram centrifugadas e lavadas uma vez em PBS 1x. Após a lavagem, as células foram incubadas por 4 minutos em uma lâmina de 12 poços (*Thermo Scientific*), previamente coberta com Poly-L-lisina (Sigma). Os parasitos foram então fixados, por 15 min, em solução de PBS 1x contendo 4% (v/v) de para-formaldeído e lavados duas vezes com PBS 1x. Na sequência, as células foram tratadas com HCl a 2M, lavada cinco vezes com PBS 1x, bloqueadas com 20% de soro fetal bovino inativado por calor (Sigma-Aldrich), durante 30 min a 37°C, e novamente lavadas cinco vezes com PBS 1x. De acordo com as instruções do fabricante, tanto o anticorpo de camundongo anti-(6-4) fotoprodutos (6-4-PPs) (Cosmo Bio Co., Ltd) a uma diluição de 1:300, quanto o anticorpo de camundongo anti- dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) (Cosmo Bio Co., Ltd) a uma diluição de 1:1500, foram diluídos em PBS 1x contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino e incubados a 37°C por 30 min. As células foram então lavadas cinco vezes com PBS 1x e posteriormente incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (IgG H+L) (Invitrogen), conjugado com Alexa Fluor 594, a uma diluição de 1:100 em PBS-SBF 5%, durante 30 min a 37°C. Os poços foram em seguida lavados cinco vezes com PBS 1x e as lâminas foram montadas com o meio de montagem *VECTASHIELD*, contendo DAPI a 1,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (*Vector Laboratories*). Na sequência, as lâminas foram examinadas e as imagens capturadas, utilizando-se um microscópio de fluorescência, acoplado a uma câmara fotográfica

(*Zeiss*). As imagens foram processadas e montadas no programa Adobe Photoshop (*Adobe Systems*).

### **2.3.7 Quantificação das frequências de lesões no genoma nuclear, da forma sanguícola do *T. brucei*, através da técnica de PCR quantitativa**

A quantificação das lesões nesta parte do trabalho foi realizada conforme descrito no capítulo anterior, seção 1.3.3.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Identificação dos ortólogos putativos do NER em *T. brucei*

O sequenciamento do genoma completo do *T. brucei* (Berriman et al., 2005) revelou a presença da maioria dos componentes do NER, encontrados nos demais eucariotos, sugerindo que as vias de GG-NER e TC-NER são funcionais neste parasito. Dados similares foram obtidos a partir de análises dos genomas do *L. major* e *T. cruzi* (Ivens et al., 2005, El-Sayed et al., 2005). Primeiramente, realizamos análises comparativas entre as sequências preditas para as proteínas do NER, presentes em *T. brucei*, e as sequências encontradas em outros organismos (Figuras 2.4 a 2.12). Entre os componentes do GG-NER em *T. brucei*, as proteínas putativas XPC (Tb09.211.3040) e sua parceira de ligação, a proteína RAD23 (Tb927.6.4650), são as que apresentam maior grau conservação. Entretanto, o ortólogo putativo da subunidade maior de UV-DDB apresenta relativamente baixa similaridade com as proteínas DDB1 de *Homo sapiens* e *Arabidopsis thaliana*. Como a subunidade menor desse dímero, a proteína DDB-2, está ausente em *T. brucei*, simplesmente denominamos a subunidade maior de UV-DDB como TbDDB (Tb927.6.5110). Em relação ao TC-NER, o ortólogo putativo de CSB (Tb927.7.4080) foi prontamente identificável, embora não tenhamos identificado nenhum homólogo para CSA. Através das nossas análises das sequências de TbXPB (Tb927.3.5100), TBXPBz (Tb11.01.7950) e TbXPD (Tb927.8.5980), pudemos confirmar as análises feitas por Lecordier e colaboradores (2007) (Lecordier et al., 2007). A presença de duas proteínas XPB-like não é exclusiva de tripanossomatídeos, podendo ser observada também em plantas (Morgante et al., 2005) e na maioria dos crenarchaea (Richards et al., 2008). Entretanto, as proteínas XPB-like de tripanossomatídeos apresentam entre si considerável divergência de tamanho e sequência, diferentemente das duas XPB de plantas, identificadas como proteínas parálogas de alta similaridade (Figura 2.9). Em virtude disso, é mais provável que as proteínas XPB-like de tripanossomatídeos e de archaea apresentem maior divergência funcional, ao serem comparadas às suas respectivas correspondentes em plantas. Finalmente, as endonucleases putativas do NER também puderam ser identificadas. TbXPG (Tb09.211.2870), contendo 746 resíduos de

aminoácidos, é substancialmente menor, quando comparadas às suas homólogas em *H. sapiens* e *A. thaliana*, de aproximadamente 1100 resíduos cada uma (Figura 2.10). Tal diferença de tamanho deve-se à ausência de resíduos, na XPG de *T. brucei*, correspondente à região denominada de espaçador, presente na XPG humana, que é importante para a interação dessa proteína com o TFIIH. Esta região espaçadora também se caracteriza por dividir os domínios N-terminal e I nuclease da XPG (Dunand-Sauthier et al., 2005). Os ortólogos putativos de ambas as subunidades do complexo XPF/ERCC1 também foram identificados, embora TbXPF (Tb927.5.3670) seja claramente mais conservada que TbERCC1 (Tb927.7.2060).

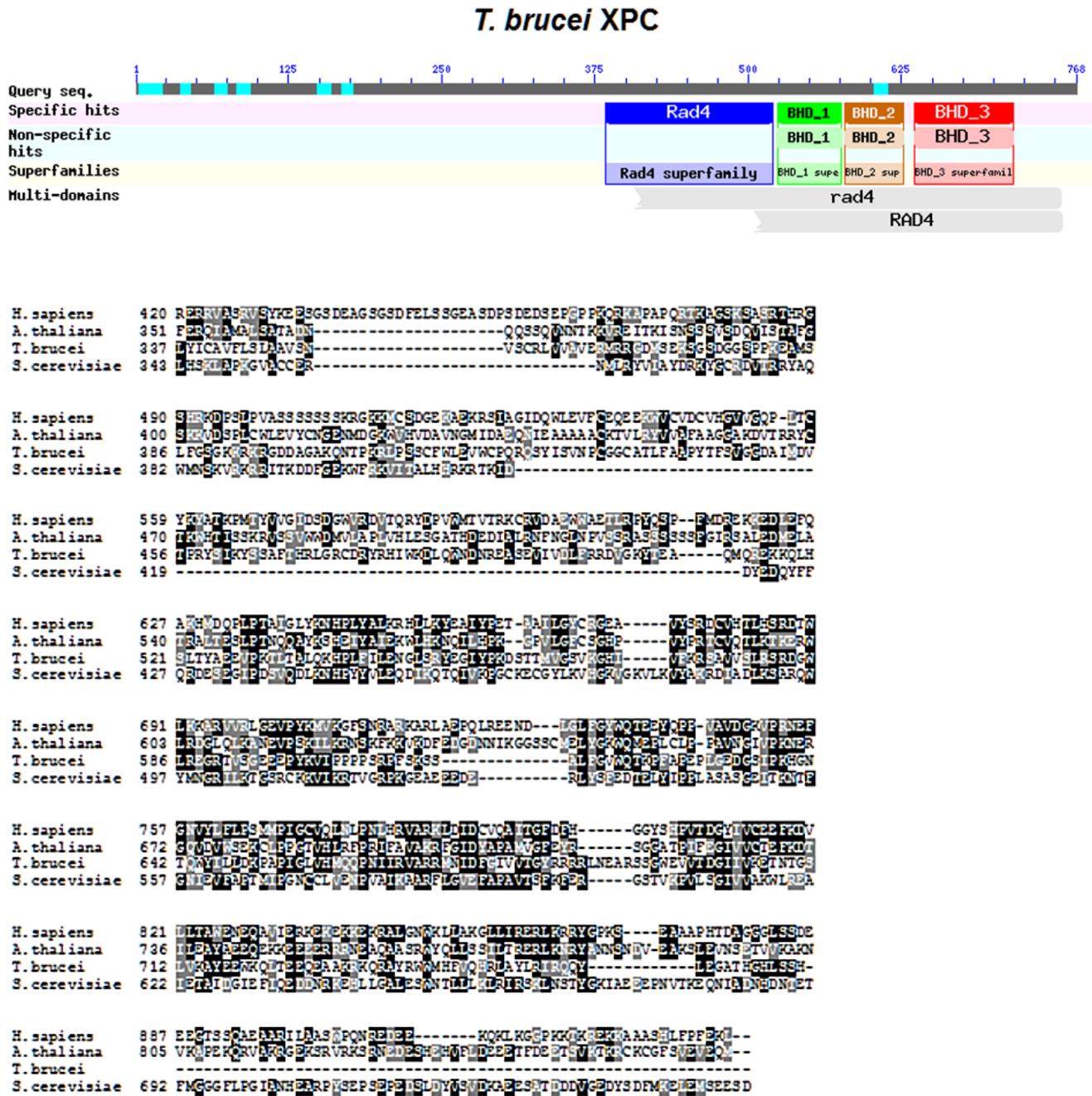


Figura 2.4: A proteína XPC de *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados presentes em TbXPC, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa o alinhamento de TbXPC com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais seqüências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.



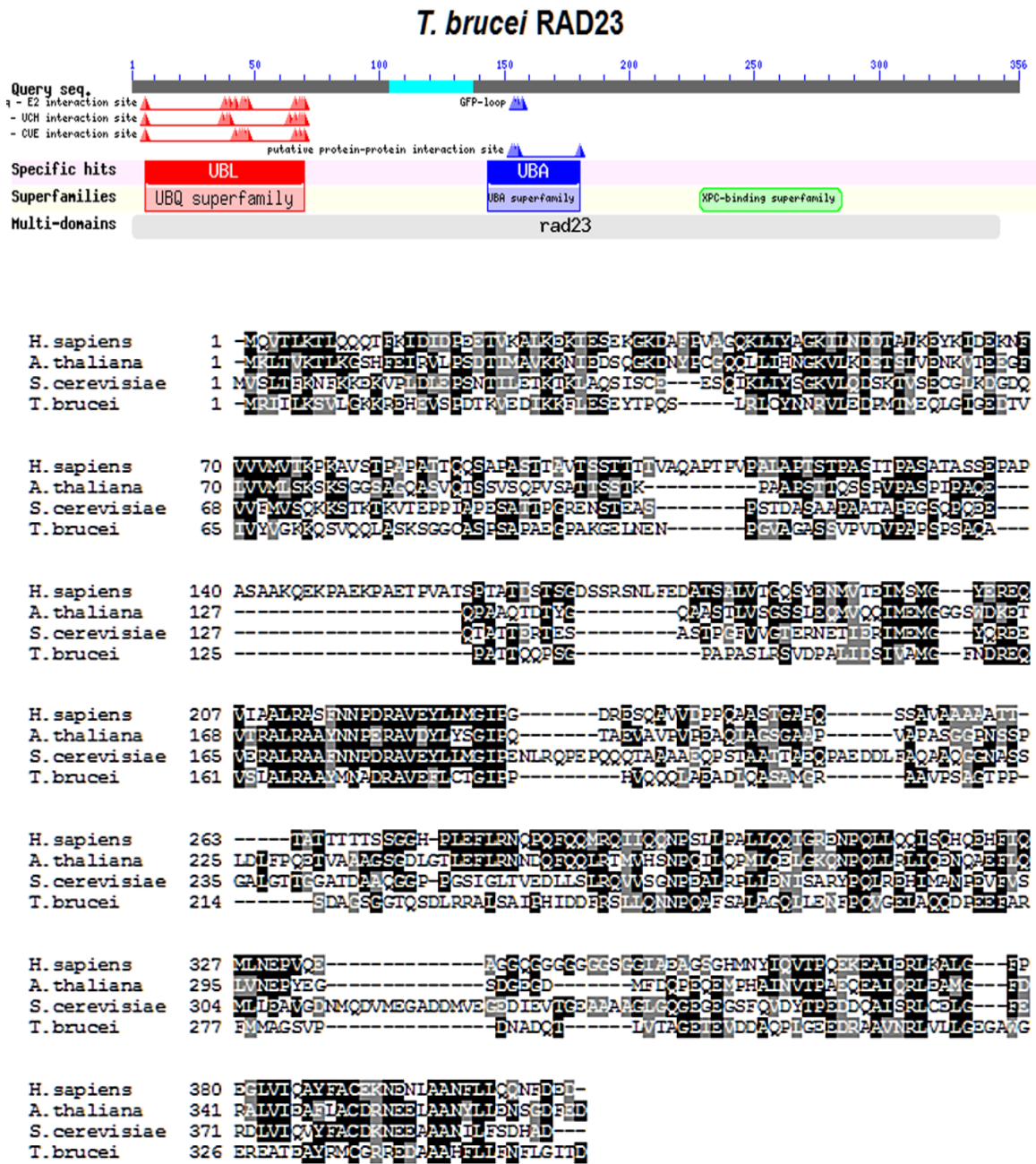


Figura 2.5: A proteína RAD23 de *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados presentes em TbRAD23, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa o alinhamento de TbRAD23 com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.

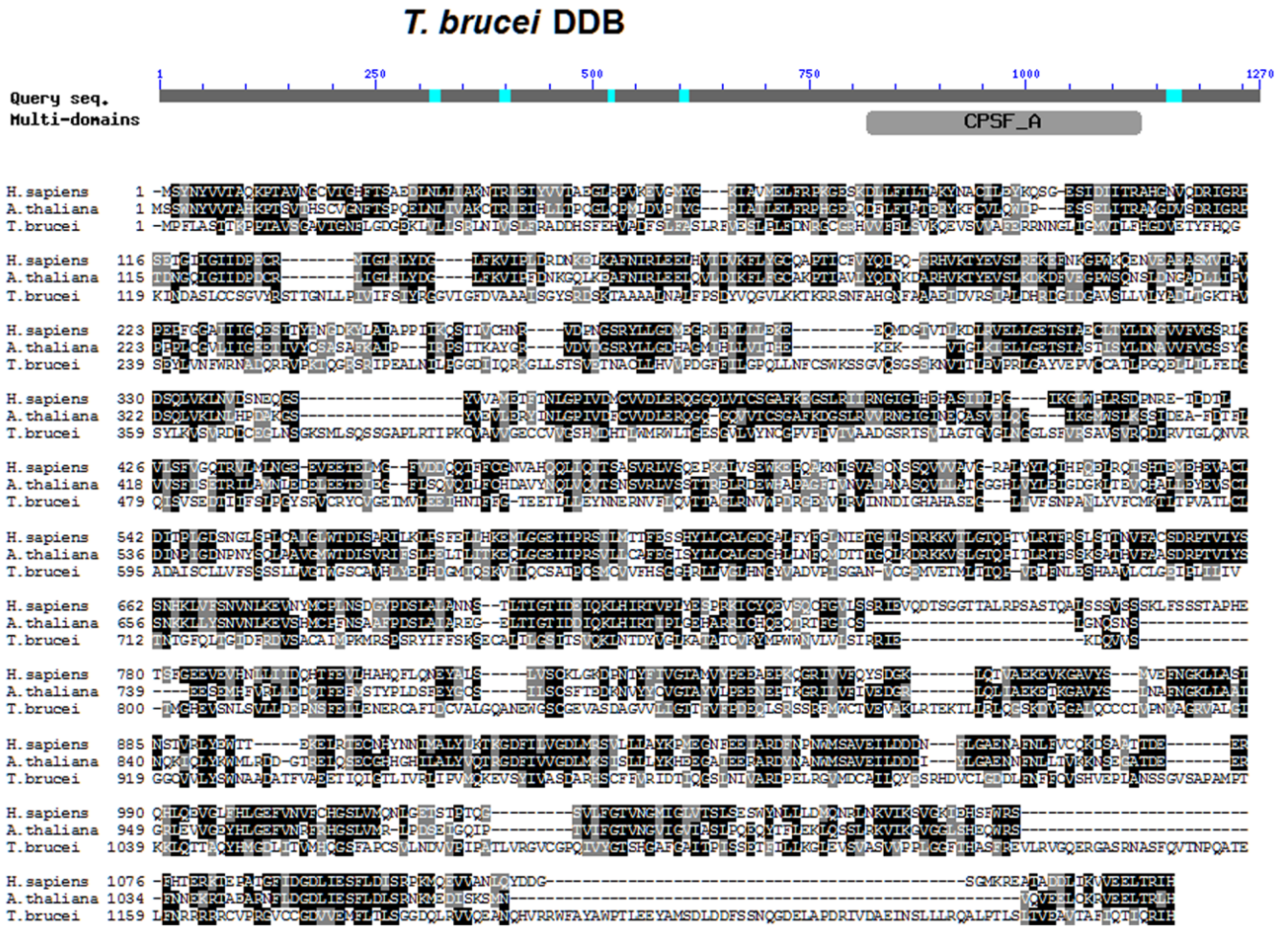


Figura 2.6: A proteína DDB de *T. brucei*. Alinhamento da sequência de TbDDB com proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens* e *A. thaliana*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente. Apenas a subunidade maior de DDB foi identificada.



### T. brucei CSB



Figura 2.7: A proteína CSB de *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados presentes em TbCSB, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa o alinhamento de TbCSB com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*S. cerevisiae*, *A. thaliana* e *H. sapiens*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.

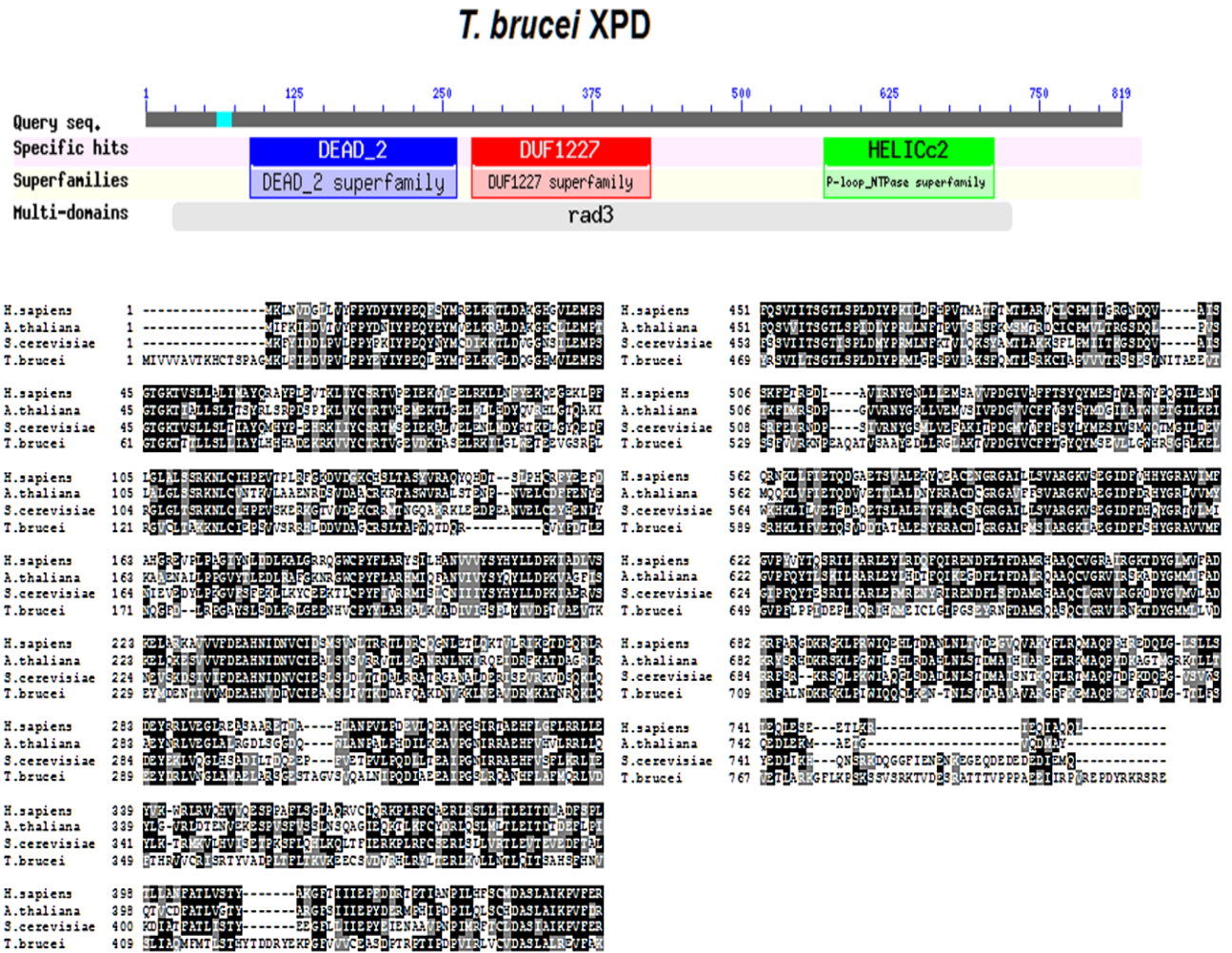


Figura 2.8: A proteína XPD de *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados presentes em TbXPD, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa o alinhamento de TbXPD com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais seqüências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.

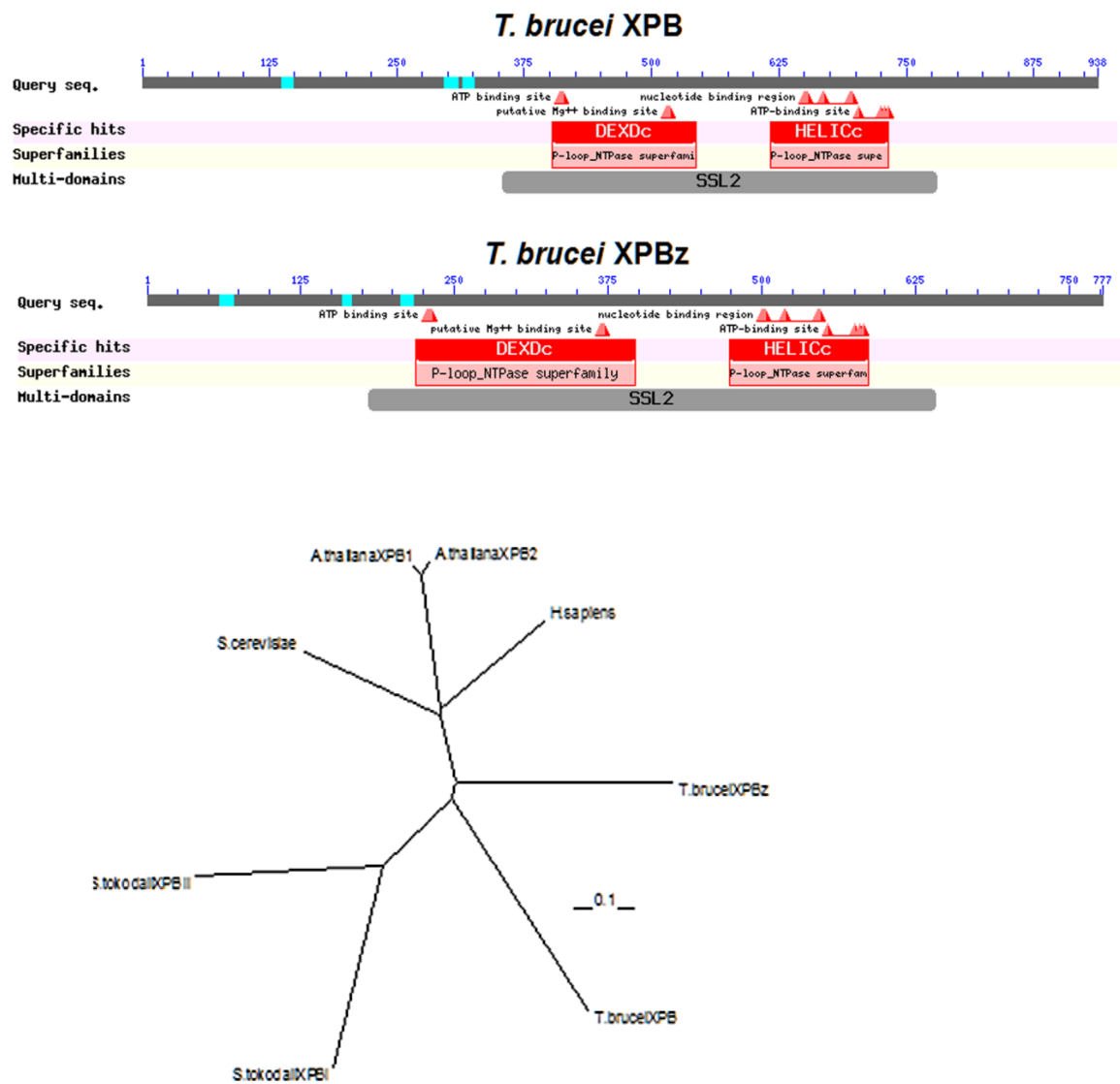


Figura 2.9: Homólogos de XPB em *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados em TbXPB e TbXPBz, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa uma árvore filogenética, realizada através do algoritmo *Neighbor-Joining*, das duas proteínas homólogas de XPB em *T. brucei*, juntamente com proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *S. cerevisiae* e *A. thaliana*) e de *Archaea* (*Sulfolobus tokodaii*).



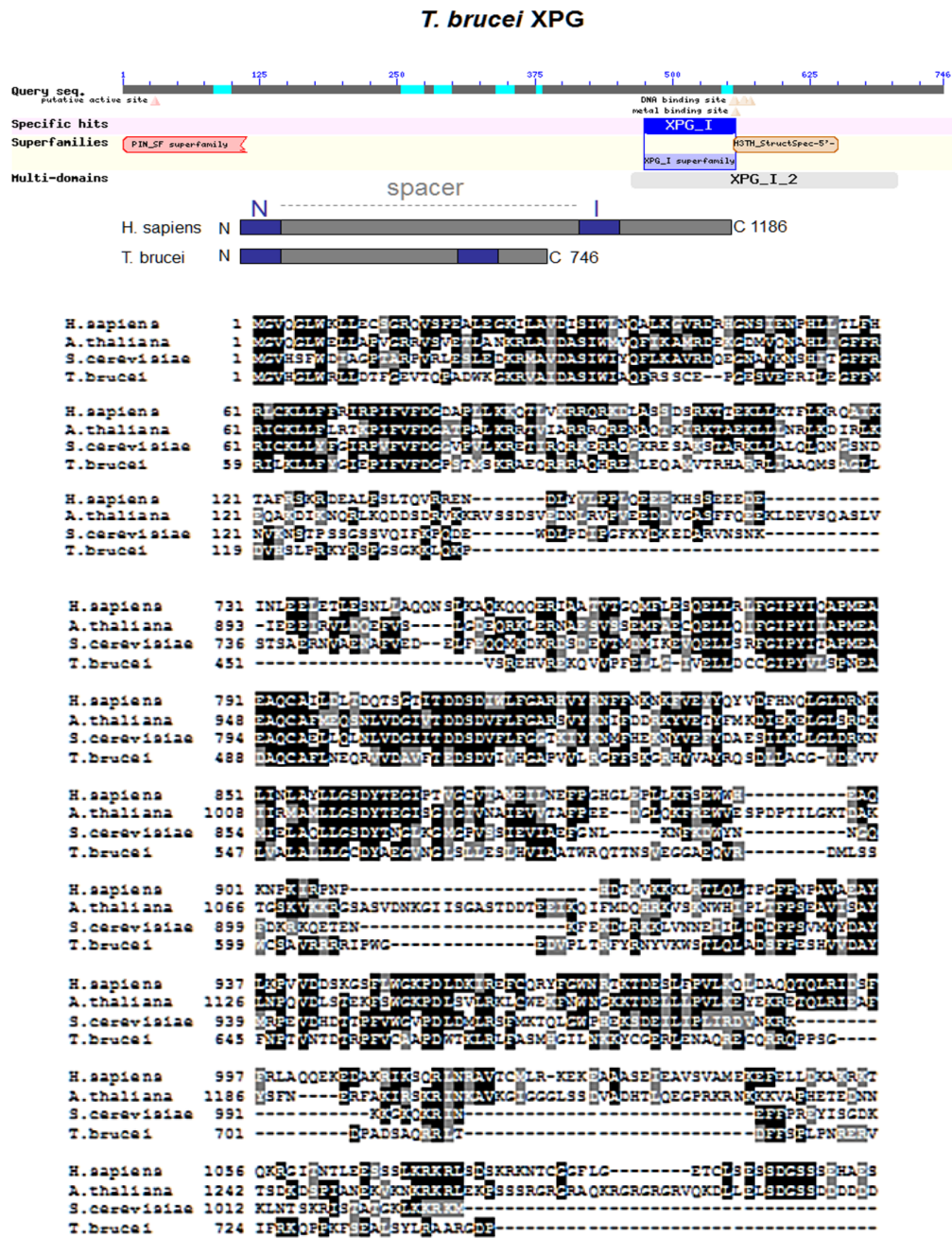


Figura 2.10: A proteína XPG de *T. brucei*. O diagrama de cima mostra os domínios conservados presentes em TbXPG, através de análise por BLASTp. O diagrama do meio representa a estrutura primária, contendo os domínios conservados preditos da XPG de *T. brucei* e *H. sapiens*. O diagrama de baixo representa o alinhamento de TbXPG com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.

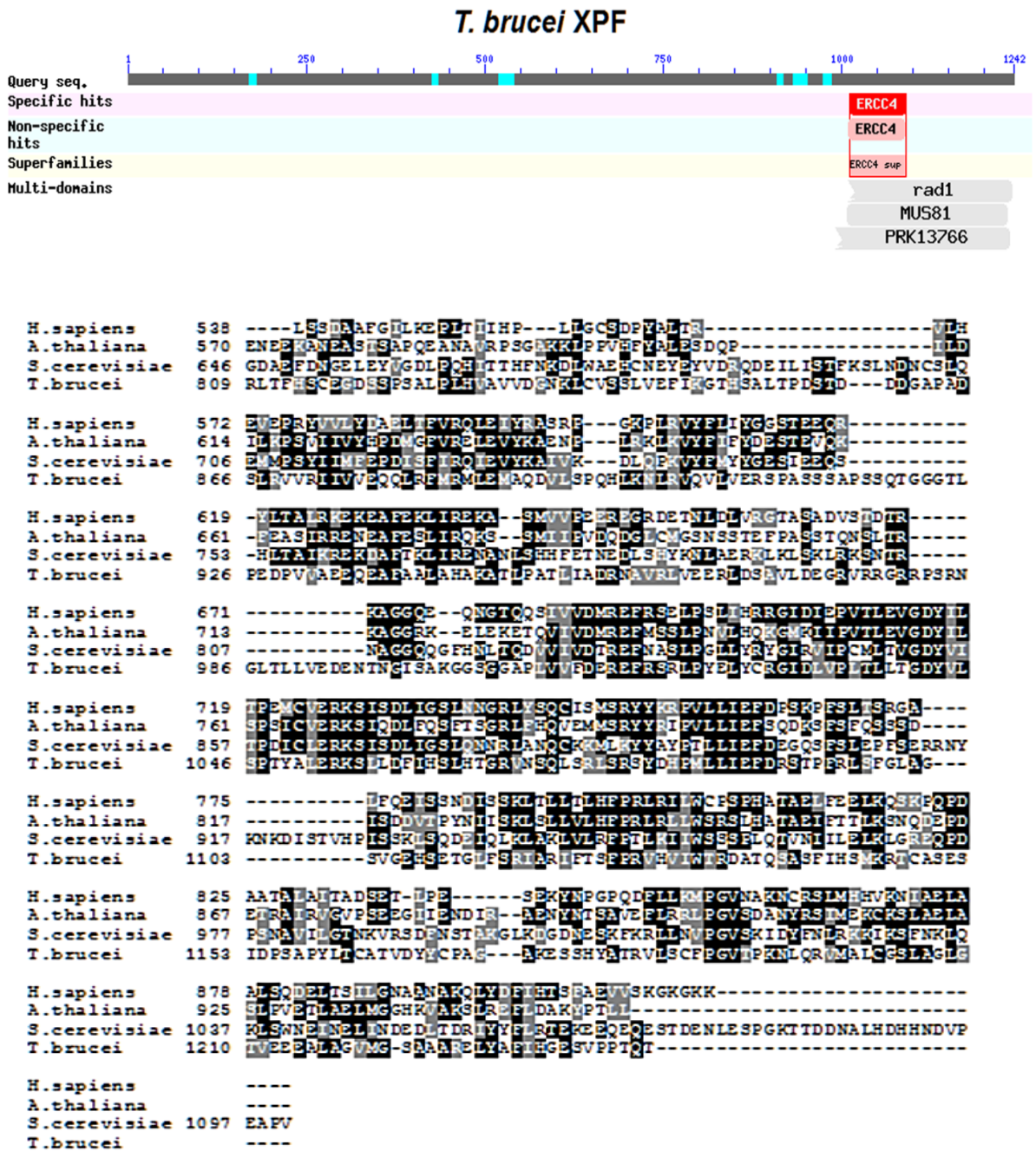


Figura 2.11: A proteína XPF de *T. brucei*. O diagrama acima mostra os domínios conservados presentes em TbXPF, através de análise por BLASTp. O diagrama abaixo representa o alinhamento de TbRAD23 com as proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.

## *T. brucei* ERCC1

H.sapiens	1	---MDPGKDKKEGVPPQPSGPPARKKFKVIPID-----EDEVPPGVAKPLFRS IQSL
A.thaliana	1	MANEDDDGKESRSLSHQQIDARKPKTQIVIGVPSYQEVLESSQTKSTPPSLFKPSQSFSAQAF
S.cerevisiae	1	-----MNNTDET SFESILAGVA-----KIRKQKSGADTIGSQSL
T.brucei	1	-----MPPLPRGVVQVVGALRGDNIIRIQRHR-----YVIEEADDFDYDFLCGGTCV
H.sapiens	47	PTVDTIS-AQAAPQTYAEYATSCPELEGAGATCPICGSEPLAGETPNQALKPGAK-----
A.thaliana	61	AEVKSSDVYSPFPSSAAASSQPSGASQVPHSSQTHQTLGASSSTPVATGSVPSNTT
S.cerevisiae	35	EIDASKLQCEPQTSRRRINSNIVINAFNOOKPEEWTDSKATDDYNRKRFRS-----T
T.brucei	49	VEVDDADDLSDAARRTKVSSQLSMLKTHTGASWRCVVILLRVSSEVREDIL-----
H.sapiens	98	--SNSIIVSFRQGNPVLKFRNVPEWFG-----DVI PDYVLGQSTCALFLSLRYHMLHP
A.thaliana	121	QNRNAILVSHROKGNPILLKHLRNVKVWFS-----DII PDYVLGQNSCALYLSLRYHLLHP
S.cerevisiae	88	RPGKTVLVNITQKENPLLNLKSTINRWYVSSTGINMIYYDYLVREERSVLFLTLTYHKLIV
T.brucei	101	--AWLNLHCSVEQCGVMLEWTFDEECAAY-----LEGLSDSNVETADYCVGVRDSTPM
H.sapiens	151	DYTHGRLOSLGKNFALRVLLVQVDVKDPQQALKEIAKMCILADCTLLLAWSPEEAGRYLE
A.thaliana	176	DYLYFRIREIQKNEKLSVVLCHVDVEDTVKPLLEVTKTALLHDCITLLCAWSMTECARYLE
S.cerevisiae	148	DYISRRMQPISRMENN-ILIFIVDDNNS EDTLNQITKLCMFNGFTLLLAENFEQAARYLE
T.brucei	153	QLLIDALTQTPQLMTRNDVVRANVSFGSVAGLLIAT----AEQLTELPGFAQKKAARLHA
H.sapiens	211	TYKAYEQKPADLLMEKLEQDFVSRVTECLTTVKS VNKTDSQTLITTFGSLEQLIAASRED
A.thaliana	236	TIKQYENKPADLIQGMQMDYLSRLNHSLTSLREVNKSDVVTLGSTFGSLAHIIDASMED
S.cerevisiae	207	YLNL-----
T.brucei	209	VLNAPFNTSRCLVALVLORE-QDESNDESSEREPAGEIMKQALRCITDREDEDVQEGGQ-
H.sapiens	271	LALCPGLGPOKARRLFDVLHEPFLKVP-----
A.thaliana	296	LARCPGIGERKVKRLYDTFHEPKRATSSYPSVVEPPIPEAPVEKDVNSEEPEVEDEDV
S.cerevisiae		-----
T.brucei		-----
H.sapiens		-----
A.thaliana	356	EDSRKRKKKEPEPEKT VKTALSAVFARYSDRLSKKKEKQKEKDTTASDAETHQN
S.cerevisiae		-----
T.brucei		-----

Figura 2.12: A proteína ERCC1 de *T. brucei*. Este diagrama representa o alinhamento da sequência de aminoácidos de TbERCC1 com as sequências das proteínas homólogas de outros eucariotos (*H. sapiens*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*). Os resíduos de aminoácidos idênticos ou conservados em duas ou mais sequências estão destacados em preto e cinza, respectivamente.



### 2.4.2 O silenciamento da expressão dos mRNAs dos genes preditos para o NER, em *T.brucei*, por RNAi

Para a construção do cassette, que produzirá os pequenos RNAs de interferência, um trecho de 400-600 pb foi amplificado de cada ORF e inserido em direções contrárias no vetor pGL2084, uma versão modificada do vetor pRPa<sup>isl</sup> (Alsford & Horn, 2008) (Figura 2.3, Material e Métodos), pela ação de uma recombinase, de modo que entre os sítios de inserção há um segmento de 150 pb do gene lac Z. Após a construção do cassette, o vetor é linealizado e inserido no genoma do *T. brucei*, por eletroporação. A transcrição do cassette, para a produção do RNAi, é subordinada a um promotor ribossômico e inibida pela ligação da proteína repressora do operon Tet ao operador. Na presença de tetraciclina, a transcrição do cassette é ativada, produzindo um RNA dupla fita, que originará os pequenos RNAs de interferência contra a sequência de interesse. Após a obtenção de linhagens da forma sanguícola de *T. brucei*, transfectadas com o vetor pGL2084 linearizado, avaliamos o silenciamento dos genes alvo. Para tal, os níveis de mRNA para cada um dos genes alvo do NER foi medido por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), nas suas respectivas linhagens silenciadas, tanto na presença quanto na ausência de tetraciclina (Figura 2.13). Embora limitada em alguns casos, a diminuição dos níveis de mRNA foi detectada, 24 horas após a indução do RNAi, para a maioria dos genes do NER. Para os *knockdowns* de valor  $p > 0,05$ , observamos uma queda de 13-20% nos níveis dos mRNAs dos genes alvo, enquanto que para os *knodowns* de valor  $p < 0,05$ , detectamos uma queda de 20-48% nos mRNAs dos alvos analisados. Entretanto, o RNAi direcionado para ambos os componentes da endonuclease XPF-ERCC1 causou um aumento aparente nos níveis de seus respectivos mRNAs. Independentemente destas observações, feitas nos níveis de mRNA de XPF e ERCC1, a tentativa de silenciamento destes genes proporciona um fenótipo bastante evidente, consistente com os demais fenótipos observados após o silenciamento dos outros componentes do NER. De modo geral, a inibição da expressão dos fatores do NER por RNAi, realizadas nesta parte do trabalho, não atingiu a mesma eficiência descrita para os sistemas baseados nos vetores pGL2084 (Jones, dados não publicados) e pRPa<sup>isl</sup> (Alsford & Horn, 2012). Esse resultado poderia ser atribuído a diferenças diversas, entre os fatores do NER e os genes silenciados nesses outros trabalhos, nas suas respectivas funções e processos de expressão gênica.

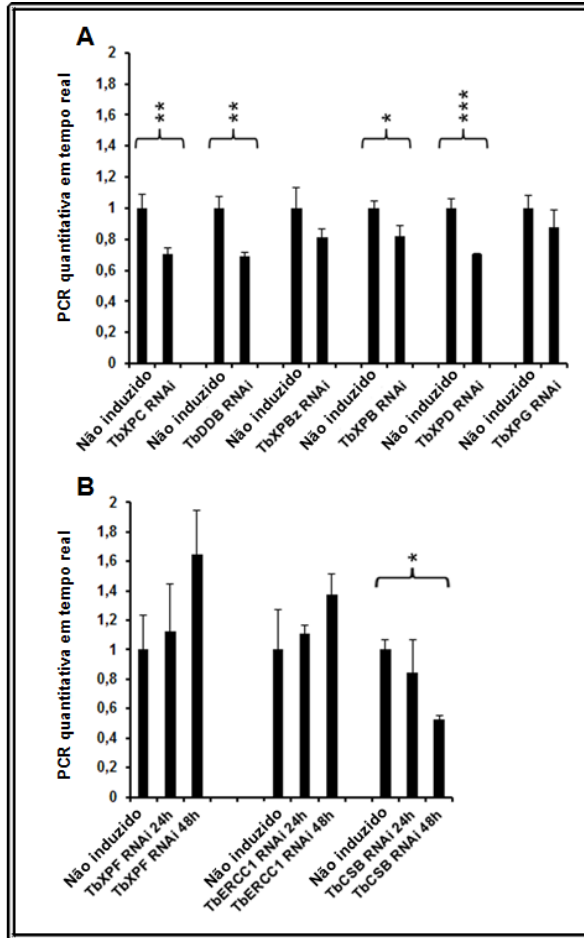


Figura 2.13: Quantificação dos níveis de mRNA de TbXPB, TbXPBz, TbXPC, TbXPD, TbDDB, TbXPF, TbERCC1, TbXPG and TbCSB, após a indução do RNAi. a-) Quantificação dos níveis de mRNA dos genes XPB, XPBz, XPC, XPD, DDB e XPG na ausência e presença de tetraciclina, utilizada para a indução do RNAi. b-) Quantificação dos níveis de XPF, ERCC1 e CSB 24 e 48 horas após a indução do RNAi. \*, \*\* e \*\*\* para valores de  $p < 0,05$ ,  $< 0,01$  and  $0,001$ , respectivamente.

### **2.4.3 Crescimento da forma sanguícola do *T. brucei*, após indução de RNAi contra os transcritos das proteínas preditas do NER**

A avaliação do crescimento celular, após a indução do RNAi, demonstrou que os componentes do NER TbXPC, TbDDB, TbXPB, TbXPD, são essenciais, pelo menos para a forma sanguícola do *T. brucei*, uma vez que o silenciamento de 20-40% do total de seus respectivos produtos gênicos proporciona deficiência severa no crescimento desta forma do parasito. Apesar de não termos observado diminuição nos níveis de mRNA de TbXPF e TbERCC1, a indução do promotor Tet, nestas linhagens, proporcionou forte inibição do crescimento. Em todos os casos, a redução do crescimento é observada entre 24 e 48 horas, após a indução do RNAi, levando à morte dos parasitos nas 24 horas subsequentes. O perfil de crescimento observado após a indução do RNAi de TbXPB e TbXBD é muito próximo daquele previamente descrito (Lecordier et al., 2007). Em contrapartida, o RNAi dos demais componentes do NER em *T. brucei* causou pouco ou nenhum impacto, em relação ao crescimento celular. O RNAi de TbCSB resultou em uma leve redução na taxa de crescimento, quando este é comparado com o controle não-induzido. Ainda assim, o efeito do RNAi de CSB no crescimento somente é detectado com 4 dias após a indução, independentemente do fato de que, em 48 horas, há queda de quase 50% nos níveis do mRNA deste gene. O RNAi contra TbXPBz e TbXPG, na ausência de indução de danos no DNA, não causou nenhum efeito no crescimento celular (Figura 2.14). Embora a inibição dos níveis de mRNA nesses dois genes seja baixa (13-20%), o fenótipo apresentado por XPBz foi reproduzido em outros dois trabalhos independentes, previamente publicados. Em um deles, foi descrito que a inibição de XPBz por RNAi não causa defeitos de crescimento no parasito (Lecordier et al., 2007). Já no outro trabalho, foi mostrado que linhagens de *T. brucei* nocautes para TbXPBz são viáveis, apesar de apresentarem crescimento mais lento (Badjatia et al., 2013).

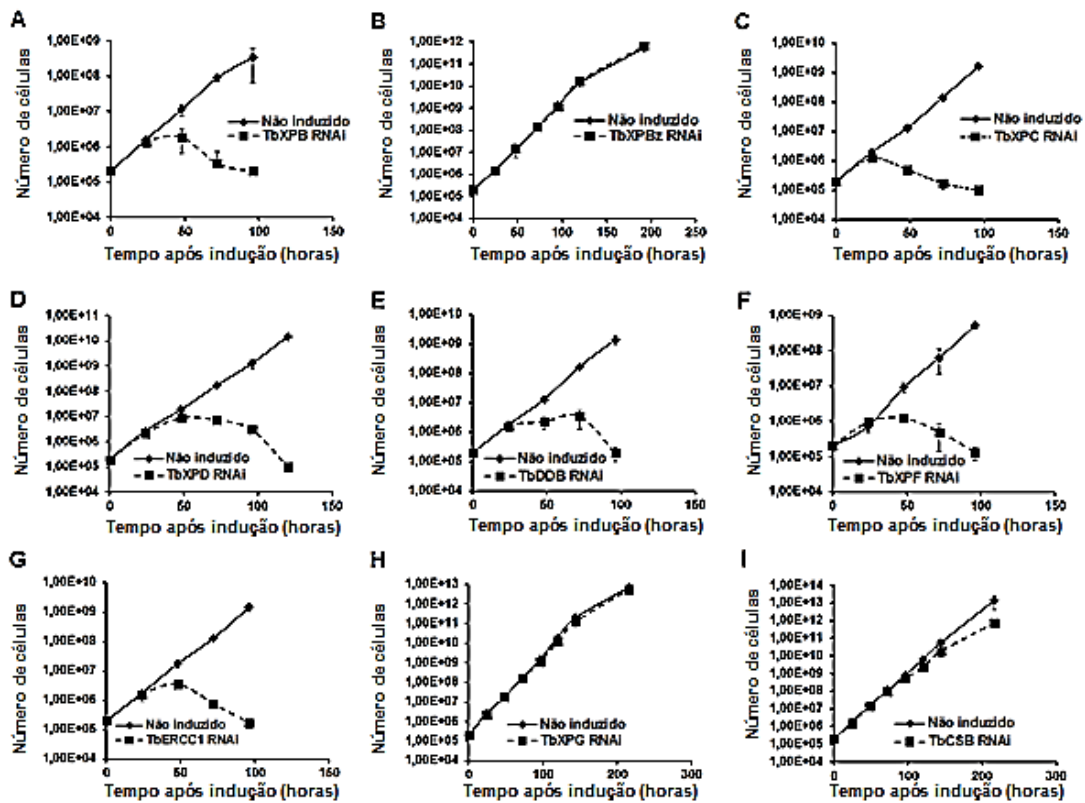


Figura 2.14: Curvas de crescimento das linhagens de *T. brucei*, cujos componentes foram silenciados por RNAi. Os parasitos da forma sanguícola do *T. brucei* foram cultivados na ausência (linhas preta com losangos) e presença de tetraciclina (linhas tracejadas com quadrados), utilizada para induzir o silenciamento dos genes do NER XPB, XPBz, XPC, XPD, DDB, XPF, ERCC1, XPG and CSB (A-I, respectivamente). A concentração das células foi multiplicada pela diluição, de modo a obtermos a quantidade cumulativa dos parasitos ao longo do período de tempo analisado. Estes gráficos são representativos de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

#### **2.4.4 As proteínas TbCSB e TbXPBz estão envolvidas na recuperação de danos no DNA gerados após irradiação com UV**

Para determinarmos o papel dos genes putativos do NER em *T. brucei*, durante a recuperação de danos no DNA após irradiação com UV, o crescimento das linhagens RNAi foi avaliado, após o tratamento das mesmas com UVC (Figura 2.15). Para tal, 24 horas após a adição de tetraciclina, as células foram expostas a 0, 500, 1500 e 3000 J/m<sup>2</sup> de UVC e contadas nas 24 horas subsequentes. A cultura controle, cuja indução do RNAi não foi realizada, foi tratada seguindo este mesmo protocolo. A porcentagem de sobrevivência foi determinada pela razão da densidade de células presentes nas culturas irradiadas, com diferentes doses de UVC, sobre a densidade de parasitos nos controles não tratados, tanto após a indução do RNAi pela adição de tetraciclina, quanto nas culturas não induzidas (Figura 2.15). Apenas a inibição de TbCSB e TbXPBz resultaram em menor sobrevivência do *T. brucei*, após a exposição à UV, quando comparada aos parasitos controle, sugerindo que essas proteínas teriam um papel importante na recuperação de danos no DNA induzidos por esse agente. Corroborando com os nossos resultados, foi descrito que a linhagem de *T. brucei*, nocaute para XPBz, apresenta maior sensibilidade à radiação UV (Badjatia et al., 2013). Em contraste, a inibição da expressão por RNAi de TbXPG, TbXPF ou TbERCC1 aumenta a sobrevivência após a irradiação, sugerindo que tais endonucleases possam antagonizar o reparo de UV. Por último, observamos que a inibição da expressão por RNAi de TbXPC, TbDDB, TbXPB ou TbXPD não influenciou na sobrevivência dos parasitos, após a irradiação com UV, sugerindo que as lesões geradas por UV talvez não sejam reconhecidas pelos supostos componentes do GG-NER em *T. brucei* (TbXPC e TbDDB) e também não seriam processadas pelas helicases associadas ao complexo TFIIH.

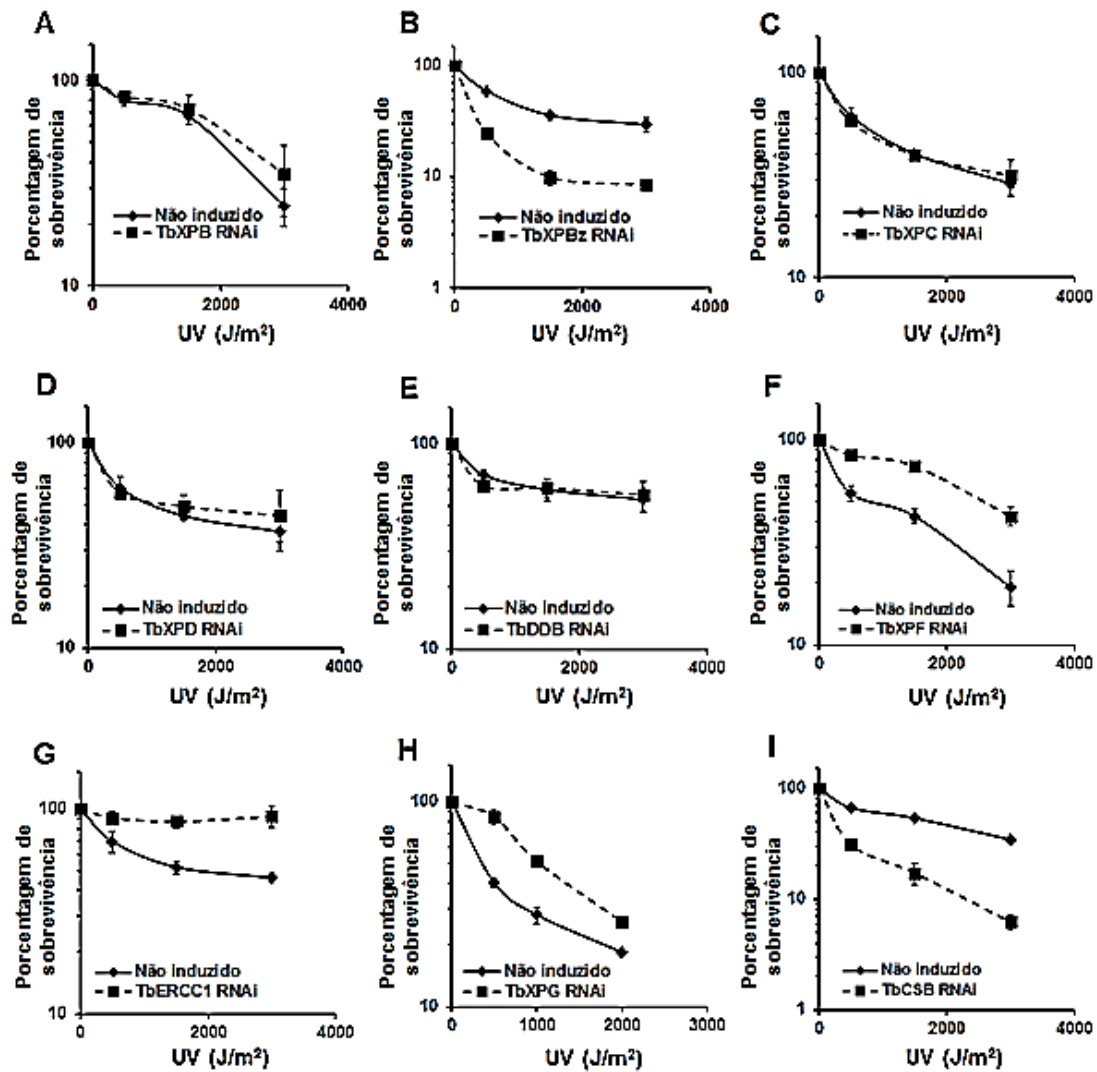


Figura 2.15: TbCSB e TbXPBz estão envolvidas na recuperação de danos no DNA, após a irradiação com UV. Curvas de sobrevivência da forma sanguícola do *T. brucei*, após o tratamento com 500, 1500 e 3000 J/m<sup>2</sup> de UVC, na ausência (linhas pretas com losangos) e presença (linhas tracejadas com quadrados) de tetraciclina, utilizada na indução do RNAi contra os componentes do NER XPB, XPBz, XPC, XPD, DDB, XPF, ERCC1, XPG e CSB (A-I, respectivamente). A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de células presentes nos grupos tratados, sobre o número de células presentes nos controles não tratados. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

### 2.4.5 Lesões induzidas por UV praticamente não são reparadas nos tripanossomatídeos

Os resultados observados, após a inibição da expressão de TbCSB e TbXPBz por RNAi, poderiam ser explicados sob duas perspectivas diferentes: essas proteínas participariam efetivamente do reparo das lesões induzidas por UV, via TC-NER, ou essas proteínas estariam envolvidas em uma via alternativa, que envolve a síntese de RNA, através de moldes de DNA contendo lesões. Conforme observado no capítulo anterior, a forma sanguícola do *T. brucei* praticamente não repara fotolesões no DNA, em até 10 horas pós-irradiação. Realizamos novamente o ensaio de PCR quantitativa (qPCR), para medirmos a cinética de reparo na forma sanguícola do *T. brucei*, porém desta vez, irradiamos os parasitos em meio HMI-9, de modo a reproduzir as condições em que os ensaios de sobrevivência à irradiação UV foram realizados. Após o tratamento com a dose de 1500 J/m<sup>2</sup> de radiação UV (Figura 2.16a), primeiramente observamos que esta dose de irradiação, em meio HMI-9, provoca praticamente a mesma frequência de lesões, obtida pelo tratamento com 30 J/m<sup>2</sup> em PBS 1x (Figura 1.4a do capítulo 1). Além disso, repetindo o resultado obtido pela irradiação dos parasitos em PBS 1x, não houve reparo das fotolesões, em até 10 horas pós-tratamento, no núcleo dos parasitos irradiados com 1500 J/m<sup>2</sup> em meio HMI-9. A análise da cinética de reparo, pela técnica de qPCR, foi limitada ao intervalo de tempo de 10 horas, já que o mesmo corresponde ao período aproximado, gasto pela forma sanguícola do *T. brucei* para se duplicar. Com isso, o efeito da amplificação das fitas recém-sintetizadas é minimizado, evitando com que as mesmas “diluam” as lesões não reparadas. Para determinarmos se as lesões do tipo CPDs e 6-4 PPs, induzidas por UV, persistem após o período correspondente ao ciclo celular do *T. brucei*, marcamos os parasitos com anticorpos específicos para tais lesões. Dessa forma, constatamos, por microscopia de fluorescência, que o sinal para CPDs e 6-4 PPs foi prontamente detectável, em até 24 horas pós-irradiação (Figura 2.16b). Para determinarmos se o reparo ineficiente é limitado ao *T. brucei*, foi realizado o ensaio de PCR quantitativa em formas epimastigotas do *T. cruzi* (Rajao, Tese de Doutorado. Figura 2.16c). Com isso, evidenciou-se que a dose de irradiação utilizada em *T. brucei* (1500 J/m<sup>2</sup>) é capaz de reproduzir, no núcleo de *T. cruzi*, a mesma intensidade de lesões. Do mesmo modo, foi observado que, em *T. cruzi*, praticamente não houve reparo das lesões geradas por UV em até 24 horas após o tratamento (Rajao, Tese de Doutorado. Figura 2.16c).

Esses dados indicam que as lesões no DNA causadas por UV não são reparadas nestes dois tripanossomatídeos, sugerindo, dessa forma, que tais tipos de danos seriam processados pela via de transcrição translesão.



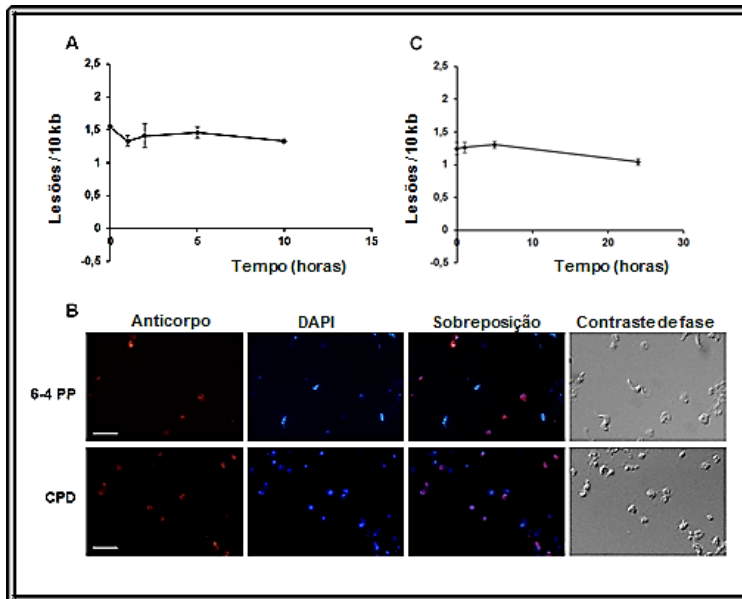


Figura 2.16: As lesões induzidas por UV não são eficientemente reparadas na forma sanguícola de *T. brucei*. a-) Número de lesões por 10 Kb no DNA nuclear de formas sanguícolas do *T. brucei* versus tempo em horas, após irradiação com  $1500 \text{ J/m}^2$  de UVC. A concentração de lesões no DNA foi medida, em até 10 horas, após a indução do dano. Cada valor é a média de duas réplicas biológicas, quantificadas independentemente duas vezes. b-) Microscopia de imunofluorescência das lesões do tipo 6-4 fotoprodutos (6-4 PP) e dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) na forma sanguícola de *T. brucei*, após o tratamento com  $1500 \text{ J/m}^2$  de UVC. A barra de escala representa um comprimento de 10 micrometros. c-) Número de lesões por 10 Kb no DNA nuclear de formas epimastigotas de *T. cruzi* versus tempo em horas, após irradiação com  $1500 \text{ J/m}^2$  de UVC. A concentração de lesões no DNA foi medida, em até 24 horas, após a indução do dano. Dados obtidos por Rajao (Tese de Doutorado).

#### **2.4.6 TbCSB, TbXPBz e TbXPG participam do TC-NER de lesões induzidas por cisplatina**

No capítulo anterior mostramos que o reparo de lesões causadas por cisplatina no DNA nuclear da forma sanguícola do *T. brucei* é muito eficiente, de modo que praticamente todas as lesões foram removidas em até 1 hora (Figura 1.7a, linha tracejada com triângulos). A alta eficiência de reparo das lesões induzidas por cisplatina foi também observada na forma epimastigota de *T. cruzi* (Rajao, Tese de Doutorado). Com o intuito de investigarmos o papel do NER no reparo de lesões geradas por cisplatina, as linhagens silenciadas para os genes do NER foram cultivadas com 0, 1, 2 e 5  $\mu$ M de cisplatina, na presença ou ausência de tetraciclina. Em seguida, a porcentagem de sobrevivência dos parasitos foi medida conforme descrito anteriormente (Figura 2.17). O silenciamento de TbCSB e TbXPBz aumentou a sensibilidade do parasito à cisplatina, de maneira similar ao observado no tratamento com UV. Corroborando com os nossos resultados, foi descrito que a linhagem de *T. brucei*, nocaute para XPBz, apresenta maior sensibilidade à cisplatina (Badjatia et al., 2013). O RNAi contra XPG, que parece não atuar na resposta a UV, também resultou em maior sensibilidade à cisplatina. Em contraste, a inibição da expressão de TbXPC, TbDDB ou TbXPB resulta em maior tolerância à cisplatina, sugerindo que estes fatores do NER podem reconhecer lesões geradas por cisplatina, embora eles não contribuam para direcioná-las a uma via de reparo eficiente. Por último, verificamos que a inibição de TbXPD, TbXPF ou TbERCC1 não afeta a sensibilidade à cisplatina. Estes resultados indicam que os danos no DNA causados por cisplatina são processados de maneira diferente daquela vista nas lesões induzidas por UV. Deste modo, sugerimos um modelo em que o TC-NER em tripanossomatídeos promove o reparo das lesões causadas por cisplatina, em uma reação dependente de TbCSB, TbXPBz e TbXPG. O rápido reparo das lesões geradas por cisplatina contrastaria, dessa forma, com o suposto mecanismo de tolerância a danos induzidos por UV, promovido por TbCSB e TbXPBz, mas não pela TbXPG.

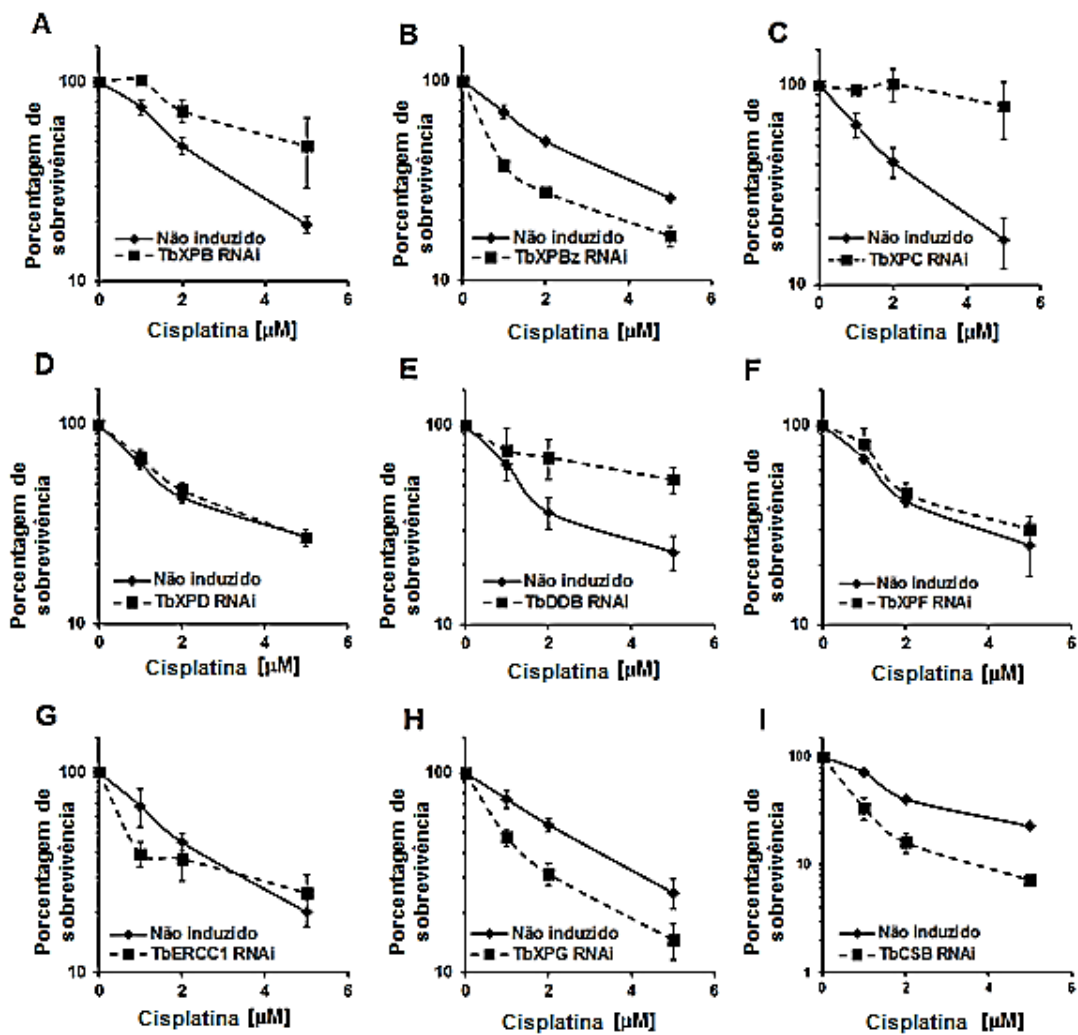


Figura 2.17: TbCSB, TbXPBz e TbXPG participam do TC-NER das lesões induzidas por cisplatina. Curvas de sobrevivência, após a exposição a 1, 2 e 5  $\mu\text{M}$  de cisplatina, das linhagens da forma sanguícola de *T. brucei*, depletadas para os genes XPB, XPBz, XPC, XPD, DDB, XPF, ERCC1, XPG e CSB (linhas tracejadas com quadrados, de A-I, respectivamente), comparadas com seus respectivos controles (linhas pretas com losangos). A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de células presentes nos grupos tratados, sobre o número de células presentes nos controles não tratados. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

#### **2.4.7 Avaliação da expressão de mRNAs, derivados de uma unidade policistrônica do genoma do *T. brucei*, após a inibição por RNAi da expressão dos componentes do NER**

Para investigar o impacto da inibição dos componentes do NER sobre a expressão de determinados genes, posicionados ao longo de uma unidade poliscistrônica de transcrição, os níveis de mRNA destes genes foram determinados por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), antes e após a indução do RNAi. Os genes selecionados, para a análise da expressão, estão posicionados em uma região de ~170 kpb de uma unidade de transcrição policistrônica, que contém o mesmo segmento de DNA de 10 kpb analisado nos ensaios de cinética de reparo (Figura 2.18). A inibição de seis dos nove genes putativos do NER não causou nenhum efeito significativo na abundância dos transcritos examinados. Na figura 2.19a, demonstramos representativamente que a inibição de TbXPC não afeta o nível dos transcritos analisados. Entretanto, a inibição da expressão de TbCSB reduziu significativamente os níveis de mRNA de três dos sete genes analisados (Figura 2.20). Tanto a inibição de TbXPB, quanto de TbXPD, afetam a transcrição dos genes contidos na unidade de transcrição policistrônica analisada. A inibição de TbXPB resultou em uma diminuição significativa dos níveis de mRNA de cinco dos sete genes analisados, enquanto que a inibição de TbXPD resultou na redução significativa da abundância dos transcritos em três dos sete genes (Figuras 2.19b e 2.19c). Esses dados corroboram o papel de TbXPB e TbXPD no processo de transcrição, em *T. brucei*, como componentes do complexo TbTFIIH. Além disso, o papel de TbXPD, no processo de transcrição, é também evidenciado pela necessidade dessa helicase para a expressão do *Spliced Leader* (SL)- RNA (Lee et al., 2009).



Figura 2.18: Unidade policistrônica do cromossomo 8 de *T. brucei*, cuja expressão de oito genes foi analisada, após a inibição da expressão dos componentes do NER, por RNAi. Painel superior: representação das unidades policistrônicas presentes em um trecho de 600 kbp do cromossomo 8 de *T. brucei*. As ORFs codificadas na fita senso estão representadas pels setas azuis e as ORFs codificadas na fita anti-senso estão representadas pelas setas vermelhas. Painel inferior: visão detalhada da unidade policistrônica analisada neste trabalho, que está delimitada por duas regiões de troca de fita. Os genes cuja expressão foi analisada, após inibição dos fatores do NER, por RNAi, estão circulosados em verde [HIPB1 (Tb427.08.2890), MANB2 (Tb427.08.2940), TCPB3 (Tb427.08.3150), HIP2B4 (Tb427.08.3230), ACTA1 (Tb427.08.3310), DNATA3 (Tb427.08.3350), HIP3A4 (Tb427.08.3490) e HIP4A5 (Tb427.08.3520)]. Estas representações gráficas foram moficadas do banco de dados TriTryp DB (Aslett et al., 2010).

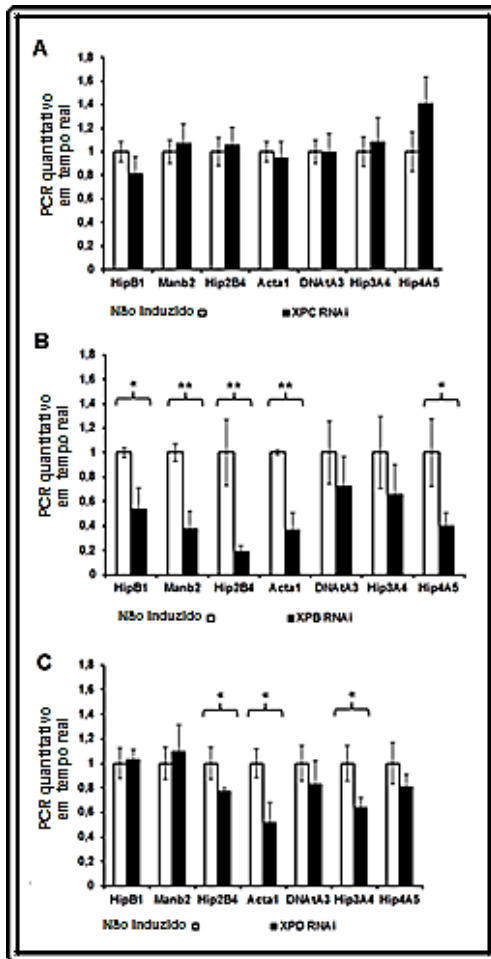


Figura 2.19: Avaliação dos níveis de mRNA, derivados de uma unidade de transcrição policistrônica, antes e após a indução do RNAi contra os componentes do NER em *T. brucei*. Os níveis de mRNA dos genes HipB1, Manb2, Hip2B4, Acta1, DNAtA3, Hip3A4, and Hip4A5 foram comparados por PCR quantitativa em tempo real na ausência e presença de indução, por tetraciclina, do RNAi contra os componentes do NER. Os genes estão representados na mesma ordem em que os mesmos se encontram no genoma do parasito, onde os genes proximais ao sítio de início de transcrição estão dispostos à esquerda. \* e \*\* representam valores de  $p < 0,05$  e  $< 0,01$ , respectivamente. a-), b-) e c-), demonstram, respectivamente, as quantificações realizadas nas linhagens silenciadas para XPC, XPB e XPD.

#### **2.4.8 Avaliação dos níveis de mRNA, após a inibição da expressão de TbCSB por RNAi, na presença de danos no DNA**

Para determinarmos o papel de TbCSB na expressão gênica, após o dano no DNA, os níveis de mRNA dos mesmos genes analisados previamente foram novamente medidos, após a indução do RNAi contra TbCSB, com concomitante exposição à radiação UV ou à cisplatina (Figura 2.20). Como descrito anteriormente, a inibição de TbCSB, sem a indução de dano no DNA, reduz a abundância do mRNA de três dos sete genes analisados (Hip2B4, Acta1 and DNATA3). Após o tratamento com UV ou cisplatina, na presença de níveis normais de TbCSB, ocorre o mesmo efeito sobre os transcritos desses genes. Além disso, a exposição à UV leva a um aumento nos níveis de mRNA de HipB1 e Manb2. Esses dados sugerem que as lesões causadas por UV afetam a abundância de mRNA, porém seguindo padrões complexos, possivelmente dependentes da localização dos genes ao longo da unidade policistrônica. Ao silenciarmos TbCSB por RNAi e expormos as células à UV, os níveis de mRNA aumentam significativamente nos cinco dos sete genes analisados, quando comparados com o controle não induzido e não tratado. Além disso, a expressão de todos os genes examinados aumenta, nas células que receberam duplo tratamento (UV + RNAi contra TbCSB), quando comparada a expressão desses genes nas linhagens submetidas a apenas um dos tratamentos. O aumento dos níveis de mRNA foi mais pronunciado nos três genes situados próximos ao sítio de início de transcrição (~2, 10 e 60 kbp) (Figura 2.20a). Esses dados sugerem que a perda de TbCSB aumenta a geração ou a estabilidade de mRNAs na presença de danos causados por UV.

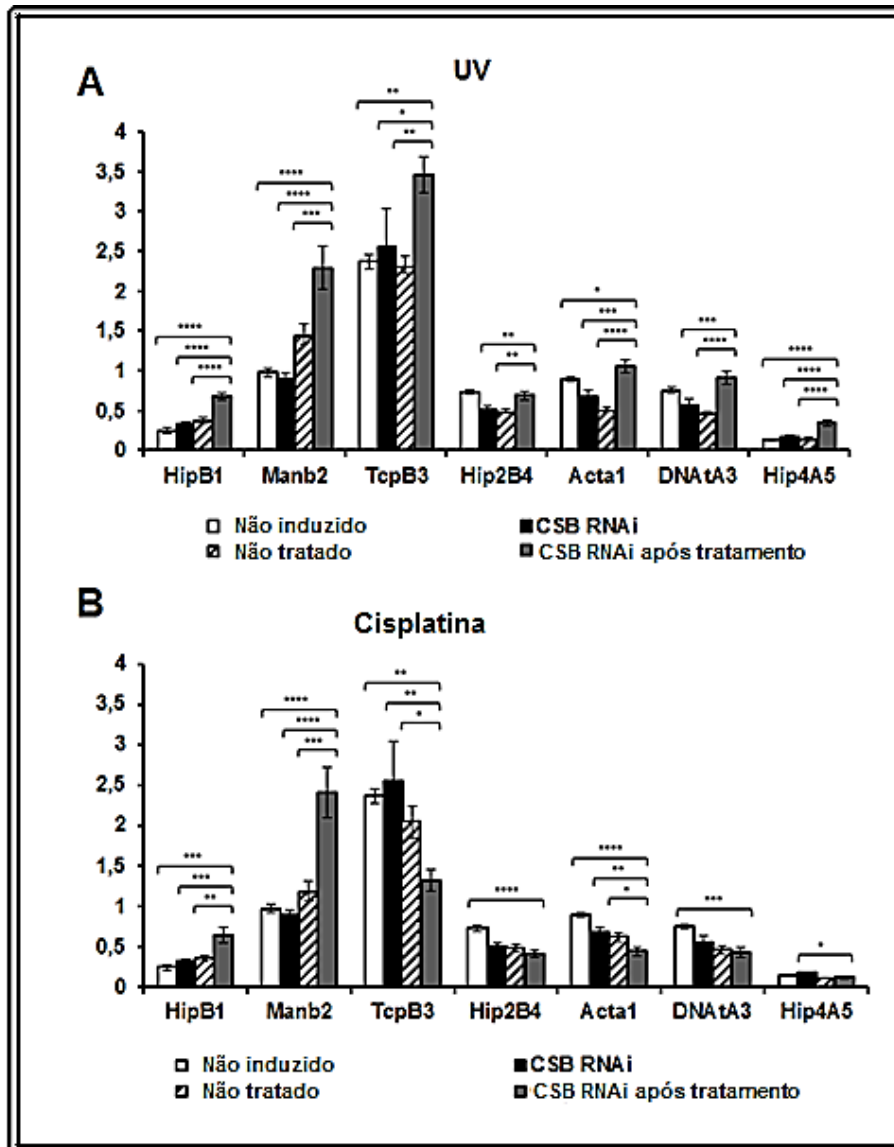


Figura 2.20: Avaliação dos níveis de mRNA, após o silenciamento de CSB, na presença de dano no DNA. Os níveis de mRNA dos genes HipB1, Manb2, TcpB3, Hip2B4, Acta1, DNAta3, e Hip4A5 foram medidos na linhagem silenciada para CSB, após indução de dano do DNA. Está representada apenas a análise estatística da comparação entre o grupo “CSB RNAi após tratamento” (barras cinzas) contra os seus respectivos controles (barras brancas, pretas e hachuradas). \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* indicam valores de  $p < 0,05$ ,  $< 0,01$ ,  $< 0,001$  and  $< 0,0001$ , respectivamente. a-) Dano no DNA induzido por  $1500 \text{ J/m}^2$  de UVC. b-) Dano no DNA induzido após exposição a  $50 \mu\text{M}$  de cisplatina por 3 horas.



Um efeito distinto é visto na indução de RNAi contra TbCSB, mas na presença de cisplatina. Nesta condição, os níveis de mRNA dos dois genes mais próximos ao promotor aumentam, assim como é visto no tratamento com UV. Entretanto, os níveis de mRNAs dos outros cinco genes situados a jusante na unidade policistrônica diminuem, quando comparados aos níveis vistos após a exposição à UV. Além disso, na maioria dos casos, os níveis desses transcritos estão mais baixos em relação ao controle não induzido e não tratado (Figura 2.20b). Esses dados podem sugerir que TbCSB medeia diferentes respostas, dos componentes do NER, a lesões induzidas por UV e por cisplatina, o que seria consistente com os papéis distintos de TbXPG na resposta a essas duas formas de dano (Figuras 2.15 e 2.17).

Sugerimos, dessa forma, que TbCSB controla a passagem da RNA polimerase II através de lesões geradas por UV. Na ausência de TbCSB, esse controle é perdido e a passagem por essas lesões torna-se mais eficiente, o que aumenta a abundância de mRNA. Isso pode contribuir para que as células sejam resgatadas da morte, ao evitar um acúmulo extensivo de RNA polimerases bloqueadas nos sítios das lesões geradas por UV. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que, durante as primeiras horas após exposição à UV, a indução de RNAi contra TbCSB aumenta a sobrevivência do parasito (Figura 2.21). Por outro lado, é provável que a transcrição de moldes com lesões, na ausência de TbCSB, seja propensa a erros, acarretando na superprodução de mRNAs mutados, que seriam tóxicos para o parasito. Isso explicaria o aumento da sensibilidade à UV, nas células RNAi para TbCSB, durante as 24 horas após a irradiação. Já em relação aos adutos induzidos por cisplatina, propomos que os mesmos exerçam um efeito mais pronunciado na transcrição do *T. brucei* do que as lesões geradas por UV, ao induzirem o bloqueio total da RNA polimerase II, inviabilizando o processo de transcrição translesão. Dessa forma, sugerimos que a resposta primária à cisplatina consiste na sinalização, via TbCSB, para a remoção dos adutos pelo TC-NER, o que envolveria a participação de TbXPG. Além disso, propomos que na ausência de TbCSB, as lesões de cisplatina aumentam o bloqueio da transcrição ao longo dos policistrons, resultando na diminuição dos níveis de mRNA, observada para a maioria dos genes analisados.

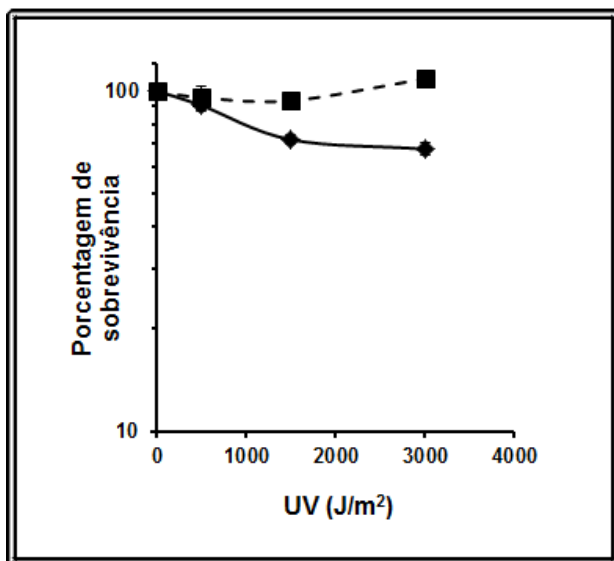


Figura 2.21: O silenciamento de CSB aumenta, em curto prazo, a resistência à irradiação UV. Curva de sobrevivência da linhagem silenciada para CSB 4 horas após o tratamento com  $1500 J/m^2$  de UVC, comparada com o respectivo controle não induzido. A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de células presentes nos grupos tratados, sobre o número de células presentes nos controles não tratados. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

### **2.4.9 As proteínas putativas do GG-NER estão envolvidas no reparo de *crosslinks* entre as fitas complementares do DNA**

A ciclofosfamida é um agente alquilante, que adiciona adutos na posição N7 da guanina, levando à formação de ligações covalentes entre guaninas posicionadas em fitas complementares do DNA. Tais lesões também são conhecidas como *interstrand crosslinks* (ICLs) (Povirk & Shuker, 1994). Essa droga tem sido usada como agente terapêutico em uma ampla variedade de cânceres e doenças autoimune (Dollery, 1999). As lesões do tipo ICLs são processadas, em eucariotos basais, pela cooperação de três vias de reparo, ou de tolerância a lesões no DNA: NER, recombinação homóloga e síntese translesão (McVey, 2010). Para investigarmos o papel dos componentes putativos do NER, durante o reparo de ICLs, cultivamos formas sanguícolas do parasito, submetidas ou não à inibição da expressão dos genes alvos, na presença de diferentes doses de ciclofosfamida. Em seguida, a sobrevivência foi medida conforme descrito anteriormente (Figura 2.22). Foi observado que a inibição por RNAi da expressão de TbXPC, TbDDB, TbXPF e TbERCC1 resulta em maior sensibilidade à ciclofosfamida, indicando que estes genes possam ser importantes no reparo de ICLs. Em contraste, a inibição de TbCSB, TbXPB, TbXPBz, TbXPD e TbXPG não exerceu nenhum efeito na sensibilidade à ciclofosfamida. Nos estudos descritos anteriormente, havíamos indicado que a separação funcional predita para o NER em TC-NER e GG-NER pode ser observada no perfil de resposta das linhagens silenciadas tratadas com UV ou cisplatina. Esse mesmo perfil é também consistente com as observações feitas nas curvas de sobrevivência à ciclofosfamida. Dessa forma, propomos que TbXPC e TbDDB possam recrutar a endonuclease TbXPF/ERCC1 para o reparo de ICLs, em uma via da qual TbCSB, TbXPBz e TbXPG não participam. Igualmente ao que foi observado na resposta a UV e cisplatina, TbXPB e TbXPD não participariam do reparo de DNA.

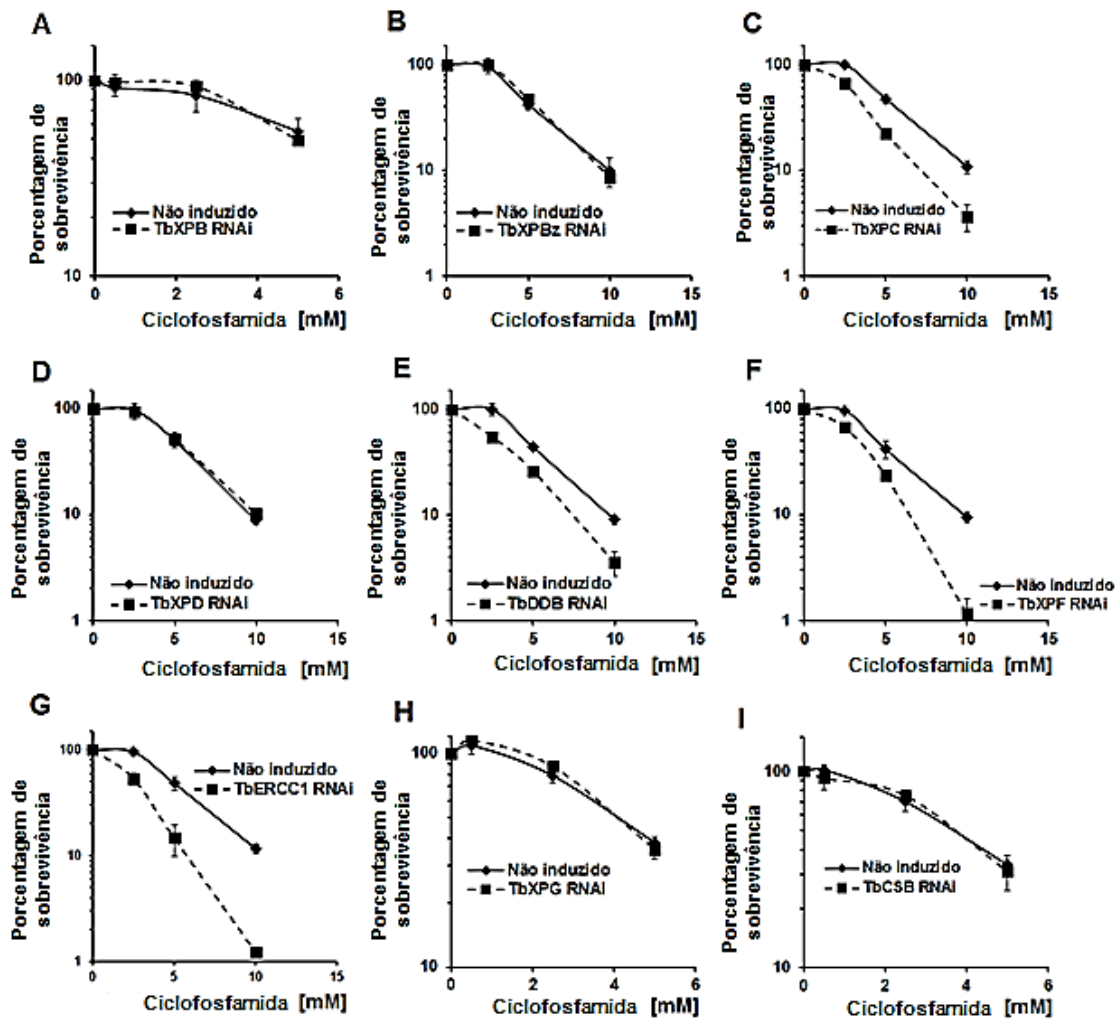


Figura 2.22: As proteínas putativas do GG-NER de *T. brucei* estão envolvidas no reparo de lesões do tipo *crosslink* entre as fitas do DNA. Curvas de sobrevivência, após o tratamento com 1-10 mM de ciclofosfamida, de células da forma sanguícola de *T. brucei*, silenciadas para os componentes do NER XPB, XPBz, XPC, XPD, DDB, XPF, ERCC1, XPG and CSB (de A-I, respectivamente - linhas tracejadas com quadrados), comparadas com seus respectivos controles não induzidos (linhas pretas com losangos). A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de células presentes nos grupos tratados, sobre o número de células presentes nos controles não tratados. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

## 2.5 Discussão

Nesta parte do trabalho, realizamos uma análise funcional da maquinaria predita para o NER em *T. brucei*. Nossos resultados sugerem que a natureza incomum da transcrição gênica em *T. brucei*, e possivelmente nos demais tripanossomatídeos, está associada à diversificação funcional do NER. Dados da literatura indicam que a maior parte do genoma dos tripanossomatídeos é constitutivamente transcrita (Siegel et al., 2011), uma vez que a maioria dos genes está organizada em unidades polisstrônicas. Além disso, estes parasitos não possuem os elementos de controle pré-transcricional da expressão gênica, associados à RNA polimerase II e a fatores de transcrição reguláveis (Vanhamme & Pays, 1995, Siegel et al., 2009). Com os nossos dados, podemos inferir que tal modo de expressão gênica, incomum entre os demais eucariotos, tenha redirecionado o NER nos tripanossomatídeos, de forma que o mesmo funcione predominantemente via TC-NER. Adicionalmente, as lesões no DNA, que escapam da ação do TC-NER, seriam processadas pela via de transcrição translesão. Deste modo, o papel de TbCSB não estaria limitado apenas ao NER, mas exerceria um papel crucial, atuando tanto no TC-NER, quanto na via de transcrição translesão. A hipótese do NER, em *T. brucei*, estar especializado na subvia acoplada à transcrição sugere que a manutenção da estabilidade genômica, neste parasito, seja provavelmente pouco similar a dos demais eucariotos, onde as vias TC-NER e GG-NER atuam paralelamente. Corroborando com essa hipótese, nossos resultados indicam que a maquinaria predita para atuar no GG-NER tenha sido desviada para outras funções essenciais do reparo. Além disso, identificamos várias modificações estruturais que se estendem pela maquinaria do NER, que serão descritas a seguir.

Conforme descrito anteriormente, *T. brucei* e os demais tripanossomatídeos possuem duas cópias da helicase XPB, designadas como TbXPB e TbXPBz. A primeira é parte do complexo TFIIH e é importante no processo de transcrição (Lecordier et al., 2007), enquanto que a última, além de não estar associada ao complexo TFIIH (Lee et al., 2009), perde o domínio N-terminal de interação com TbXPD, Tbp34 e Tbp52. Os resultados apresentados neste estudo confirmam que a ausência de TbXPBz por RNAi não afeta a viabilidade de *T. brucei* (Lecordier et al., 2007). Adicionalmente, demonstramos que o RNAi contra essa proteína confere, à forma

sanguícola do parasito, sensibilidade a radiação UV e cisplatina, evidenciando o seu papel no reparo de DNA. Além disso, a similaridade entre os fenótipos apresentados pelas linhagens silenciadas para TbXPBz e TbCSB sugere que essas proteínas estão relacionadas com a resposta a radiação UV e cisplatina. Entretanto, ao basearmos em nossos dados de sobrevivência, não encontramos evidências suficientes para relacionar TbXPB ou TbXPD a algum processo de reparo. Os ortólogos de TbXPBz, em tripanossomatídeos, mantêm conservados todos os domínios relacionados à função de DNA helicase (Lecordier et al., 2007). Sugerimos, dessa forma, que a duplicação de XPB tenha possibilitado com que TbXPBz assumisse a função de helicase associada ao reparo de DNA, substituindo ou superando a importância do complexo TbXPB-TFIIH nesse processo. Não está claro, entretanto, se TbXPBz poderia atuar com TbCSB e TbXPG, na ausência de um complexo análogo ao TFIIH, para mediar o reparo de DNA. Em outros eucariotos, XPB é uma helicase fraca, considerando que a interrupção da sua atividade não impede o funcionamento do NER. Por outro lado, foi observado que a perda da helicase XPD prejudica o funcionamento do NER (Coin et al., 2007), sugerindo que essa proteína possui a função de mover a fita que contém a lesão para fora do sítio de reparo. Contudo, especulamos dois cenários possíveis; um onde TbXPBz possa associar-se a outra helicase pertencente a uma variação do TFIIH, em que TbXPB e TbXPD são excluídos; e outro, no qual TbXPBz atuaria em outro complexo de reparo, não relacionado ao TFIIH. A observação de que o RNAi contra Tbp44, um componente do complexo TFIIH, resulta em sensibilidade a MMS e luz UV, poderia indicar que algumas das proteínas pertencentes ao TFIIH de tripanossomatídeos atuam na resposta a danos no DNA (Lecordier et al., 2007). Tal observação é consistente com a hipótese de reestruturação do TFIIH, durante o reparo, por exclusão de TbXPB e TbXPD e incorporação de TbXPBz.

Em relação às endonucleases putativas do NER, apresentamos evidências de que TbXPG é recrutada, após exposição à cisplatina, o que não acontece na resposta à radiação UV, uma vez que o RNAi contra essa enzima leva ao aumento da sensibilidade apenas no primeiro tratamento, porém não neste último. Não encontramos nenhuma evidência de que TbXPF-ERCC1 atue no NER, sugerindo a modificação desta maquinaria de reparo, em que apenas a endonuclease TbXPG atuaria efetivamente. Além disso, a sequência primária de TbXPG apresenta perdas expressivas de resíduos na região espaçadora, conservada no demais

eucariotos (Figura 2.10) e responsável por mediar as interações dessa endonuclease com TFIIH (Dunand-Sauthier et al., 2005). Tais mutações nessa proteína podem refletir a perda de envolvimento do TFIIH no NER de *T. brucei*, possivelmente pela perda da pressão seletiva sobre a interação TbXPG-TFIIH, ou sobre a interação de TbXPG com outro complexo proteico, análogo ao TFIIH, que contenha TbXPBz. Além disso, a perda de função do TFIIH no NER de *T. brucei* pode estar relacionada à possível perda do ortólogo de XPA em tripanossomatídeos, cujo papel seria estabilizar a associação de TFIIH à maquinaria do NER (Krasikova et al., 2010). Tem sido descrito que a interação de XPG com CSB exerce um papel crucial nas primeiras etapas do TC-NER (Iyer et al., 1996, Sarker et al., 2005), o que reforça a importância, que nós atribuímos a essa endonuclease, para o TC-NER de *T. brucei*. Por fim, ainda está a definir se a XPG é capaz de promover sozinha a excisão do oligonucleotídeo contendo a lesão, ou alternativamente, se essa enzima é auxiliada por outra endonuclease desconhecida.

A inibição da expressão, por RNAi, de TbXPC ou TbDDB causa sensibilidade à ciclofosfamida, uma droga indutora de ICLs, sugerindo que estas proteínas possuem um papel no reparo de DNA, que possivelmente é realizado em conjunto com as endonucleases TbXPF-ERCC1, já que o RNAi contra estas últimas confere o mesmo perfil de resposta visto no RNAi contra as primeiras. Entretanto, observamos que o RNAi contra TbXPC, TbDDB ou TbXPF-ERCC1 não aumenta a sensibilidade à cisplatina ou UV, sugerindo que o GG-NER desempenha um papel secundário em relação ao TC-NER. O aumento da resistência à cisplatina, causado pelo silenciamento de TbXPC, TbDDB e TbXPB, poderia indicar que essas proteínas reconheceriam os adutos de cisplatina, mas esse reconhecimento não direcionaria essas lesões para um reparo eficiente. A perda de reconhecimento das lesões induzidas por UV pelas proteínas TbXPC e TbDDB é um fato notável, já que tais lesões são reconhecidas por tais componentes do GG-NER na maioria dos organismos estudados (Chu & Chang, 1988, Feldberg & Grossman, 1976). A análise da estrutura tridimensional da proteína TbXPC sugere uma mudança fundamental no seu mecanismo de reconhecimento de lesões no DNA. Rad4, o homólogo de XPC em *S. cerevisiae*, reconhece, juntamente com RAD23, estruturas de fita simples associadas a lesões que distorcem a geometria da dupla fita do DNA. Para isso, o domínio  $\beta$ -hairpin de Rad4 é inserido através da dupla hélice, deslocando a fita contendo a lesão para fora de seu sítio de ligação ao DNA. Esse mecanismo de reconhecimento de lesão,

empregado pela Rad4, é a base para a sua capacidade de reconhecimento de uma ampla gama de lesões, que servirão de substrato para a ação do GG-NER (Min & Pavletich, 2007). Para avaliarmos se a perda de envolvimento de TbXPC no NER possa estar diretamente relacionada com a estrutura tridimensional dessa proteína, realizamos uma análise de modelagem molecular de TbXPC, baseada na estrutura de Rad4 ligada a uma molécula de DNA (Figura 2.23). Ao medirmos a distância entre os “braços”, que formam o sítio de reconhecimento da lesão em ambas as proteínas, verificamos que o tamanho aproximado do sítio de reconhecimento de lesão é de 13Å para Rad4 e de 27Å para TbXPC. Ao considerarmos que o diâmetro da dupla hélice do DNA é de 20 Å, seria razoável inferirmos que Rad4 seria capaz de reconhecer apenas uma fita do DNA, enquanto que TbXPC poderia abrigar totalmente a dupla fita. Tais experimentos de modelagem indicariam, dessa forma, a possibilidade de TbXPC ligar-se tanto à fita danificada, quanto à não danificada, refletindo o seu caráter de especialização no reconhecimento de ICLs e explicando o porquê do GG-NER de tripanossomatídeos não estar direcionado para as lesões causadas por UV e cisplatina.



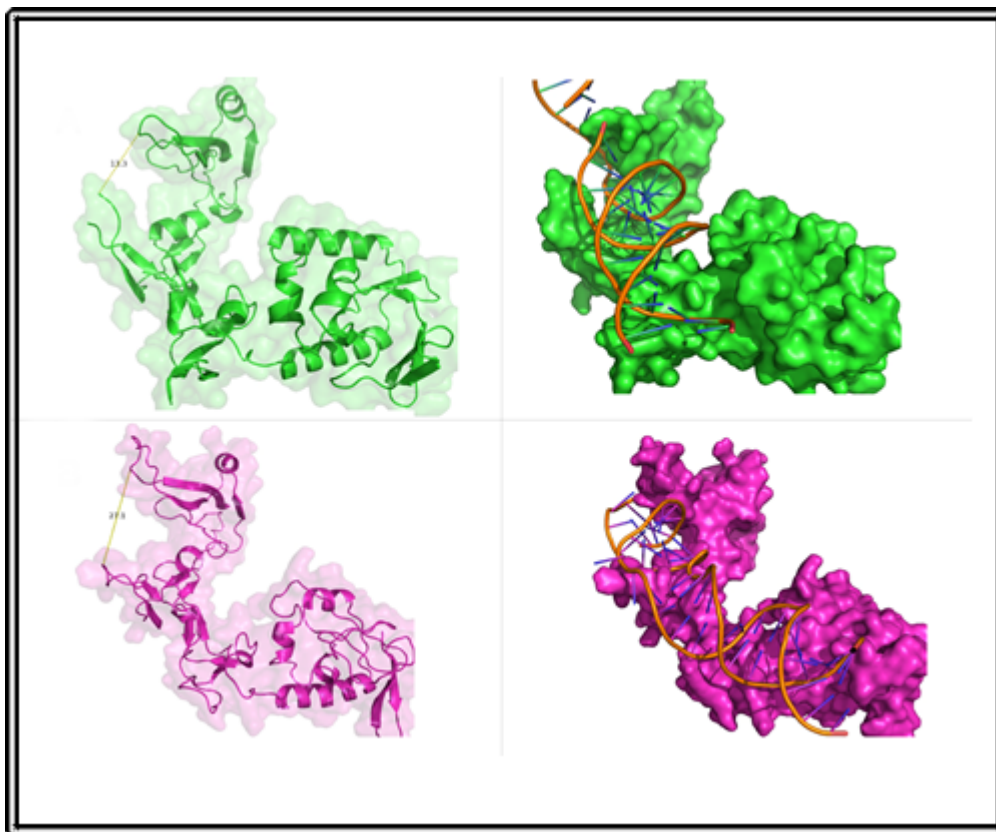


Figura 2.23: TbXPC apresenta um sítio de reconhecimento de lesão mais largo, quando comparada a seu homólogo em levedura. À esquerda: Modelo de ribbon, sobreposto com a representação de superfície das estruturas de Rad4 (em verde) e TbXPC (em roxo), demonstrando a distância entre os “braços” que constituem o sítio de reconhecimento de lesão de ambas as proteínas. À direita: Representação de superfície de ambas as proteínas, Rad4 (em verde) e TbXPC (em rosa), ligadas a uma molécula de DNA dupla fita.

As lesões que ocorrem nas fitas transcricionalmente ativas do DNA induzem o bloqueio, ou o retardamento, da atividade da RNA Pol II, aumentando a afinidade de CSB pelo complexo TFIIH e acionando, conseqüentemente, o reparo preferencial destas fitas por TC-NER (Hanawalt & Spivak, 2008). Alternativamente, a RNA Pol pode sintetizar RNA através de moldes contendo lesões (Saxowsky & Doetsch, 2006, Bregeon & Doetsch, 2011). Demonstramos, em *T. brucei*, que a recuperação das lesões induzidas por UV é mediada por TbCSB e TbXPBz. Adicionalmente, demonstramos também que as lesões causadas por UV praticamente não são reparadas no genoma nuclear dos tripanossomatídeos, levando-nos à conclusão de que o mecanismo empregado, por esses parasitos, para lidar com esse tipo de injúria no DNA, é basicamente o processo de transcrição translesão. O aumento da resistência à UV, visto nas células silenciadas para TbERCC1, TbXPF e TbXPG, poderia indicar que tais proteínas possam reconhecer as lesões geradas por esse agente, e que provavelmente a ligação dessas endonucleases às fotolesões inibiria o processo de transcrição translesão, diminuindo a sobrevivência dos parasitos.

A RNA Pol II possui a habilidade de inserir dois ribonucleotídeos de adenina em frente ao dímero CPD. O primeiro A é incorporado de forma independente de molde, seguindo a “regra do A”, enquanto que o segundo é inserido de forma molde-dependente. Quando um ribonucleotídeo de uracila é incorporado, em vez de uma segunda adenina, o erro de pareamento então gerado induz a parada da RNA Pol II. Dessa forma, pelo menos em *S. cerevisiae*, o processo completo de transcrição translesão, em moldes contendo CPDs, é livre de erros (Brueckner et al., 2007, Walmacq et al., 2012). A passagem da RNA pol por CPDs é também dependente de CSB, que representa, neste contexto, um ponto em comum entre as vias de TC-NER e de transcrição translesão (Lee et al., 2002). Em *T. brucei*, nossos resultados indicam que a depleção de TbCSB, por RNAi, associada à irradiação UV, induz o aumento dos níveis de mRNA dos genes avaliados. Sugerimos, dessa forma, que a RNA Pol II de tripanossomatídeos emprega um mecanismo de síntese translesão, através dos CPDs, e que TbCSB assume um papel crítico ao regular este processo. Como isso ocorre em *T. brucei* e como TbCSB conduziria à decisão sobre permitir a síntese translesão, ou ativar o TC-NER, ainda precisa ser definido. É possível que a necessidade dos tripanossomatídeos, em garantir continuamente a transcrição multigênica, implique em menor acurácia na produção de pré-mRNA, diante de algumas lesões.

Isso seria consistente com a observação de que, em curto prazo (em um período de poucas horas), a sobrevivência das células silenciadas para TbCSB, após irradiação com UV, é maior, já que na ausência de TbCSB, provavelmente não há bloqueio da RNA Pol II pelas fotolesões. Já em longo prazo, no entanto, a produção de mRNA propensa a erros, decorrente da ausência de TbCSB, poderia ser tóxica para o parasito, explicando a maior sensibilidade do *T. brucei* silenciado para TbCSB nos tempos tardios, após exposição à UV. Concluimos, com isso, que TbCSB atua como pivô na decisão de empregar a transcrição translesão, ou de ativar o TC-NER, o que está em conformidade com os nossos dados de RNAi, associado ao tratamento com cisplatina, cujas lesões no DNA possuem capacidade muito superior de bloquear a passagem da RNA Pol II, quando comparadas às fotolesões.

Em relação aos danos de cisplatina, o *knockdown* por RNAi de TbXPG causa grande mortalidade em *T. brucei*, indicando que essa endonuclease talvez seja recrutada para mediar o reparo. Sugerimos, dessa forma, que as estruturas volumosas das lesões de cisplatina são capazes bloquear a passagem da RNA Pol II, pelo menos de uma forma bem mais efetiva que o bloqueio da transcrição observado pela presença de um CPD (Damsma et al., 2007). Com isso, as lesões derivadas de cisplatina, e talvez de outros compostos platinados, têm de ser removidas via TC-NER, caso contrário, a transcrição será severamente interrompida. Consistente com esse cenário, após o tratamento com cisplatina e silenciamento de TbCSB, os níveis de mRNA dos genes posicionados dentro do segmento policistrônico não acompanham o aumento detectado, após exposição à UV, com concomitante depleção de TbCSB. Além disso, demonstramos que os danos no DNA induzidos por cisplatina, ao contrario das fotolesões, são eficientemente removidos em tripanossomatídeos, sendo que, nas condições testadas, praticamente todas as lesões foram reparadas em até uma hora. Esse reparo eficiente é provavelmente catalisado pelo TC-NER, já que a depleção de TbCSB, TbXPBz ou TbXPG leva a um aumento da sensibilidade à cisplatina, em igual extensão.

Demonstramos que a inibição por RNAi, mesmo que parcial, da expressão de TbXPC, TbDDB ou TbXPF-ERCC1 resulta em rápida morte celular, pelo menos na forma sanguícola do parasito. A indispensabilidade de TbXPB e TbXPD foi previamente documentada em *T.*

*brucei* (Lecordier et al., 2007), assim como em levedura, o que não seria inesperado, uma vez que essas proteínas fazem parte do complexo TFIIH e a ausência das mesmas inviabilizaria a transcrição. Em contraste, é descrito na literatura que cepas mutantes de *S. cerevisiae*, nocautes para RAD4 (XPC), RAD23, RAD1 (XPF) e RAD10 (ERCC1) são viáveis (Giaever et al., 2002). Até o momento, fenótipos severos, relativos a mutações no NER, estão limitados a eucariotos multicelulares. Entretanto, mesmos nesses organismos, alguns componentes do NER parecem ser dispensáveis. Por exemplo, sabe-se que linhagens mutantes de *A. thaliana*, nocautes para XPF-ERCC1, são viáveis (Vannier et al., 2009). Já em camundongo, animais portando deleções substanciais em XPC ainda permanecem viáveis (Sands et al., 1995), enquanto que, a perda quase completa de ERCC1 não inviabiliza o crescimento embrionário, até o final do período gestacional. Em *C. elegans*, a perda de RAD23 ou XPC não é imediatamente letal, sendo que a deficiência neste primeiro ainda permite o completo desenvolvimento embrionário, porém causa esterilidade materna (Kamath et al., 2003). Embora tenha sido proposto aqui que a transcrição multigênica, em *T. brucei*, faria com que o NER assumira grande importância, esta não seria uma explicação suficiente para sustentar a essencialidade destes genes, já que não encontramos nenhuma evidência de que TbDDB, TbXPC ou TbXPF/ERCC1 reparem danos induzidos por UV ou cisplatina via TC-NER. Tal observação poderia sugerir, por outro lado, que estes genes teriam assumido uma função diferente, embora essencial, de natureza desconhecida.

ICLs são lesões altamente genotóxicas, cujo reparo requer vários fatores, derivados de mais de uma via de reparo independente (McVey, 2010). Neste trabalho, demonstramos que TbXPC, TbDDB e TbXPF-ERCC1, que presumivelmente atuam no GG-NER, são importantes no reparo de ICL em *T. brucei*, já que o RNAi contra esses fatores aumenta a sensibilidade do parasito à ciclofosfamida. O papel de proteínas do GG-NER, no reparo de ICL em *S. cerevisiae*, tem sido descrito na literatura (Saffran et al., 2004), em que cepas nocautes para Rad4 apresentam sensibilidade aos agentes causadores de ICLs mecloretamina, mitomicina C e cisplatina (McHugh et al., 1999, Wu et al., 2004). Entretanto, células de mamíferos deficientes para XPA ou XPC apresentam apenas sensibilidade moderada a indutores de ICL (Clingen et al., 2007). A alta sensibilidade a agentes indutores de ICL, falência da medula óssea e alta frequência de cânceres são os sintomas típicos de humanos que possuem

mutações nos genes cerne do complexo FA (*Fanconi Anemia*) (Deans & West, 2011), os quais parecem estar ausentes nos eucariotos unicelulares. Nesses últimos, como levedura e tripanossomatídeos, o reconhecimento de ICLs e o reparo via GG-NER assumem grande importância. A endonuclease XPF representa um dos fatores do NER mais críticos para o reparo de ICLs, já que células deficientes em XPF apresentam grande sensibilidade a agentes causadores de ICL em levedura, *Dictyostelium discoideum* e humanos (McVey, 2010). Além disso, em *D. discoideum*, XPF é a proteína mais crítica para a resistência a agentes causadores de ICL, independentemente do fato de este organismo ser dotado de quase todos os componentes do complexo FA (Zhang et al., 2009). Essas descobertas parecem ser consistentes com o nosso trabalho, realizado em *T. brucei*, em que o RNAi contra TbXPF ou TbERCC1 resulta em extrema sensibilidade à ciclofosfamida. É possível especular que a ampla dependência das endonucleases do NER, e também possivelmente das proteínas do GG-NER, para a resistência a agentes causadores de ICL, seja uma característica ancestral do reparo de DNA entre os organismos vivos. Entretanto, o motivo pelo qual a atividade das endonucleases do NER assume grande importância em *T. brucei*, e talvez nos demais tripanossomatídeos, ainda é desconhecido.

Através dos experimentos de modelagem molecular, sugerimos um novo mecanismo empregado pela TbXPC, para a ligação a danos no DNA, em detrimento ao mecanismo de reconhecimento de lesões de Rad4 (Min & Pavletich, 2007), o que seria consistente com a especialização do GG-NER de *T. brucei* em processar lesões do tipo ICL. As proteínas XPC-Rad23b de humanos também são capazes de se ligarem ao ICL induzido por psoraleno (Thoma et al., 2005), embora este complexo provavelmente compartilhe o mesmo mecanismo de reconhecimento de lesões que seu homólogo em levedura (Min & Pavletich, 2007). Ainda serão necessários experimentos subsequentes, para definirmos o espectro de lesões endereçado ao reconhecimento de TbXPC, assim como é de nosso interesse esclarecer o motivo pelo qual os componentes do GG-NER são essenciais ao parasito. As regiões subteloméricas do *T. brucei* abrigam um imenso número de genes de VSG (Variant Surface Glycoprotein) (Marcello & Barry, 2007), que são constitutivamente reprimidos *in situ*. O GG-NER, nesse caso, poderia ter uma função nesta e em outras regiões específicas do genoma do parasito, cuja transcrição é silenciada, como por exemplo, os mini-cromossomos especializados. Contudo, a descoberta de

que os componentes do NER em *T. brucei*, que a princípio atuariam basicamente no NER, tenham assumido funções distintas daquelas exercidas pelo NER de seus respectivos hospedeiros, indicaria a existência de potenciais alvos terapêuticos para a Doença do sono e demais tripanossomíases.

Em suma, os nossos dados indicam que os componentes do NER em tripanossomatídeos, apesar do alto grau de conservação apresentado por suas sequências codificadoras, possuem adaptações únicas, de modo que o TC-NER atua eficientemente nas lesões que impedem a atividade da RNA Pol II, enquanto que as lesões que não bloqueiam a transcrição são processadas por um mecanismo de tolerância ao dano no DNA. Além disso, a subvia GG-NER destes parasitos é especializada no reparo de ICL, podendo atuar, inclusive, em outros processos essenciais do metabolismo de DNA.

## 2.6 Perspectivas

Avaliar a contribuição individual dos genes TbXPBz, TbXPG e TbCSB para o reparo de lesões causadas por cisplatina, via TC-NER.

Avaliar a contribuição individual dos genes TbXPC, TbDDB e TbXPF/ERCC1 para o reparo de ICLs, via GG-NER.

Fazer uma imunoprecipitação de TbDDB, para verificarmos em *T. brucei*, se esta proteína forma dímeros com outras proteínas, possivelmente análogas à XPE, que reconheceriam lesões do tipo ICLs.

Realizar experimentos de transcrição *in vitro*, a partir de extratos protéicos de *T. brucei*, ante e após inibição de TbCSB, na presença de moldes de DNA não lesionados e contendo dímeros de pirimidina ciclobutano, 6-4 fotoprodutos e adutos de cisplatina, de forma a testar a nossa hipótese sobre o papel de TbCSB na regulação do processo de transcrição translesão em *T. brucei*.

Avaliar o papel das proteínas do NER na forma procíclica do *T. brucei*.

## Capítulo 3: O papel da Asf1A na resposta a danos no DNA em *T. cruzi* e *L. major*

### 3.1 Introdução

Nesta terceira parte do trabalho, o foco estará voltado para o momento em que, após o reparo ter ocorrido, os mecanismos efetores da resposta a danos no DNA estariam direcionando qual será o destino a ser seguido pela célula: saída do *checkpoint* dependente de lesões no DNA e mitose ou morte celular. Abordaremos este momento, ao analisarmos o papel da proteína Asf1, na resposta a danos no DNA, nos tripanossomatídeos *T. cruzi* e *L. major*.

O conjunto de histonas, variantes de histonas e as suas respectivas modificações pós-traducionais presentes nos tripanossomatídeos podem revelar diferentes mecanismos de controle do reparo de DNA e de resposta a danos no DNA. Tripanosomas possuem duas formas de cada uma das quatro histonas, cujas sequências de aminoácidos variam consideravelmente das histonas canônicas dos metazoários (Talbert & Henikoff, 2010). Além disso, esses parasitos apresentam modificações pós-traducionais em suas histonas que são exclusivas do grupo (Janzen et al., 2006). Como exemplo desse tipo de modificação relacionada à DDR, foi recentemente descrito que a sinalização da presença de lesões no DNA é feita em *T. brucei* por uma histona H2A fosforilada em uma treonina. Em todos os eucariotos, variando de humanos até levedura, a presença de danos no DNA é marcada pela fosforilação de uma serina da histona H2A(X) (Glover & Horn, 2012). Tais descobertas evidenciam que o código de histonas em tripanossomatídeos, assim como ocorre em outros organismos, está associado a vários processos celulares, incluindo reparo de DNA e resposta a danos no material genético, porém este código operaria em uma linguagem diferente daquela amplamente difundida entre os demais eucariotos.



A dinâmica da cromatina está intimamente relacionada aos processos de metabolismo de DNA, tais como replicação, reparo e recombinação. Além das histonas, outras proteínas não-histonas exercem um papel crucial na modificação da cromatina, durante esses processos. Tais proteínas também intermedeiam a comunicação entre o estado da cromatina e as outras vias do metabolismo celular. Com isso, modificações na cromatina estão diretamente envolvidas na resposta a danos no DNA, influenciando diretamente nos processos de sobrevivência da célula, após exposição a agentes genotóxicos. Essa comunicação é feita através de modificações pós-traducionais na rede de proteínas que compõem a cromatina, ou que estão diretamente relacionadas a ela. Dentre essa complexa rede de proteínas, daremos ênfase nesta seção à proteína Asf1, que possui a função de chaperona de histonas.

Asf1 (*anti-silencing function 1*) é uma chaperona que liga-se ao dímero de histonas H3-H4, durante a dinâmica de montagem e desmontagem dos nucleossomos. Conseqüentemente, essa proteína participa de importantes funções celulares que envolvem o remodelamento da cromatina. A sua função, portanto, é empregada durante os processos de controle da expressão gênica, resposta a danos no DNA, recombinação, replicação e reparo do DNA (Ransom et al., 2010). Asf1 é uma proteína ubíqua entre os eucariotos, estando presente em uma ou duas cópias, considerando-se um genoma haplóide. A duplicação de Asf1 é observada em mamíferos, plantas, vermes e protozoários, mas não em levedura (Mousson et al., 2007). A associação desta proteína à resposta a danos no DNA, bem como às vias de replicação e reparo de DNA, foi estabelecida, primeiramente, a partir da observação fenotípica de cepas de levedura nocautes para este gene. Tais linhagens apresentam retardo de crescimento, com atraso em G2/M (Ramey et al., 2004); sensibilidade a vários agentes genotóxicos (cisplatina, UV, MMS e bleomicina) (Le et al., 1997, Tyler et al., 1999, Ramey et al., 2004) e maior vulnerabilidade ao estresse replicativo, demonstrada pela maior sensibilidade a mutações na DNA polimerase e aos tratamentos com camptotecina e hidroxiuréia (Ramey et al., 2004). Além disso, a ausência de Asf1, em levedura, torna o processo de montagem do nucleossomo lento e ineficiente, elevando os níveis de danos espontâneos no DNA e contribuindo para a formação de aberrações cromossômicas (Myung et al., 2003).

O papel de Asf1, na resposta a danos no DNA, ocorreria em dois momentos: na etapa de remoção das histonas, antes do reparo da lesão no DNA, permitindo o acesso da maquinaria de reparo ao sítio de dano; sendo que o segundo momento de intervenção de Asf1 seria após o reparo ter sido concluído, durante a restauração da estrutura da cromatina. De acordo com o modelo proposto para a atuação de Asf1 antes do reparo, foi sugerido que, em condições normais, essa proteína estaria ligada à proteína TLK1/B (*Tousled-like kinase 1* e *Tousled-like kinase 1B*). Após o dano no DNA, TLK1/B fosforila a Asf1, liberando-a de modo que ela possa interagir com o dímero de histonas H3/H4. Essa interação promoveria a desmontagem do nucleossomo, uma vez que o complexo Asf1-H3/H4 seria deslocado para fora do sítio da lesão. TLK1/B, por sua vez, ao interagir com Rad9, promoveria o reparo da lesão (Sunavala-Dossabhoy & De Benedetti, 2009). Já no segundo modelo, essa proteína seria responsável pela desativação do *checkpoint*, que ocorre em resposta a danos no DNA, permitindo à célula retornar ao ciclo celular. Chen e colaboradores demonstraram que, em *S. cerevisiae*, após o reparo de quebras duplas no DNA, Asf1 promove a remontagem dos nucleossomos contendo a histona H3 acetilada em sua lisina 56. Essa modificação pós-traducional é o sinal necessário para que ocorra a desfosforilação de Rad53 (homóloga de Chk2 presente em mamíferos), uma proteína que em estado hiperfosforilado marca a parada do ciclo celular, por *checkpoint* dependente de dano (Chen et al., 2008). Além disso, tal modificação pós-traducional na histona H3 possui outras implicações importantes para o reparo de DNA, uma vez que, em levedura, os *foci* da histona H3 acetilada na lisina 56 colocaliza com *foci* de reparo; assim como a desacetilação deste resíduo da histona H3 está associada à indução de quebras duplas no DNA e ao acionamento da via de NHEJ, em organismos multicelulares (Gospodinov & Herceg, 2012). Foi demonstrado também, em levedura, que essa marca na histona H3 é um sinal necessário para a ativação de síntese translesão, através de lesões causadas por MMS (Guenole et al., 2013).

Dessa forma, Asf1 não atua diretamente no reparo das lesões geradas no DNA, após estresse genotóxico (Ramey et al., 2004). Em vez disso, essa proteína está envolvida no remodelamento da cromatina antes e/ou após o reparo do DNA. A atuação de Asf1 antes do reparo estaria mais relacionada a organismos dotados de TLK1/B, uma cinase amplamente difundida entre metazoários e plantas, mas que não está presente em levedura (Sillje et al.,

1999). Já o outro modelo, que propõe a participação de Asf1 após o reparo, ficaria mais restrito à levedura, pois Chk2 não interage com Asf1 em células de mamíferos (Groth et al., 2005). Em levedura, Asf1 permanece ligada à Rad53, a menos que ocorra uma lesão no DNA. A indução de danos no DNA resulta na fosforilação de Rad53, com concomitante liberação de Asf1, de modo que esta última possa promover as suas funções relacionadas à resposta ao dano no DNA (Hu et al., 2001, Linger & Tyler, 2007).

Apesar das proteínas TLK1/B estarem intimamente relacionadas à radioproteção e ao processo de desenvolvimento em organismos multicelulares, não sendo encontradas em praticamente todos os eucariotos unicelulares (Silljé et al., 1999), dois homólogos dessa proteína foram identificados em *T. brucei*, TLK1 e TLK2. A depleção de TLK1 por RNAi, neste parasito, provoca retardo do ciclo celular, durante a fase S, e impede a montagem do fuso mitótico. Tanto TLK1, quanto TLK2, são capazes de fosforilarem TbAsf1A e TbAsf1B, no entanto, apenas TLK1 é capaz de interagir com TbAsf1A e TbAsf1B *in vivo*. O silenciamento de TbAsf1A/B, em *T. brucei*, também induz ao acúmulo gradual dos parasitos na fase S do ciclo celular (Li et al., 2007, Alsford & Horn, 2012). A Asf1A localiza-se no citoplasma do *T. brucei*, migrando para a região perinuclear, durante a fase S. Essa proteína está envolvida na acetilação das histonas H3 e H4 e possivelmente com a importação das mesmas para o núcleo. Já a Asf1B localiza-se no núcleo desse parasito e estaria envolvida com o mecanismo de *checkpoint* dependente de dano no DNA (Pascoalino, Tese de Doutorado). A superexpressão de Asf1A, em *L. major*, induz maior expressão de genes relacionados ao remodelamento de cromatina e estresse, tais como genes de choque térmico (HSPs, do inglês *heat shock proteins*), oxirredução e proteólise. Já em relação à resposta a danos no DNA, a cepa de *L. major* superexpressora de Asf1 apresenta maior susceptibilidade a MMS, comparada à linhagem controle. (Scher et al., 2012).

Como a proteína Asf1A estaria envolvida na resposta a danos no DNA em *L. major*, é de nosso interesse saber o quanto isso está conservado entre os tripanossomatídeos. Apesar do crescente número de trabalhos, envolvendo os mecanismos do metabolismo de DNA em tripanossomatídeos, as diferenças dessas vias, entre esses parasitos, continuam pouco

exploradas. A análise comparativa dos genomas dos Tritryps (*T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*) sugere diferenças nas vias de metabolismo de DNA, que separam *L. major* de *T. brucei* e *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005), embora não haja comprovação experimental para tais inferências. Nesta parte do trabalho, pretendemos aprofundar o nosso conhecimento sobre as diferenças entre as vias de resposta a danos no DNA presentes em diferentes tripanossomatídeos. Para isso, investigaremos o papel da proteína Asf1A na DDR, em *T. cruzi*, comparando as funções dessa proteína, com aquelas exercidas pelas suas respectivas homólogas, em *L. major* e *T. brucei*.

## **3.2 Objetivos**

### **3.2.1 Objetivo geral**

Investigar o papel da proteína Asf1 na resposta a danos no DNA em *T. cruzi*.

### **3.2.2 Objetivo específico**

Avaliar o efeito da superexpressão de Asf1, durante o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, na presença de agentes genotóxicos.

### 3.3 Material e Métodos

#### 3.3.1 Cultivo dos parasitos

As linhagens geradas neste projeto de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, do clone CL Brener, transfectadas com os vetores pRockNeo e pRockNeo-Asf1a foram mantidas a 28°C em meio LIT (*liver infusion-tryptose*: 5g.L<sup>-1</sup>, NaCl 4g.L<sup>-1</sup>, bactotriptose 5g.L<sup>-1</sup>, KCl 0,4g.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g.L<sup>-1</sup>, dextrose 2g.L<sup>-1</sup>, hemina 0,2% 10ml em NaOH 0,05M) pH7.3, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 200.000 u/L de penicilina e 0,2 g/L de sulfato de estreptomicina e 200 µg/mL de G418 (Geneticin – Gibco).

#### 3.3.2 Obtenção da cepa superexpressora de Asf1A em *T. cruzi*

##### 3.3.2.1 Amplificação do gene TcAsf1A

A sequência de nucleotídeos referente à janela aberta de leitura do gene TcAsf1A foi encontrada no banco de dados dos genomas dos tripanossomatídeos ([www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org)). Utilizando-se a sequência da ORF de TcAsf1A, foram construídos iniciadores, para amplificarmos esse fragmento de DNA. Tanto o iniciador forward (Asf1XbaIF 5'-TCTAGAATGGGCACCCAACCCATTGTT-3') quanto o iniciador reverse (Asf1XhoIR 5'-CTCGAGTCACTTCATGGGCGCCTCATC-3') (IDT-*Integrated DNA Technologies*) contêm sítios de reconhecimento para enzimas de restrição, com a finalidade de gerar extremidades coesivas, após a realização de dupla digestão com essas enzimas, o que permitirá a clonagem no vetor de interesse. A reação de PCR foi realizada através do sistema de amplificação de alta acurácia *AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx SuperMix* (*Invitrogen*). Para isso, foram misturados 22,5 µL de *AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx Mix*, 200 nM de cada iniciador e, aproximadamente,

100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* clone CL Brener, cedido pelo Dr. Hélder M. V. Silva. A mistura de reação foi incubada no termociclador MJ Research PTC-100, utilizando-se o programa de 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 68°C; 10 minutos a 72°C e 4°C por tempo indeterminado. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1% (p/v), feito com TAE 0,5% (Tris-Acetato-EDTA) e corado com solução de brometo de etídeo a 100mg/mL, diluída 1:50.000 em TAE 0,5%.

### 3.3.2.2 Sub-clonagem e clonagem do gene TcAsf1a em pRockNeo

O produto de PCR obtido foi clonado primeiramente no vetor *pGEM-T Vector Systems (Promega)*, segundo recomendações do fabricante. Os clones positivos para o gene de interesse foram revelados por PCR de colônia. Essa técnica consiste em testar a presença do inserto clonado, ao inocularmos uma pequena quantidade da colônia de bactérias no mix de reação de PCR. Para as reações de PCR de colônia, foram utilizados 1x do Tampão IB (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 mM de MgCl<sub>2</sub> - Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda), 200 µM de dNTPS (Invitrogen), 100 nM de cada iniciador e 100 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda). Os clones positivos para a PCR de colônia foram crescidos em 5 mL de meio líquido 2xYT (16g de bacto tripton, 10g de extrato de levedura, 5g de NaCl e ddH<sub>2</sub>O q.s.p. 1L) com 5µL de ampicilina (100mg/mL). Os plasmídeos contidos nos clones selecionados foram extraídos utilizando-se o kit de extração de DNA plasmidiano *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*. Em seguida, o gene TcAsf1A foi retirado do vetor pGEM -T Vector®, por dupla digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*. A reação de digestão foi realizada através da incubação, por 3 horas a 37°C, do mix de reação contendo 1,5 µg de DNA plasmidiano, Tampão D (Promega) 1x, B.S.A a 100 µg/mL e 12 U de cada enzima de restrição (Promega). A banda corresponde ao fragmento desse gene foi purificada a partir do gel de agarose 1%, utilizando o kit de purificação *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)*, de acordo com as instruções do fabricante.

O vetor pRockNeo (Figura 3.1) foi submetido à dupla digestão com enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I, para gerar sítios de clonagem, compatíveis às extremidades coesivas geradas no amplicon do gene TcAsf1a. Em seguida, o vetor foi precipitado com PEG-8000 20% p/v e tratado com SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*).

Para as reações de ligação do gene TcAsf1A no vetor pRockneo digerido com *Xba*I e *Xho*I, o mix de reação contendo 50 ng do plasmídeo digerido, Xng (= 3 x ng vetor x Kb inserto / Kb vetor) de inserto, tampão 1x da T4 DNA ligase (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT e 25% p/v de polietileno glicol-8000) (*Invitrogen*) e 5 U da T4 DNA ligase (*Invitrogen*) foram incubados, a 14°C, por uma noite. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para a transformação de bactérias eletrocompetentes *E. coli* DH5α (genótipo: F<sup>-</sup>, φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), phoA, supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1). Para a transformação de bactérias, cerca de 10 ng de DNA plasmidiano, ou 3 μL de produto de ligação, foram adicionados a 50 μL da alíquota de bactéria eletrocompetente. Após 5 minutos de incubação no gelo, a bactéria contendo o DNA foi eletroporada e ressuspendida em 800 μL de meio líquido 2xYT. Em seguida, após incubação por 30 minutos a 37°C e 180 rpm, 100 μL desse volume foram plaqueados em meio 2xYT ágar (ampicilina a 100 μg/mL) e incubados a 37°C, por 16 horas.



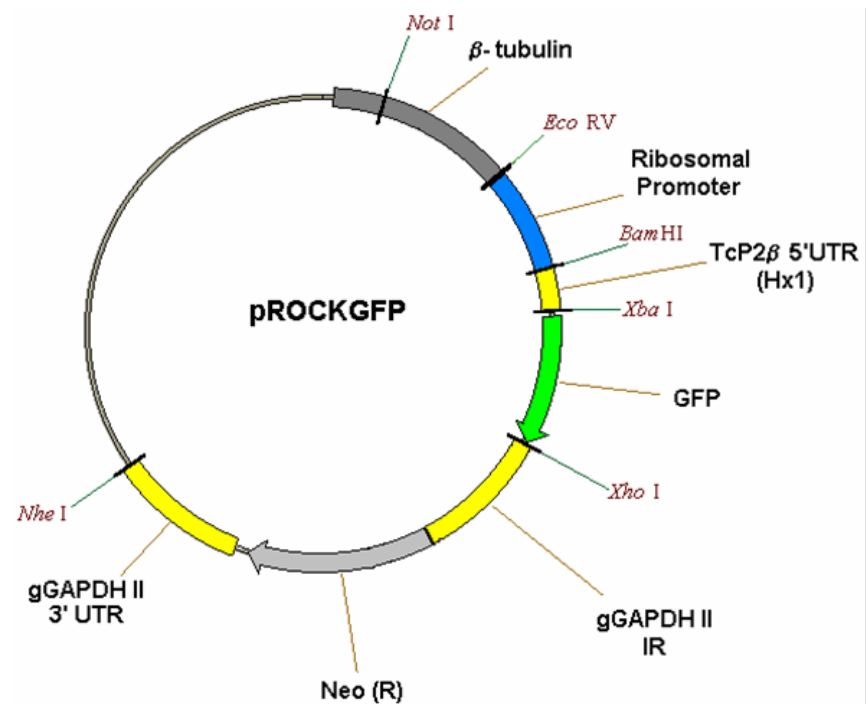


Figura 3.1: Mapa do vetor pRockGFPneo. Esse plasmídeo possui uma região homóloga ao gene da  $\beta$ -tubulina, um promotor ribossômico, região 5'UTR de TcP2 $\beta$ , regiões 3'UTR e intergênica de GAPDHII, com a função de auxiliar a expressão das proteínas de interesse. Neste caso, trocamos a ORF de GFP pela ORF de Asf1A, para a obtenção do vetor de superexpressão de Asf1A, em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Neo (R) representa resistência a G418 (neomicina ou geneticina) (DaRocha et al., 2004).

Os clones portando o gene de interesse foram selecionados por PCR de colônia e crescidos a 37°C, por 16 horas, em 5 mL de 2xYT, contendo ampicilina a 100 µg/mL, para extração do DNA plasmidiano. Para confirmar o sucesso da construção, o plasmídeo obtido foi submetido à dupla digestão com *Xba*I e *Xho*I, de modo a liberar o inserto correspondente ao gene TcAsf1A.

### 3.3.2.3 Transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi* com o vetor pRockNeo-TcAsf1A

Primeiramente, o gene TcAsf1a foi clonado no vetor pRockneo (DaRocha et al., 2004), que confere resistência à neomicina e promove a superexpressão, em *T. cruzi*, do inserto contido na sua região de polinker, sob a regulação de um promotor ribossômico. Após a clonagem, procedemos com a obtenção do plasmídeo pRockneo-Asf1A em larga escala, através do kit de *Maxiprep Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega)*. Em seguida, 100µg desse plasmídeo foi digerido com *Not*I e precipitado com isopropanol 100% e acetato de sódio a 3M. Após a precipitação, o DNA foi ressuspendido em 50µL de ddH<sub>2</sub>O e dosado no NanoDrop™ 1000. Após a dosagem, 50µg do DNA digerido e precipitado foi utilizado para a transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi* do clone CL Brener, cedido pelo Prof. Égler Chiari do Depto. de Parasitologia da UFMG. Para tal, 4x10<sup>7</sup> células em início da fase logarítmica da curva de crescimento (2x10<sup>7</sup>/mL) foram obtidas por centrifugação, a 3000 g, durante 10 minutos. Em seguida, os parasitas foram lavados 1 vez em PBS 1x e ressuspendidos em 0,4 mL de tampão de eletroporação (120 mM de KCl, 0,15mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM de HEPES, 2mM de EDTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6). Na sequência, a mistura das células em tampão de eletroporação, mais o DNA, foram colocados em uma cubeta de 0,2 cm, resfriada no gelo. A eletroporação foi realizada no Bio-Rad gene pulser, ajustado em 0,3 kV e 500 µF, com 2 pulsos (10 segundos de intervalo entre eles). A seleção da população de células transformantes foi feita por adição, durante quatro semanas após a transfecção, de 200 µg/mL de G418 (Geneticin – Gibco) ao meio de cultura utilizado na manutenção dos parasitos (LIT - liver infusion-tryptose -, pH 7.3, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 200.000u/L de penicilina e 0,2g/L de sulfato de estreptomicina (Invitrogen)). Após a seleção com G418, a cepa superexpressora de TcAsf1A foi continuamente mantida na presença deste antibiótico.

### 3.3.2.4 Confirmação da superexpressão de TcAsf1A, em *T. cruzi*, por PCR quantitativa em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada pelo sistema *ABI 7500 Sequence Detection System* (*Applied-Biosystems*) na presença do corante fluorescente *SYBR Green* (*SYBRGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems*). A otimização das reações foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas, sendo que a concentração final de oligonucleotídeos foi de 200 nM. Como controle de expressão endógena em *T. cruzi*, utilizamos a subunidade 8 da transaminase de âncora GPI (pseudogene GPI8 - TcCLB.507993.5), amplificado pelos iniciadores p1 – 5'-AGCATGCAAAGTGTGAATCGGACC-3' and p2 – 5'-AGGAGGAAGACTCGCACGTTCTTT-3'. A eficiência das reações de amplificação de cada gene alvo foi determinada pela curva padrão das amplificações de diluições seriadas (10x) do cDNA. A expressão relativa foi então calculada pelo método do  $2^{\Delta\Delta CT}$ .

### 3.3.3 Curvas de crescimento de *T. cruzi* na presença de agentes genotóxicos

Para a realização da curva de crescimento após irradiação gama, foram preparados 5 mL das culturas selvagem e superexpressora de Asf1A, no início da fase logarítmica de crescimento ( $0,5-1 \times 10^7$ ). Cada cultura foi irradiada em triplicata por uma fonte de cobalto ( $Co^{60}$ ), na dose de 500 Gy, a uma taxa de irradiação de 1578 Gy/h, no Laboratório de Radiação Gama (CDTN/UFGM). As contagens dos parasitos irradiados, em comparação com os controles não irradiados, foram realizadas a cada 24 horas, até as células atingirem a fase estacionária da curva de crescimento. Para contagem do número de parasitos, as culturas foram diluídas em solução de PBS-eritrosina (PBS a 0,15 M e eritrosina a 0,4% p/v, pH 7,2) e, posteriormente, quantificadas em câmara citométrica.

Para a realização da curva de crescimento na presença de peróxido de hidrogênio e MMS, as culturas selvagem e superexpressora de Asf1A de *T. cruzi*, no início de fase logarítmica de crescimento, foram cultivadas em triplicata na presença de 0,01 e 0,02% v/v de MMS e 200 e 400  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio. As contagens dos parasitos cultivados na presença desses agentes, em comparação com os seus respectivos controles, foi feita a cada 24 horas, até as células atingirem a fase estacionária da curva de crescimento. Para contagem do número de parasitos, as culturas eram diluídas em PBS-eritrosina (PBS a 0,15 M e eritrosina a 0,4% p/v, pH 7,2) e, posteriormente, os parasitos eram contados em câmara citométrica.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Obtenção da linhagem de *T. cruzi* superexpressora de TcAsf1A

Na tentativa de inferir a função da proteína Asf1A, na resposta a danos no DNA em tripanossomatídeos, geramos uma cepa de *T. cruzi* superexpressora de TcAsf1A, através da transfecção de formas epimastigotas desse parasito, com o vetor integrativo pRockneo-TcAsf1A. Para tal, amplificamos o gene Asf1A de *T. cruzi*, clone CL Brener, de modo que o amplicon estivesse flanqueado, à 5' e a 3', pelos sítios das enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I, respectivamente (Figura 3.2a). Esse amplicon foi subclonado no vetor pGEM -T Vector® e posteriormente clonado no vetor pRockneo (DaRocha et al., 2004). A construção pRockneo-TcAsf1A foi confirmada por digestão com as enzimas *Xba*I e *Xho*I, pois esta digestão liberou um fragmento do tamanho correspondente ao gene de interesse. A banda de 8,8 kb, que também aparece após a dupla digestão com essas enzimas, corresponde ao vetor linearizado sem o inserto (Figura 3.2b). Após confirmação da clonagem, o plasmídeo pRockneo-TcAsf1A foi linearizado pela digestão da enzima de restrição *Not*I (Figura 3.2c) e utilizado na transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, para a obtenção da linhagem superexpressora de TcAsf1A. A confirmação da superexpressão de TcAsf1A, em *T. cruzi*, foi realizada por PCR quantitativa em tempo real, revelando que o mRNA deste gene está 3,83 vezes mais abundante na cepa superexpressora, quanto comparada à cepa controle, transfectada com o vetor vazio (Figura 3.2d).

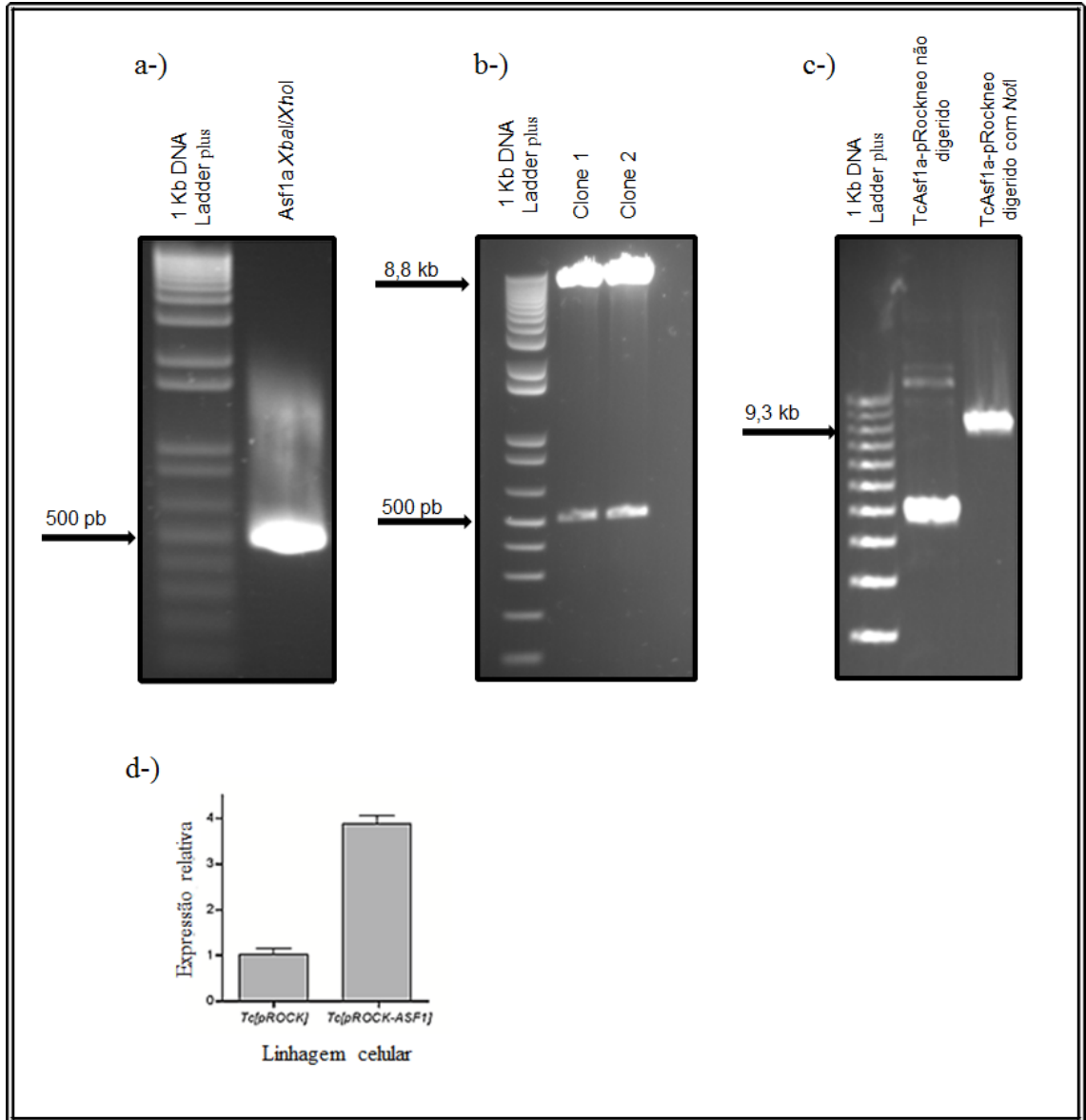


Figura 3.2: (a, b e c) Análise em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo, das etapas de clonagem do gene TcAsf1A no vetor de superexpressão em *T. cruzi*, pRock Neo. a-) Reação de PCR realizada a partir do DNA genômico de *T. cruzi* (clone CL Brener), para amplificar a ORF do gene Asf1A. 1Kb Ladder plus: padrão de peso molecular e Asf1aXbaI/XhoI: amplicon de 500 pb correspondente a ORF do gene TcAsf1, flanqueado a 5' e a 3', respectivamente, pelos sítios das enzimas de restrição XbaI e XhoI. b-) Digestão do plasmídeo pRockneo-TcAsf1A com as enzimas XbaI e XhoI. Clones 1 e 2: construções pRockneo-TcAsf1A originadas de dois clones de bactéria diferentes, após dupla digestão com as enzimas XbaI e XhoI. c-) Digestão do plasmídeo pRockneo-TcAsf1a com a enzima NotI. TcAsf1a-pRock não digerido: vetor não digerido contendo o gene TcAsf1A, TcAsf1A-pRock digerido com NotI: vetor após digestão com a enzima NotI. d-) PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de TcAsf1A, a partir do cDNA das cepas controle (Tc[pRock]) e superexpressora de TcAsf1A (Tc[pRock-ASF1]).

### **3.4.2 Crescimento de linhagem de *T. cruzi* superexpressora de Asf1A na presença de agentes genotóxicos**

Ao obtermos a cepa de *T. cruzi* superexpressora de Asf1A, realizamos curvas de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos, para avaliarmos o papel dessa proteína na DDR deste parasito. A superexpressão de Asf1A aumenta a resistência do *T. cruzi* a MMS. Enquanto o crescimento da cepa superexpressora de Asf1A permanece parado, ocorre morte gradual da cepa controle, transfectada com o vetor vazio. Entretanto, nenhuma dessas linhagens de *T. cruzi* retoma o crescimento nas doses e condições testadas (Figura 3.3).

Após avaliarmos a influência da superexpressão de Asf1A na resposta a danos por alquilação, partimos para a investigação sobre a participação dessa proteína no estresse oxidativo, sobretudo devido à importância fisiológica desse tipo de estresse, durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. Para tal, realizamos o crescimento de formas epimastigotas do parasito superexpressando a proteína Asf1A, na presença de peróxido de hidrogênio. Com isso, não observamos nenhuma diferença, em relação à cepa controle, na sobrevivência e/ou crescimento do superexpressor de Asf1A na presença de peróxido de hidrogênio. Esse mesmo perfil se reproduziu em ambas as doses testadas (Figura 3.4).

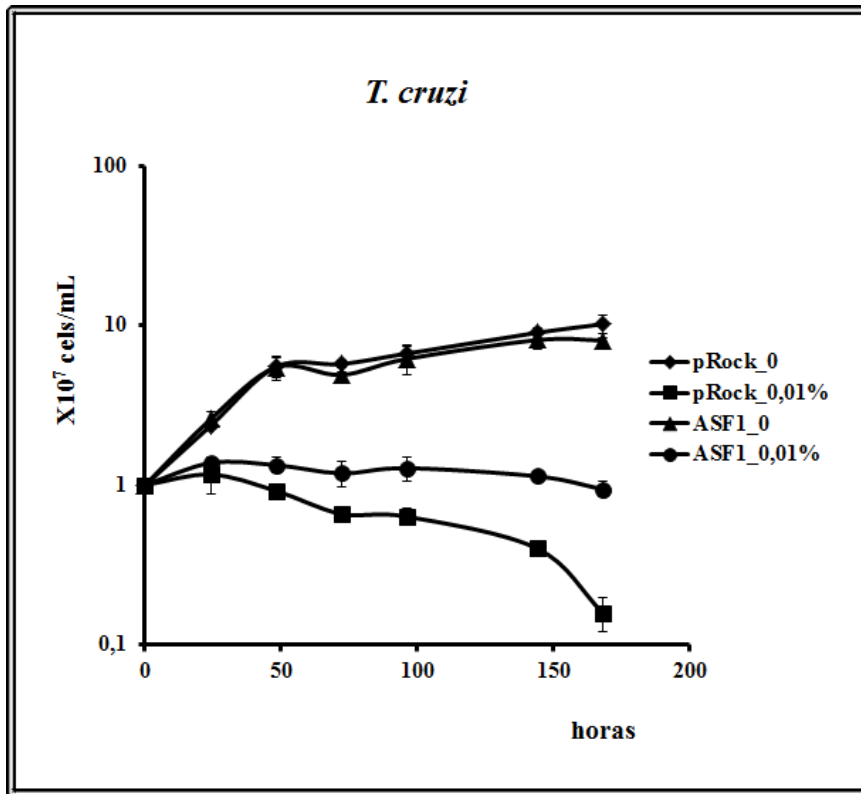


Figura 3.3: Curva de crescimento de formas epimastigotas do *T. cruzi* na presença de MMS. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas. As legendas pRock\_0, Asf1\_0, pRock\_0,01% e Asf1\_0,01%, representam, respectivamente, as linhagens controles e superexpressando Asf1, cujo crescimento foi realizado na ausência e na presença de 0,01% v/v (1,17 mM) de MMS. Estas curvas de crescimento são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.



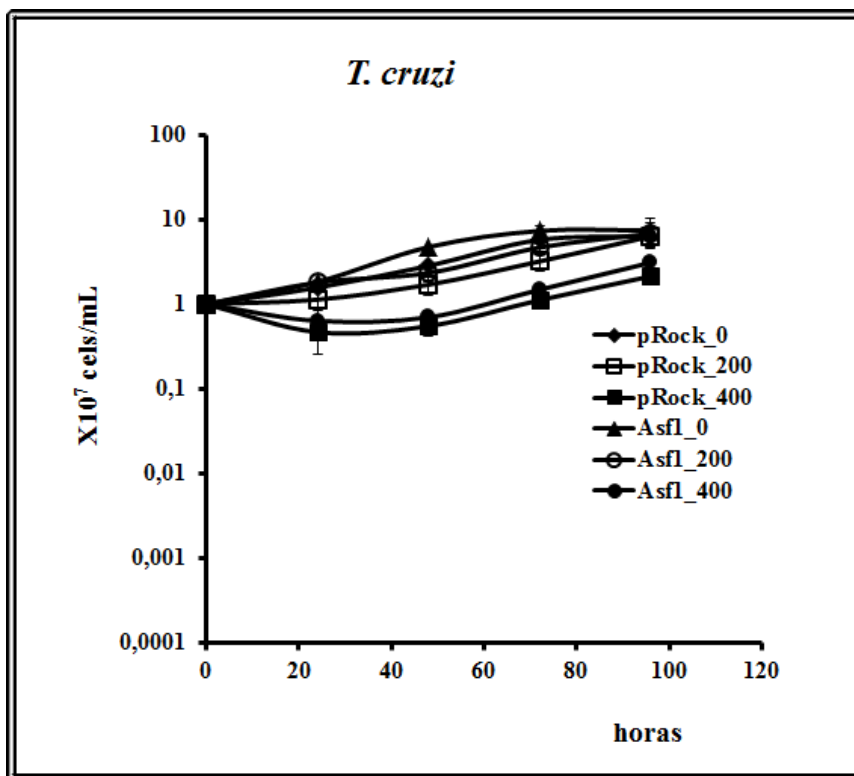


Figura 3.4: Curva de crescimento de formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* na presença de  $H_2O_2$ . Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas. As legendas pRock\_0, pRock\_200, pRock\_400, Asf1\_0, Asf1\_200 e Asf1\_400 representam, respectivamente, as linhagens controle e superexpressando Asf1A, cujo crescimento foi realizado na ausência e na presença de 200 e 400  $\mu M$  de peróxido de hidrogênio. Estas curvas de crescimento são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Após realizarmos ensaios de exposição a agentes genotóxicos, que causam lesões nas bases nitrogenadas, tratamos os parasitos com radiação gama, de modo a induzir quebras duplas no arcabouço açúcar-fosfato, que são direcionadas para a via de recombinação homóloga. A exposição a 500 Gy de radiação gama não causa morte na população do *T. cruzi*, como observado por Regis-da-Silva e cols. (2006). A retomada do crescimento, após exposição a essa dose, dá-se por volta de sete dias na cepa selvagem, enquanto que a recuperação do superexpressor de Asf1A ocorre por volta do 12º dia (288 horas), ou seja, a superexpressão de Asf1A retarda a retomada do crescimento do *T. cruzi*, após a exposição do parasito a 500 Gy de radiação gama (Figura 3.5).

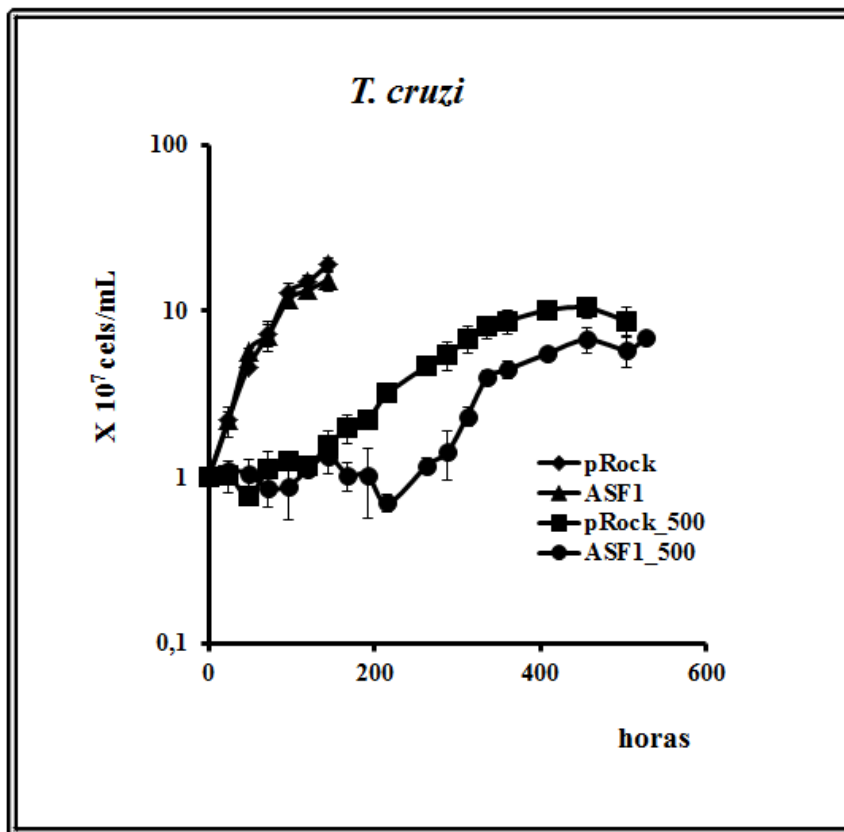


Figura 3.5: Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi*, após irradiação com 500 Gy de radiação gama. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos  $\times 10^7$  células/ml versus tempo em horas. As legendas pRock\_0, pRock\_500, Asf1\_0 e Asf1\_500 representam, respectivamente, as linhagens controle e superexpressando Asf1A, cujo crescimento foi realizado com e sem o tratamento de 500 Gy de radiação gama. Estas curvas de crescimento são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

## 3.5 Discussão

A proteína Asf1A exerceria um papel na resposta a danos no DNA, em *T. cruzi*, já que a sua superexpressão modifica a sobrevivência e a recuperação do crescimento deste parasito, quando o mesmo é exposto a agentes genotóxicos. Paralelamente, em colaboração com a doutoranda Juliana B. F. Garcia, orientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angela K. Cruz, realizamos experimentos para também determinarmos o papel da Asf1A na DDR em *Leishmania major*, comparando, dessa forma, a atuação desta proteína entre diferentes tripanossomatídeos. Ao realizarmos esta análise comparativa, obtivemos dois resultados principais. O primeiro foi que *T. cruzi* e *L. major* apresentam mecanismos diferentes para lidarem com o estresse genotóxico. Já no segundo resultado, observamos que a proteína Asf1A poderia assumir papéis diferentes, entre estes parasitos, na resposta a danos no DNA.

### 3.5.1 A resposta a danos no DNA, entre *T. cruzi* e *L. major*, é diferencialmente regulada

Ao avaliarmos o papel de Asf1A na resposta a danos no DNA, entre *T. cruzi* e *L. major*, observamos que estes organismos apresentam diferenças na maneira pela qual eles repondem ao estresse genotóxico. Ainda que não possamos excluir a possibilidade de que os diferentes meios de culturas utilizados no cultivo dos parasitos estejam contribuindo para a diferença na resposta aos compostos genotóxicos avaliados, discutiremos alguns pontos relevantes dos resultados obtidos.

No tratamento com MMS, observamos que *L. major* é capaz de retomar o crescimento, mesmo na presença de 1,17 mM deste composto (Garcia, dados não publicados, figura 3.6a). Entretanto, o mesmo não foi observado nas culturas de *T. cruzi*. O MMS gera lesões nas bases nitrogenadas, capazes de bloquearem a passagem da DNA polimerase. Essas lesões, ao

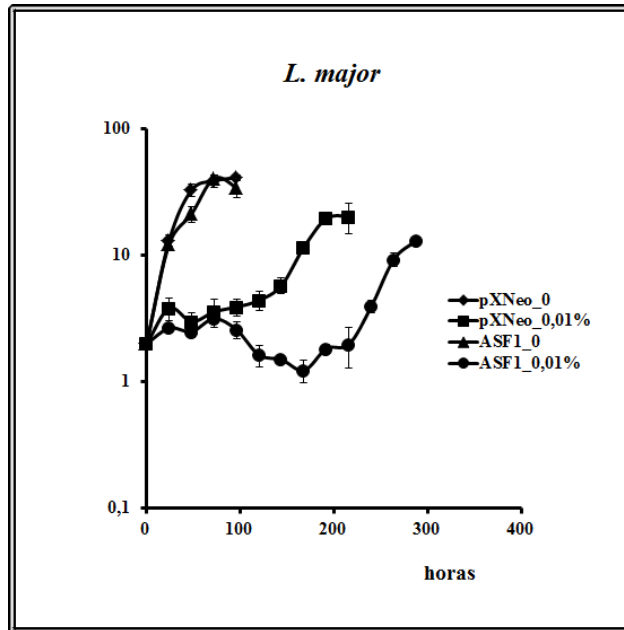
persistirem durante a replicação do DNA, levam ao colapso da forquilha de replicação, resultando na formação de quebras duplas e estresse replicativo. Com isso, propomos que *T. cruzi* tenha maior dificuldade em lidar com estresse replicativo do que *L. major*, uma vez que este último parasito é mais resistente a MMS do que o primeiro.

Já no tratamento com peróxido de hidrogênio, observamos que as culturas de *T. cruzi* são capazes de se recuperarem, mesmo após o tratamento com 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo que o mesmo não ocorre em *L. major* (Garcia, dados não publicados, figura 3.6b). A explicação para tal diferença não é óbvia, já que ambos os parasitos lidam com níveis elevados de estresse oxidativo, durante os seus respectivos ciclos de vida.

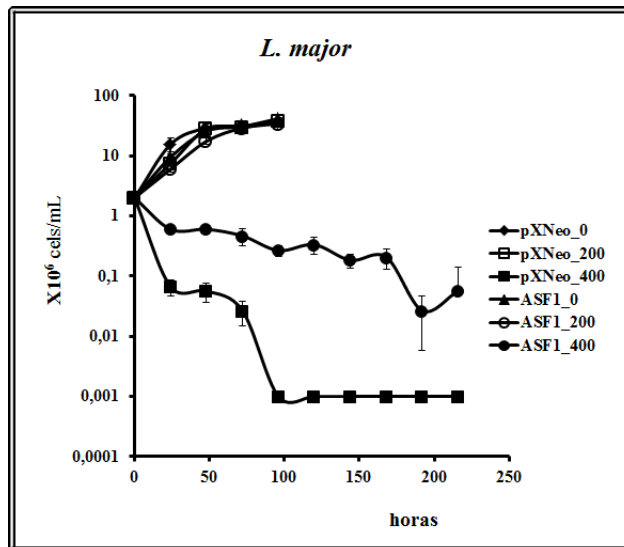
O *T. cruzi*, após 500 Gy de irradiação gama, apresenta parada do crescimento por aproximadamente sete dias, seguida de rápida recuperação. Esse parasito é capaz de sobreviver a altas doses de irradiação gama, apresentando taxas de mortalidade muito baixas. A sobrevivência do *T. cruzi* a taxas elevadas de irradiação gama é atribuída ao reparo eficiente das quebras duplas no DNA, por recombinação homóloga, que ocorre em até 48 horas, após a indução do dano (Regis-da-Silva et al., 2006). Já *L. major*, após exposição à mesma dose de radiação gama, apresenta parada de crescimento, seguida da morte de grande parte da população. Embora este parasito apresente baixa sobrevivência à irradiação gama, uma pequena porcentagem da população de células sobreviventes é capaz de se recuperar e retomar o crescimento (Garcia, dados não publicados, figura 3.6c). Tanto *L. major* (Garcia, dados não publicados, figura 3.7), quanto *T. cruzi* (dados não mostrados), apresentam atraso em S, após irradiação gama, independentemente da superexpressão de Asf1A. O atraso em S é um indício que, na presença de quebras duplas, o ciclo celular é parado até que o reparo destas lesões seja concluído. Entretanto, em *L. major*, o reparo de quebras duplas no DNA, induzidas por irradiação gama, é bastante ineficiente, de forma que essas lesões persistem até o momento em que ocorre grande mortalidade da população (Garcia, dados não publicados, figura 3.8). A alta taxa de mortalidade observada neste parasito poderia, com isso, estar em função da deficiência de *L. major* em reparar as quebras duplas no DNA, sugerindo que algum mecanismo de morte celular programada esteja envolvido nesta situação.

A comparação da resposta a danos no DNA, entre *T. cruzi* e *L. major*, sugere, dessa forma, que estes parasitos podem acionar respostas diferentes para o mesmo tipo de dano no DNA, embora ainda não esteja claro como tais respostas seriam estruturadas e nem como estes processos estariam em conformidade com a biologia de cada um destes tripanossomatídeos.

a-)



b-)



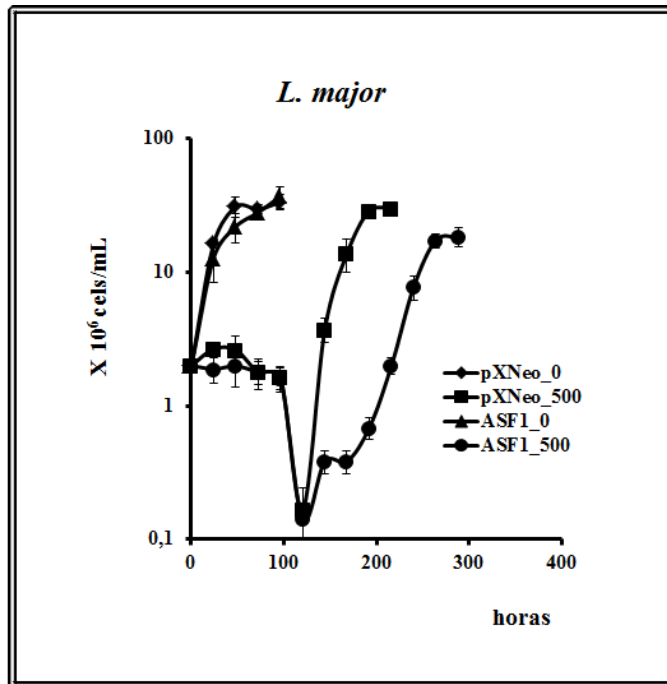


Figura 3.6: a-) Curva de crescimento da forma promastigota de *L. major* na presença de MMS. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos X 10<sup>6</sup> células/ml versus tempo em horas. As legendas pXNeo\_0, Asf1\_0, pXNeo\_0,01% e Asf1\_0,01% representam, respectivamente, as linhagens controles e superexpressando Asf1, cujo crescimento foi realizado na ausência e na presença de 0,01 % (v/v) de MMS. b-) Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. major* na presença de peróxido de hidrogênio. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos X 10<sup>6</sup> células/ml versus tempo em horas. As legendas pXNeo\_0, pXNeo\_200, pXNeo\_400, Asf1\_0, Asf1\_200 e Asf1\_400 representam, respectivamente, as linhagens controles e superexpressando Asf1A, cujo crescimento foi realizado na ausência e na presença de 200 e 400  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio. c-) Curva de crescimento da forma promastigota de *L. major*, após irradiação com 500 Gy de raios gama. Este gráfico foi plotado pelo número de parasitos X 10<sup>6</sup> células/ml versus tempo em horas. As legendas pXNeo\_0, pXNeo\_500, Asf1\_0 e Asf1\_500 representam, respectivamente, as linhagens controle e superexpressando Asf1A, cujo crescimento foi realizado com e sem o tratamento de 500 Gy de irradiação gama. Esta curva de crescimento é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. (Garcia, dados não publicados).



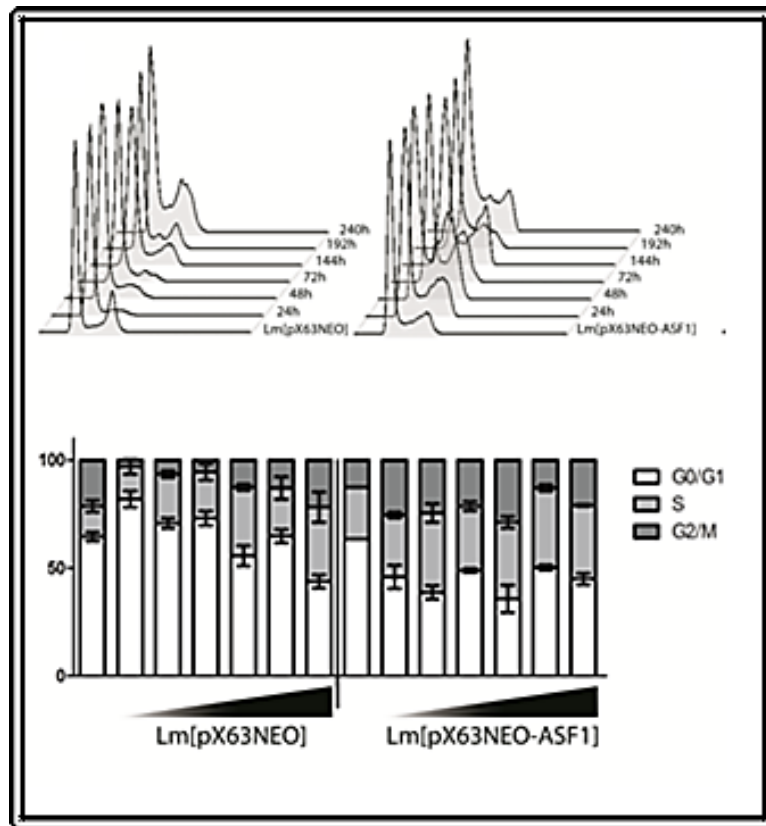


Figura 3.7: Citometria de fluxo das populações controle (Lm[pX63NEO]) e superexpressora de Asf1A (Lm[pX63NEO-ASF1]) de formas promastigotas de *L. major*, fixadas com etanol 70% e coradas com iodeto de propídeo, após tratamento com 500 Gy de irradiação gama. Os histogramas representados na região superior da figura são representativos de três replicas biológicas, onde a ordenada representa número de eventos e a abscissa representa fluorescência total. Os gráficos de barras, logo abaixo, representam as porcentagens relativas da população, de cada uma das fases do ciclo celular (G0/G1 em branco, S em cinza claro e G2/M em cinza escuro), na ausência de tratamento (C) e em 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h), 144 (144h), 192 (192h) e 240 (240h) horas pós-tratamento. As barras verticais representam o desvio padrão de três replicas biológicas. (Garcia, dados não publicados).

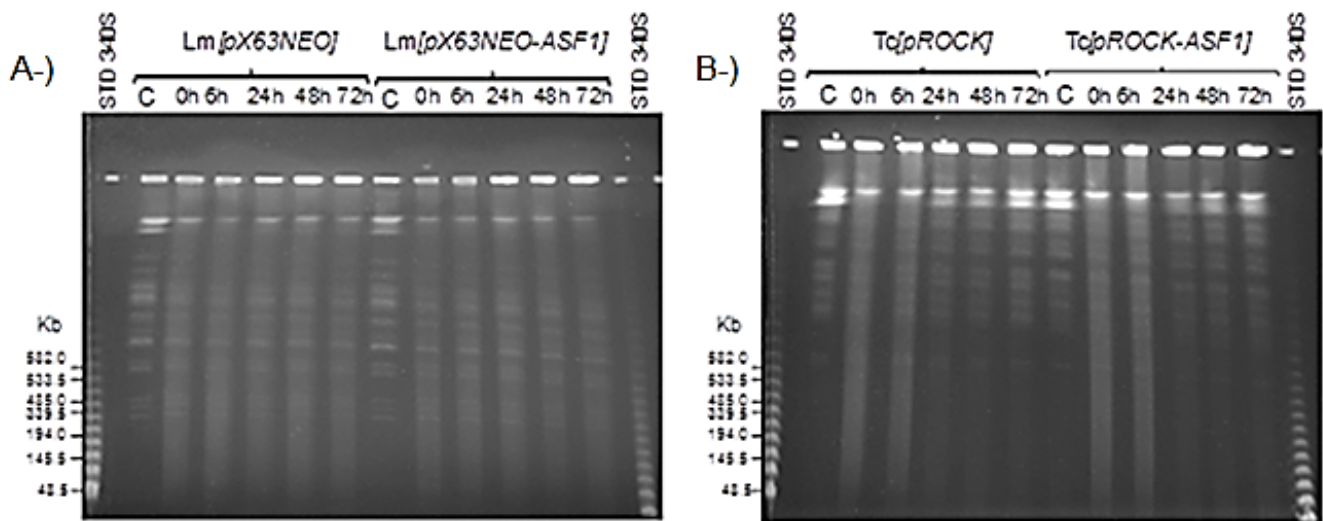


Figura 3.8: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), após o tratamento com 500 grays de irradiação gama. A-) Linhagem controle (Lm[pX63NEO]) e superexpressora (Lm[pX63NEO-ASF1]) de *Asf1A* em *L. major*. B-) Linhagem controle (Tc[pROCK]) e superexpressora (Tc[pROCK-ASF1]) de *Asf1A* em *T. cruzi*. Canaletas C, 0h, 6h, 24h, 48h e 72h representam, respectivamente, controle não tratado e 0, 6, 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Marcador de tamanho molecular: 340S da New England Biolabs. (Garcia, dados não publicados).

### **3.5.2 A proteína Asf1A poderia assumir papéis diferentes na resposta a danos no DNA em *T. cruzi* e *L. major***

Em relação à participação de Asf1A no reparo de DNA propriamente dito, não foi detectada, nas condições testadas, nenhuma diferença na integridade do DNA genômico das culturas superexpressoras de Asf1A, tanto em *T. cruzi*, quanto em *L. major*; quando comparadas às linhagens controle (Garcia, dados não publicados, figuras 3.8-3.10). Tais resultados indicariam, dessa forma, que as funções desta proteína não estão associadas, direta ou indiretamente, à remoção das lesões, ou proteção do DNA destes parasitos. Embora haja grande diferença entre a integridade do DNA da cepa de *L. major* superexpressora de Asf1A e da cepa controle, após o tratamento com 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , concluímos que tal degradação tenha ocorrido após a morte dos parasitos, uma vez que na dose de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , não há evidência de que a superexpressão de Asf1A atenua os efeitos deste agente ou estimule o reparo das lesões causadas pelo estresse oxidativo (Garcia, dados não publicados, figura 3.10).

Em *L. major*, a superexpressão de Asf1A promove grande resistência ao peróxido de hidrogênio e retarda a retomada de crescimento na presença de MMS e após irradiação gama (Garcia, dados não publicados, figura 3.6). Além disso, a cepa superexpressora de Asf1A, em *L. major*, também apresenta um atraso mais acentuado em G2/M, quando comparada à cepa controle, após exposição à irradiação gama (Garcia, dados não publicados, figura 3.7).

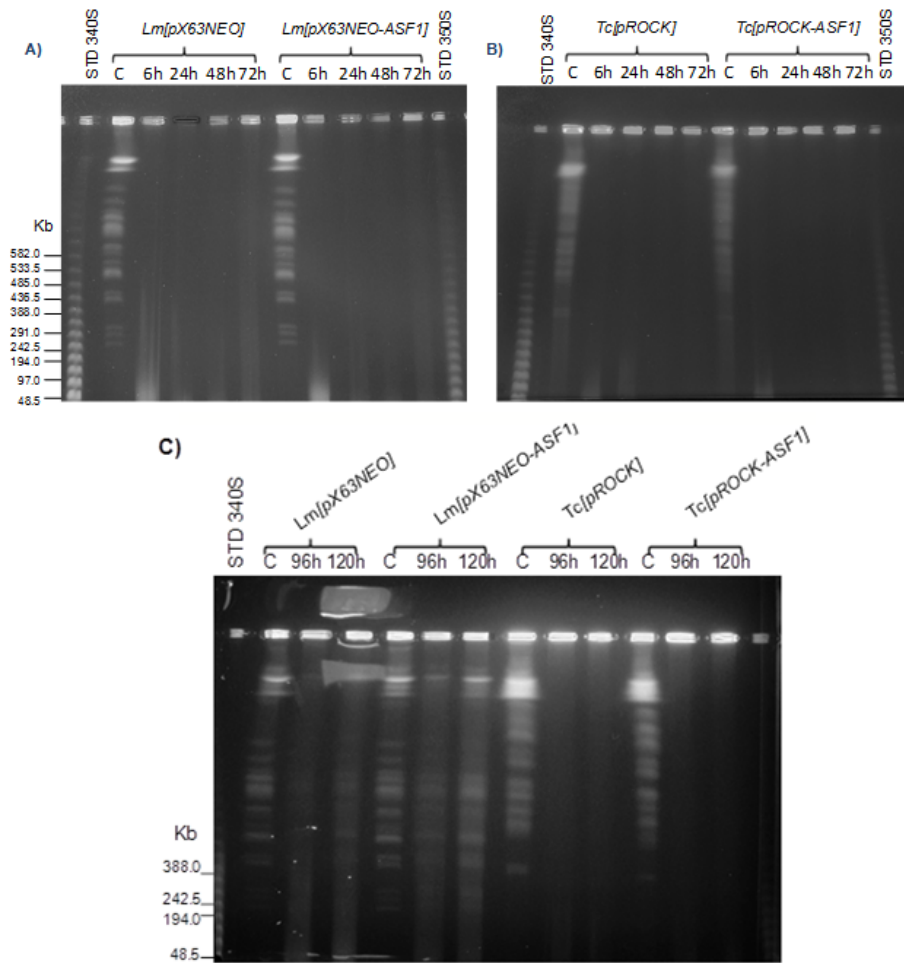


Figura 3.9: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), após o tratamento com 0,01% v/v de MMS. A-) e B-) Canaletas C, 6h, 24h, 48h e 72h representam, respectivamente, controle não tratado, 6, 24, 48 e 72 horas de exposição da cultura de parasitos ao agente genotóxico. C-) Canaletas C, 96h e 120h representam, respectivamente, controle não tratado, 96 e 120 horas de exposição ao MMS. (*Lm*[pX63NEO]) e (*Lm*[pX63NEO-ASF1]) representam, respectivamente, linhagens controle e superexpressora de *Asf1A* em *L. major*, enquanto que (*Tc*[pROCK]) e (*Tc*[pROCK-ASF1]) indicam, respectivamente, linhagens controle e superexpressora de *Asf1A* em *T. cruzi*. Marcador de tamanho molecular: 340S da New England Biolabs. (García, dados não publicados).

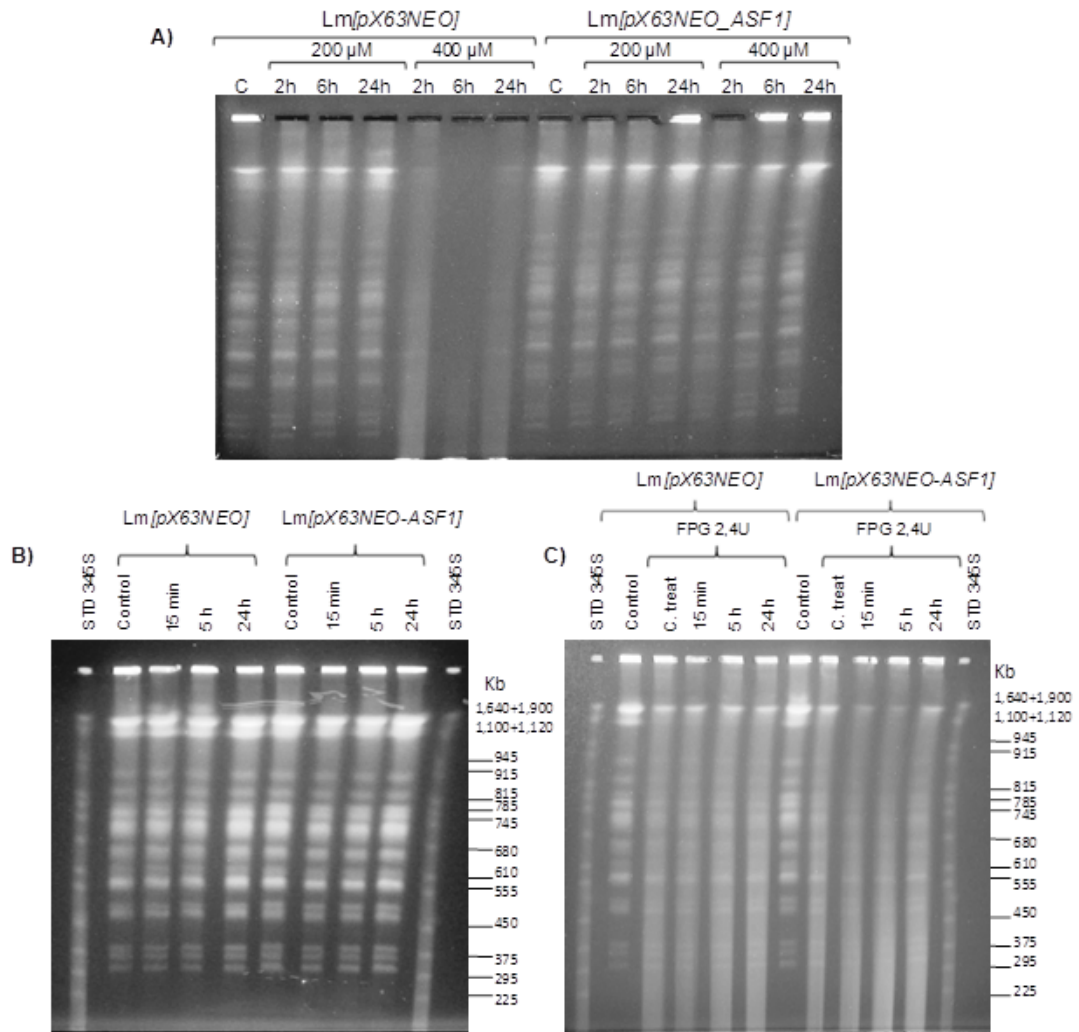


Figura 3.10: Avaliação da integridade cariotípica, por PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), após o tratamento com peróxido de hidrogênio. A-) Tratamento com 200 e 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Canaletas C, 2h, 6h, e 24h representam, respectivamente, controle não tratado, 2, 6 e 24 horas de exposição da cultura de parasitos ao agente genotóxico. B-) Tratamento com 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Canaletas Control, 15 min, 5h, e 24h representam, respectivamente, controle não tratado, 15 minutos, 6 e 24 horas de exposição da cultura de parasitos ao agente genotóxico. C-) O mesmo experimento apresentado em B-), porém os blocos contendo o DNA genômico dos parasitos foram tratados com 2,4 U da enzima FPG, durante 12 horas. (Lm[pX63NEO]) e (Lm[pX63NEO-ASF1]) representam, respectivamente, linhagens controle e superexpressora de Asf1A em *L. major*. Marcador de tamanho molecular: 340S da New England Biolabs. (Garcia, dados não publicados).

A alta resistência ao peróxido de hidrogênio apresentada pela cepa de *L. major* superexpressora de Asf1A poderia estar associada à maior quantidade de peroxidases encontrada nesta linhagem (Scher et al., 2012). Além disso, a superexpressão de HSP70, também vista na cepa superexpressora (Scher et al., 2012), poderia aumentar a tolerância a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao inibir a fragmentação do nucléolo induzida por este agente, um processo que induz apoptose em células de mamíferos (Wang et al., 2011). Linhagens tumorais que superexpressam Asf1, em humanos, possuem maiores níveis de acetilação na lisina 56 da histona H3 (Das et al., 2009). É possível que esse efeito também ocorra nas nossas linhagens superexpressoras de Asf1A, uma vez que, em *T. brucei*, a superexpressão de TbAsf1A aumenta a quantidade de histona H3 acetilada. (Pascoalino, Tese de Doutorado) (Figura 3.11a). Níveis constitutivamente altos dessa modificação na histona H3, que persistem além da fase S do ciclo celular, podem aumentar a frequência de quebras duplas no DNA, dependentes de replicação, além de afetar a segregação dos cromossomos nas fases G2/M (Ozdemir et al., 2006). Tal cenário estaria consistente com os nossos resultados em *L. major*, uma vez que a cepa superexpressora retoma o crescimento tardiamente, após os tratamentos com MMS e irradiação gama (Garcia, dados não publicados, figuras 3.6a e 3.6c, respectivamente), além de apresentar maior atraso em G2, neste último tratamento (Garcia, dados não publicados, figura 3.7). Além disso, a retomada tardia do crescimento, após irradiação gama, foi também observada em linhagens de *T. brucei* superexpressoras de Asf1A. Entretanto, essa linhagem superexpressora de *T. brucei* apresenta maior sensibilidade a MMS (Pascoalino, Tese de Doutorado) (Figura 3.11b).

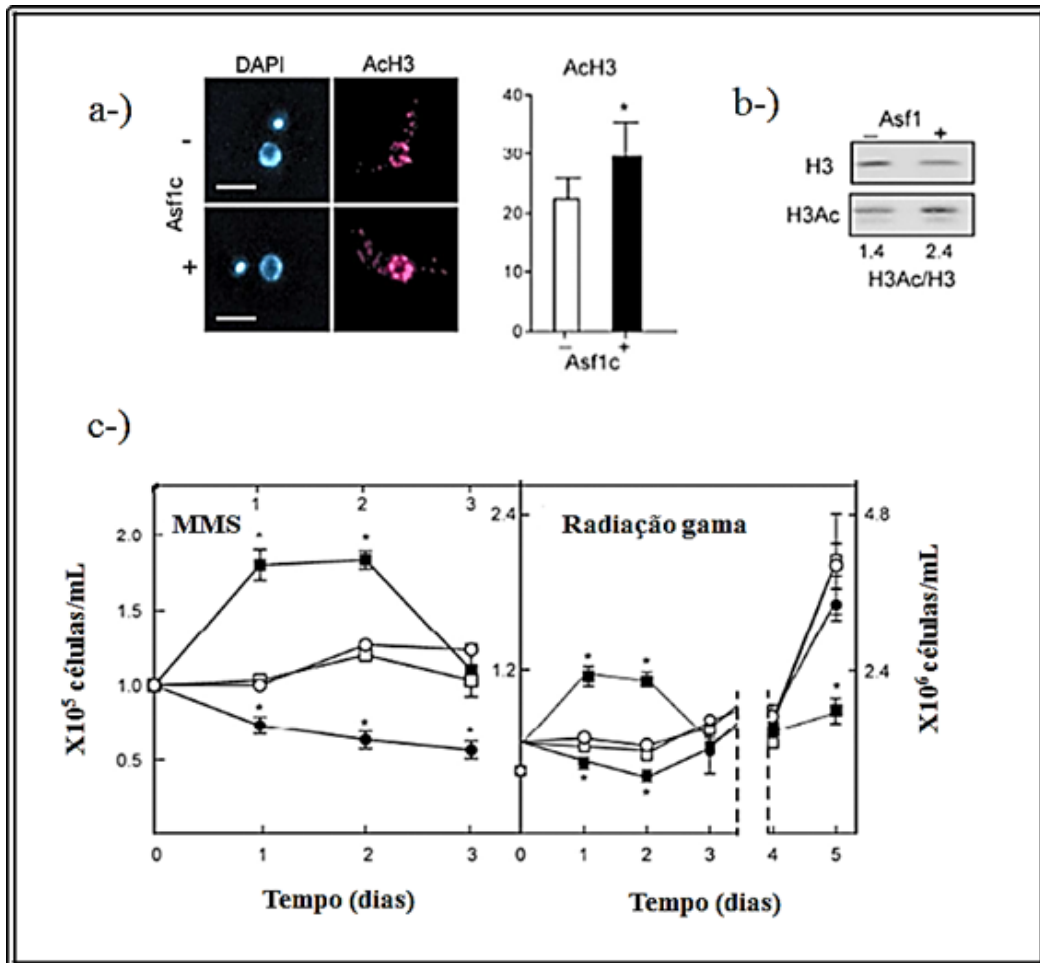


Figura 3.11: A superexpressão de Asf1 em *T. brucei*. a-) A linhagem de *T. brucei* superexpressora da Asf1A citosólica (Asf1A) apresenta níveis aumentados da histona H3 acetilada. Esquerda: parasitos controle (-) ou superexpressando Asf1A (+) foram marcados com anticorpos específicos para histona H3 acetilada (vermelho). O DNA está corado com DAPI (azul). As barras equivalem a 3  $\mu$ M. Direita: quantificação da intensidade de fluorescência (médias  $\pm$  desvio padrão para 35 células superexpressoras de Asf1). O asterisco indica diferença significativa pelo teste one-way ANOVA). b-) Os mesmos parasitos foram utilizados para análise, por *Western blot*, utilizando-se anticorpos específicos para histona H3 e histona H3 acetilada. A proporção entre as histonas acetiladas e o total de histonas é mostrada logo abaixo do painel. Proporções similares foram obtidas em dois experimentos adicionais. c-) Parasitos transfectados com plasmídeos, codificando para um sistema induzível por tetraciclina, de modo a superexpressar a Asf1 citoplasmática (círculos) ou nuclear (quadrados), foram incubados com (símbolos pretos) ou sem tetraciclina (símbolos vazios), durante 24 horas. As células foram incubadas com 0,001% de MMS (esquerda) ou irradiadas com 40 Gy de radiação gama (direita), mantidas na presença ou ausência de tetraciclina e contadas diariamente. Os números são médias das concentrações de células  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças significativas, calculadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Dados obtidos por Pascoalino (Tese de Doutorado).

A acetilação da lisina 56 da histona H3 está relacionada, em levedura, com a desativação do *checkpoint* dependente de dano (Chen et al., 2008). A hiperacetilação da histona H3 neste resíduo poderia induzir à inativação precoce do *checkpoint* dependente de dano, retardando a recuperação do parasito, ao fazer com que as células prossigam pelo ciclo celular, antes que o reparo seja concluído.

Já em *T. cruzi*, a superexpressão de Asf1A não interfere na resposta à água oxigenada, mas retarda a retomada de crescimento, após irradiação gama, e aumenta a tolerância a MMS. Estes resultados sugerem que, embora Asf1A também esteja envolvida na resposta a danos no DNA, em *T. cruzi*, a forma com que esta proteína é empregada, neste processo, varia entre este parasito e a *L. major*. O atraso na retomada do crescimento, visto na cepa superexpressora de *T. cruzi*, após irradiação gama, poderia ser atribuído a uma condição similar àquela sugerida para *L. major*. Entretanto, a maior tolerância a MMS poderia ser atribuída a outros processos, também resultantes do possível acúmulo da histona H3, acetilada na lisina 56. Tal modificação poderia estimular a via de síntese translesão (Guenole et al., 2013), aumentando a sobrevivência e/ou tolerância ao MMS. No entanto, os parasitos cultivados na presença de MMS não retomam o crescimento e tornam-se inviáveis, refutando a hipótese de ativação de síntese translesão. Alternativamente, o aumento da acetilação da lisina 56 da histona H3 poderia promover a desmontagem dos nucleossomos, facilitando a transcrição (Williams et al., 2008). Dessa forma, especulamos que o excesso dessa modificação nas histonas facilite a transcrição de moldes de DNA, contendo uma grande quantidade de lesões, capazes de bloquearem a passagem da RNA polimerase. A facilitação da transcrição, em moldes lesionados, pela superexpressão de Asf1A, atenuaria a toxicidade do MMS, retardando a morte dos parasitos.

Em conjunto, estes resultados indicam que a proteína Asf1A participaria da resposta a danos no DNA em *T. cruzi* e *L. major*, embora a função exercida pela mesma, durante este processo, varie entre os tripanossomatídeos.



### 3.6 Perspectivas

Concluir as análises de marcação de ciclo celular, em *T. cruzi* e *L. major*, após tratamento com agente genotóxicos.

Realizar curvas de sobrevivência com camptotecina e hidroxiuréia, para avaliarmos se as linhagens superexpressoras de Asf1A são mais susceptíveis ao estresse replicativo.

Verificar se há sinais de morte celular programada nas culturas superexpressoras de Asf1A e nos respectivos controles, em *T. cruzi* e *L. major*, após o tratamento com agentes genotóxicos.

Avaliar se, com a superexpressão de Asf1A em *T. cruzi* e *L. major*, os níveis de acetilação da lisina 56 na histona H3 estão aumentados.

Avaliar os efeitos da superexpressão de Asf1B em *T. cruzi* e *L. major* na presença de estresse genotóxico.

Avaliar os efeitos do nocaute de Asf1A em *T. cruzi* e *L. major*.

Identificar, por imunoprecipitação seguida de espectrometria de massa, quais as proteínas que interagem com a Asf1A em *T. cruzi* e *L. major*.

Avaliar a relação das proteínas Asf1A/B na resposta a danos no DNA em *T. brucei*.

## Considerações finais

No primeiro capítulo, vimos diferenças notáveis entre as eficiências de reparo de duas formas do ciclo de vida do *T. brucei*. Além disso, observamos que estas formas acionam vias diferentes, após a detecção de dano em seu material genético. Enquanto que na forma sanguícola constatamos invariavelmente grande mortalidade da população de parasitos, apesar da mesma apresentar uma tendência à maior eficiência de reparo, a forma procíclica apresenta maior tolerância ao estresse genotóxico, ainda que incapaz de reparar eficientemente o DNA. Atribuímos estas diferenças às adaptações bioquímicas e celulares que cada uma destas formas evolutivas do parasito possui, para sobreviverem e se manterem em seus respectivos hospedeiros. A alteração dos padrões de resposta a danos no DNA, dependente de diferenciação celular, é um fenômeno relativamente pouco compreendido mesmo em metazoários, sendo que este estudo abre precentes para novas investigações acerca deste assunto.

Na segunda parte do trabalho, vimos importantes modificações no NER (reparo por excisão de nucleotídeos) de *T. brucei*, quando comparado ao NER de outros organismos. Neste parasito, genes classicamente associados ao GG-NER (reparo global do genoma), tais como TbXPC e TbDDB, não estão envolvidos com o reparo de lesões causados por cisplatina e UV. Diferentemente do que ocorre em outros organismos, esta subvia do NER se especializou no reparo de *crosslinks*, essencial para este parasito, de modo que as modificações na estrutura tridimensional da XPC estariam condizentes com este cenário. Apenas alguns dos genes relacionados ao TC-NER (reparo associado à transcrição) estão de fato envolvidos no reparo de lesões que causam grande distorção na estrutura do DNA. Este TC-NER, promovido pelas proteínas TbCSB, TbXPBz e TbXPG, seria direcionado para as lesões que bloqueiam a passagem da RNA polimerase. Por outro lado, as lesões no DNA que não impedem a transcrição, seriam superadas pelo processo de transcrição translesão, no qual TbCSB é uma proteína chave. Com isso, associamos a transcrição constitutiva dos genes contidos nas unidades policistrônicas à predominância do TC-NER sobre o GG-NER, com a divergência deste último para o reparo de *crosslinks*.

No terceiro capítulo deste trabalho, vimos que a proteína Asf1A está relacionada com a resposta a danos no DNA em *T. cruzi* e *L. major*, possivelmente atuando no remodelamento da cromatina, após recuperação do dano. Entretanto, os contextos em que esta proteína atua em cada um destes parasitos são variáveis, uma vez que a superexpressão desta proteína causa efeitos diferentes nestes organismos, quando submetidos a estresse genotóxico. Além disso, em concordância com a noção de que a Asf1A participa de maneira diferente entre *T. cruzi* e *L. major*, observamos que estes parasitos apresentam estratégias muito diferentes de lidarem com o dano no DNA.

As diferenças das vias de reparo e resposta a danos no DNA entre tripanossomatídeos e outros organismos, entre tripanossomatídeos diferentes e entre diferentes tipos celulares do mesmo tripanossomatídeo provavelmente são um reflexo das adaptações ocorridas nestes organismos, favorecendo a sobrevivência dos mesmos em nichos ecológicos muito peculiares. O alto grau de adaptação dos tripanossomatídeos aos seus respectivos hospedeiros explicaria o porquê destes organismos serem muito divergentes dos principais eucariotos modelo, além de questionar a noção de que tais diferenças estejam atribuídas a um caráter primitivo ou ancestral destes parasitos (Dacks et al., 2008). Esta nova concepção em relação aos tripanossomatídeos, desenvolvida a partir do grande volume de dados genômicos gerados nos últimos anos, retira este grupo das posições ancestrais da árvore filogenética dos eucariotos, colocando-os em posições mais derivadas (Embley & Martin, 2006). Esta nova visão, em relação à origem e à evolução dos tripanossomatídeos, modifica profundamente a percepção sobre os trabalhos de caracterização dos processos bioquímicos e celulares nestes organismos. Por exemplo, as aparentes perdas, vistas na maquinaria de reparo dos tripanossomatídeos (como a ausência de NHEJ), ao invés de ser interpretadas como um caráter ancestral das vias de reparo, teriam de ser interpretadas e explicadas, através de eventos de perdas secundárias, exclusivas deste grupo. Além disso, ainda devemos considerar a possibilidade de que tais perdas poderiam ser um reflexo de intensas modificações dos componentes de uma determinada via de reparo, durante o processo de adaptação dos tripanossomatídeos ao modo de vida parasitário. Tais modificações, dessa forma, impossibilitariam a identificação destes componentes, através das ferramentas de bioinformática disponíveis (Dacks et al., 2008). Se por um lado, entendemos que as diferenças nas vias metabólicas entre tripanossomatídeos são devido a adaptações à vida

em seus respectivos hospedeiros, também devemos considerar, por outro lado, que parasitos de outros grupos, mas com nichos ecológicos relacionados, possam apresentar similaridades por convergência adaptativa. Por exemplo, *Plasmodium*, o agente causador da malária em humanos, mas que pertence a outro táxon distantemente relacionado aos tripanossomatídeos, possui um mecanismo de variabilidade antigênica análogo à expressão de VSGs de *T. brucei*, através da expressão de proteínas var de superfície (Dacks et al., 2008).

Contudo, o estudo das vias de reparo e resposta a danos no DNA em tripanossomatídeos nos permite um maior entendimento sobre a evolução dos mecanismos de manutenção da estabilidade genômica, entre os eucariotos, uma vez que este grupo constitui um táxon muito divergente dos organismos modelo estudados nesta área da biologia celular e molecular. Além disso, a alta divergência das vias de reparo nestes parasitos, em relação às vias de seus hospedeiros, poderia ser explorada para o futuro desenvolvimento de drogas contra estes patógenos causadores de doenças em humanos e animais.

## Referências Bibliográficas

- Ahmad, S. & A. Sarai, (2005) PSSM-based prediction of DNA binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics* 6: 33.
- Alsford, S. & D. Horn, (2008) Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 161: 76-79.
- Alsford, S. & D. Horn, (2012) Cell-cycle-regulated control of VSG expression site silencing by histones and histone chaperones ASF1A and CAF-1b in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 40: 10150-10160.
- Alsford, S., D. Horn & L. Glover, (2009) DNA breaks as triggers for antigenic variation in African trypanosomes. *Genome Biol* 10: 223.
- Araki, M., C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugawara, J. Kondoh, Y. Ohkuma & F. Hanaoka, (2001) Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276: 18665-18672.
- Araujo, S. J., F. Tirode, F. Coin, H. Pospiech, J. E. Syvaaja, M. Stucki, U. Hubscher, J. M. Egly & R. D. Wood, (2000) Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* 14: 349-359.
- Aslett, M., C. Aurrecochea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, M. J. Gardner, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, C. Hertz-Fowler, R. Houston, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, F. J. Logan, J. A. Miller, S. Mitra, P. J. Myler, V. Nayak, C. Pennington, I. Phan, D. F. Pinney, G. Ramasamy, M. B. Rogers, D. S. Roos, C. Ross, D. Sivam, D. F. Smith, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, Jr., S. Subramanian, R. Thibodeau, A. Tivey, C. Treatman, G. Velarde & H. Wang, (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic Acids Res* 38: D457-462.
- Ayala-Torres, S., Y. Chen, T. Svoboda, J. Rosenblatt & B. Van Houten, (2000) Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* 22: 135-147.
- Badjatia, N., T. N. Nguyen, J. H. Lee & A. Gunzl, (2013) *Trypanosoma brucei* harbors a divergent XPB helicase paralog that is specialized in nucleotide excision repair and conserved among kinetoplastid organisms. *Mol Microbiol*.
- Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renauld, D. C. Bartholomeu, N. J. Lennard, E. Caler, N. E. Hamlin, B. Haas, U. Bohme, L. Hannick, M. A. Aslett, J. Shallom, L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U. C. Alsmark, C. Arrowsmith, R. J. Atkin, A. J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T. J. Chillingworth, C. Churcher, L. N. Clark, C. H. Corton, A. Cronin, R. M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M. C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, D. Harper, B. R. Harris, H. Hauser, J. Hostetler, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A. X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. Macleod, P. J. Mooney, S. Moule, D. M. Martin, G. W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C. S. Peacock, J. Peterson, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, C. Reitter, S. L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A. J. Simpson, L. Tallon, C. M. Turner, A. Tait, A. R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B.

- White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M. D. Adams, T. M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J. D. Barry, A. H. Fairlamb, F. Opperdoes, B. G. Barrell, J. E. Donelson, N. Hall, C. M. Fraser, et al., (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.
- Beukers, R., A. P. Eker & P. H. Lohman, (2008) 50 years thymine dimer. *DNA Repair (Amst)* 7: 530-543.
- Bogliolo, A. R., L. Lauria-Pires & W. C. Gibson, (1996) Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop* 61: 31-40.
- Borst, P. & R. Sabatini, (2008) Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annu Rev Microbiol* 62: 235-251.
- Borst, P. & F. van Leeuwen, (1997) beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil, a novel base in African trypanosomes and other Kinetoplastida. *Mol Biochem Parasitol* 90: 1-8.
- Bregeon, D. & P. W. Doetsch, (2011) Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat Rev Cancer* 11: 218-227.
- Brueckner, F., U. Hennecke, T. Carell & P. Cramer, (2007) CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II. *Science* 315: 859-862.
- Bruhn, D. F., M. P. Sammartino & M. M. Klingbeil, (2011) Three mitochondrial DNA polymerases are essential for kinetoplast DNA replication and survival of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 10: 734-743.
- Brun, R. & Schonenberger, (1979) Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop* 36: 289-292.
- Burton, P., D. J. McBride, J. M. Wilkes, J. D. Barry & R. McCulloch, (2007) Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot Cell* 6: 1773-1781.
- Cabrera, G., C. Barria, C. Fernandez, S. Sepulveda, L. Valenzuela, U. Kemmerling & N. Galanti, (2011) DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* 112: 2189-2199.
- Calderwood, S. K., M. A. Khaleque, D. B. Sawyer & D. R. Ciocca, (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31: 164-172.
- Cameroni, E., K. Stettler & B. Suter, (2010) On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. *Cell Div* 5: 24.
- Carolaing Gabaldon, M., L. Labrador, G. Arraiz, J. L. Concepcion & L. Avilan, (2009) *Trypanosoma cruzi*: A kinetoplast-associated protein of the photolyase/cryptochrome family. *Exp Parasitol* 124: 350-356.
- Carrasco, H. J., I. A. Frame, S. A. Valente & M. A. Miles, (1996) Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 54: 418-424.
- Castillo-Acosta, V. M., F. Aguilar-Pereyra, A. E. Vidal, M. Navarro, L. M. Ruiz-Perez & D. Gonzalez-Pacanowska, (2012) Trypanosomes lacking uracil-DNA glycosylase are hypersensitive to antifolates and present a mutator phenotype. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1555-1568.
- Castro, H. & A. M. Tomas, (2008) Peroxidases of *trypanosomatids*. *Antioxid Redox Signal* 10: 1593-1606.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor & S. J. Boulton, (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47: 497-510.
- Charret, K. S., C. E. Requena, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanowska & A. E. Vidal, (2011) *Trypanosoma brucei* AP endonuclease 1 has a major role

in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. *DNA Repair (Amst)* 11: 53-64.

Chen, C. C., J. J. Carson, J. Feser, B. Tamburini, S. Zabaronick, J. Linger & J. K. Tyler, (2008) Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* 134: 231-243.

Chu, G. & E. Chang, (1988) Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242: 564-567.

Clingen, P. H., C. F. Arlett, J. A. Hartley & C. N. Parris, (2007) Chemosensitivity of primary human fibroblasts with defective unhooking of DNA interstrand cross-links. *Exp Cell Res* 313: 753-760.

Coin, F., V. Oksenyshch & J. M. Egly, (2007) Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell* 26: 245-256.

Coin, F., V. Oksenyshch, V. Mocquet, S. Groh, C. Blattner & J. M. Egly, (2008) Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell* 31: 9-20.

Comini, M. A., R. L. Krauth-Siegel & L. Flohe, (2007) Depletion of the thioredoxin homologue trypanothione impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem J* 402: 43-49.

Compe, E. & J. M. Egly, (2012) TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 343-354.

Conway, C., R. McCulloch, M. L. Ginger, N. P. Robinson, A. Browitt & J. D. Barry, (2002) Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. *J Biol Chem* 277: 21269-21277.

Coquelet, H., P. Tebabi, A. Pays, M. Steinert & E. Pays, (1989) *Trypanosoma brucei*: enrichment by UV of intergenic transcripts from the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol Cell Biol* 9: 4022-4025.

D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva & G. G. Poirier, (1999) Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 ( Pt 2): 249-268.

Dacks, J. B., G. Walker & M. C. Field, (2008) Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int* 57: 97-104.

Damsma, G. E., A. Alt, F. Brueckner, T. Carell & P. Cramer, (2007) Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1127-1133.

Daniels, J. P., K. Gull & B. Wickstead, (2010) Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 552-569.

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

Das, C., M. S. Lucia, K. C. Hansen & J. K. Tyler, (2009) CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459: 113-117.

Davis, A. J. & D. J. Chen, (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2: 130-143.

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

Deans, A. J. & S. C. West, (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 467-480.



Delespaux, V. & H. P. de Koning, (2007) Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat* 10: 30-50.

Demple, B., T. Herman & D. S. Chen, (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11450-11454.

Dianov, G. L. & J. L. Parsons, (2007) Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 6: 454-460.

Dizdaroglu, M. & P. Jaruga, (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 46: 382-419.

Dollery, C. T., (1999) Drug discovery and development in the molecular era. *Br J Clin Pharmacol* 47: 5-6.

Dominguez, C., R. Boelens & A. M. Bonvin, (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* 125: 1731-1737.

Dunand-Sauthier, I., M. Hohl, F. Thorel, P. Jaquier-Gubler, S. G. Clarkson & O. D. Scharer, (2005) The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity. *J Biol Chem* 280: 7030-7037.

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

Embley, T. M. & W. Martin, (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623-630.

Emmert, S., T. Ueda, U. Zumsteg, P. Weber, S. G. Khan, K. S. Oh, J. Boyle, P. Laspe, K. Zachmann, L. Boeckmann, C. Kuschal, A. Bircher & K. H. Kraemer, (2009) Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol* 18: 64-68.

England, T. G., A. Jenner, O. I. Aruoma & B. Halliwell, (1998) Determination of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. Effect of derivatization conditions on artifactual formation of certain base oxidation products. *Free Radic Res* 29: 321-330.

Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper & A. Sali, (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 2: Unit 2 9.

Ezaz-Nikpay, K. & G. L. Verdine, (1994) The effects of N7-methylguanine on duplex DNA structure. *Chem Biol* 1: 235-240.

Fagbemi, A. F., B. Orelli & O. D. Scharer, (2011) Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 10: 722-729.

- Feldberg, R. S. & L. Grossman, (1976) A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. *Biochemistry* 15: 2402-2408.
- Feng, Z., S. P. Scott, W. Bussen, G. G. Sharma, G. Guo, T. K. Pandita & S. N. Powell, (2010) Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 686-691.
- Fritz, G. & B. Kaina, (2006) Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB. *Mol Biol Cell* 17: 851-861.
- Fronza, G. & B. Gold, (2004) The biological effects of N3-methyladenine. *J Cell Biochem* 91: 250-257.
- Frosina, G., P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L. S. Cox, D. P. Lane, A. Abbondandolo & E. Dogliotti, (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271: 9573-9578.
- Fry, R. C., T. J. Begley & L. D. Samson, (2005) Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annu Rev Microbiol* 59: 357-377.
- Fu, D., J. A. Calvo & L. D. Samson, (2012) Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* 12: 104-120.
- Furtado, C., M. Kunrath-Lima, M. A. Rajao, I. C. Mendes, M. B. de Moura, P. C. Campos, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. D. Pena, S. M. Teixeira, B. Van Houten & C. R. Machado, (2012) Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 7: e42484.
- Gadelha, F. R., C. C. Goncalves, E. C. Mattos, M. J. Alves, M. D. Pineyro, C. Robello & E. F. Peloso, (2012) Release of the cytosolic trypanedoxin 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.
- Gallego, C., A. M. Estevez, E. Farez, L. M. Ruiz-Perez & D. Gonzalez-Pacanowska, (2005) Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 141: 191-197.
- Gaunt, M. W., M. Yeo, I. A. Frame, J. R. Stothard, H. J. Carrasco, M. C. Taylor, S. S. Mena, P. Veazey, G. A. Miles, N. Acosta, A. R. de Arias & M. A. Miles, (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936-939.
- Genois, M. M., A. Mukherjee, J. M. Ubeda, R. Buisson, E. Paquet, G. Roy, M. Plourde, Y. Coulombe, M. Ouellette & J. Y. Masson, (2012) Interactions between BRCA2 and RAD51 for promoting homologous recombination in *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res* 40: 6570-6584.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P.

Philippsen, R. W. Davis & M. Johnston, (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.

Gibson, W., L. Peacock, V. Ferris, K. Williams & M. Bailey, (2008) The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 1: 4.

Glover, L. & D. Horn, (2012) *Trypanosomal* histone gammaH2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasitol* 183: 78-83.

Glover, L., J. Jun & D. Horn, (2010) Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 39: 1372-1380.

Glover, L., R. McCulloch & D. Horn, (2008) Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 36: 2608-2618.

Gonzalez-Prieto, R., A. M. Munoz-Cabello, M. J. Cabello-Lobato & F. Prado, (2013) Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J* 32: 1307-1321.

Gospodinov, A. & Z. Herceg, (2012) Shaping chromatin for repair. *Mutat Res* 752: 45-60.

Groth, A., D. Ray-Gallet, J. P. Quivy, J. Lukas, J. Bartek & G. Almouzni, (2005) Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Mol Cell* 17: 301-311.

Grynberg, P., D. G. Passos-Silva, M. Mourao Mde, R. Hirata, Jr., A. M. Macedo, C. R. Machado, D. C. Bartholomeu & G. R. Franco, (2012) *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. *PLoS One* 7: e29596.

Guenole, A., R. Srivas, K. Vreeken, Z. Z. Wang, S. Wang, N. J. Krogan, T. Ideker & H. van Attikum, (2013) Dissection of DNA damage responses using multiconditional genetic interaction maps. *Mol Cell* 49: 346-358.

Hammarton, T. C., (2007) Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 1-8.

Hanawalt, P. C. & G. Spivak, (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 958-970.

Hannaert, V., F. Bringaud, F. R. Opperdoes & P. A. Michels, (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2: 11.

Hartley, C. L. & R. McCulloch, (2008) *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in antigenic variation and has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous recombination. *Mol Microbiol* 68: 1237-1251.

Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson & R. A. Sharma, (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 193-204.

Hildrestrand, G. A., D. B. Diep, D. Kunke, N. Bolstad, M. Bjoras, S. Krauss & L. Luna, (2007) The capacity to remove 8-oxoG is enhanced in newborn neural stem/progenitor cells and decreases in juvenile mice and upon cell differentiation. *DNA Repair (Amst)* 6: 723-732.

Hirumi, H. & K. Hirumi, (1989) Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* 75: 985-989.

Hoeijmakers, J. H., (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.

Hu, F., A. A. Alcasabas & S. J. Elledge, (2001) Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev* 15: 1061-1066.

- Huber, A., P. Bai, J. M. de Murcia & G. de Murcia, (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* 3: 1103-1108.
- Huertas, P., (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17: 11-16.
- Hunter, S. E., M. A. Gustafson, K. M. Margillo, S. A. Lee, I. T. Ryde & J. N. Meyer, (2012) In vivo repair of alkylating and oxidative DNA damage in the mitochondrial and nuclear genomes of wild-type and glycosylase-deficient *Caenorhabditis elegans*. *DNA Repair (Amst)* 11: 857-863.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al., (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.
- Iyer, N., M. S. Reagan, K. J. Wu, B. Canagarajah & E. C. Friedberg, (1996) Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry* 35: 2157-2167.
- Jankovic, M., A. Nussenzweig & M. C. Nussenzweig, (2007) Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nat Immunol* 8: 801-808.
- Janzen, C. J., J. P. Fernandez, H. Deng, R. Diaz, S. B. Hake & G. A. Cross, (2006) Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 580: 2306-2310.
- Jenkins, G. J., S. H. Doak, G. E. Johnson, E. Quick, E. M. Waters & J. M. Parry, (2005) Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* 20: 389-398.
- Johnson, P. J., J. M. Kooter & P. Borst, (1987) Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 51: 273-281.
- Jomova, K. & M. Valko, (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65-87.
- Kaczanowski, S., M. Sajid & S. E. Reece, (2011) Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors* 4: 44.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen & J. Ahringer, (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231-237.

Kanamitsu, K. & S. Ikeda, (2011) Fission yeast homologs of human XPC and CSB, rhp41 and rhp26, are involved in transcription-coupled repair of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. *Genes Genet Syst* 86: 83-91.

Kelly, J. M., J. M. Law, C. J. Chapman, G. J. Van Eys & D. A. Evans, (1991) Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 46: 253-263.

Kim, H. S. & G. A. Cross, (2010) TOPO3 $\alpha$  influences antigenic variation by monitoring expression-site-associated VSG switching in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 6: e1000992.

Kim, K., S. Biade & Y. Matsumoto, (1998) Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* 273: 8842-8848.

Kim, N. & S. Jinks-Robertson, (2012) Transcription as a source of genome instability. *Nat Rev Genet* 13: 204-214.

Kramer, S., (2011) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol* 181: 61-72.

Krasikova, Y. S., N. I. Rechkunova, E. A. Maltseva, I. O. Petrusheva & O. I. Lavrik, (2010) Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 38: 8083-8094.

Kubota, Y., R. A. Nash, A. Klungland, P. Schar, D. E. Barnes & T. Lindahl, (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15: 6662-6670.

Landini, P. & M. R. Volkert, (2000) Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J Bacteriol* 182: 6543-6549.

Le, S., C. Davis, J. B. Konopka & R. Sternglanz, (1997) Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1029-1042.

Lecordier, L., S. Devaux, P. Uzureau, J. F. Dierick, D. Walgraffe, P. Poelvoorde, E. Pays & L. Vanhamme, (2007) Characterization of a TFIIH homologue from *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 64: 1164-1181.

LeDoux, S. P., W. J. Driggers, B. S. Hollensworth & G. L. Wilson, (1999) Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res* 434: 149-159.

LeDoux, S. P., G. L. Wilson, E. J. Beecham, T. Stevensner, K. Wassermann & V. A. Bohr, (1992) Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 13: 1967-1973.

Lee, J. H., H. S. Jung & A. Gunzl, (2009) Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. *Nucleic Acids Res* 37: 3811-3820.

Lee, S. K., S. L. Yu, L. Prakash & S. Prakash, (2002) Yeast RAD26, a homolog of the human CSB gene, functions independently of nucleotide excision repair and base excision repair in promoting transcription through damaged bases. *Mol Cell Biol* 22: 4383-4389.

Lehmann, A. R., (2001) The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15: 15-23.

Lehmann, A. R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J. F. Wing, P. L. Kannouche & C. M. Green, (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* 6: 891-899.

Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulou & M. Ouellette, (2006) Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 5: 1713-1725.

Li, Z., S. Gourguechon & C. C. Wang, (2007) Tousled-like kinase in a microbial eukaryote regulates spindle assembly and S-phase progression by interacting with Aurora kinase and chromatin assembly factors. *J Cell Sci* 120: 3883-3894.

Linger, J. G. & J. K. Tyler, (2007) Chromatin disassembly and reassembly during DNA repair. *Mutat Res* 618: 52-64.

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

Lucas-Lledo, J. I. & M. Lynch, (2009) Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Mol Biol Evol* 26: 1143-1153.

Luscher, A., B. Nerima & P. Maser, (2006) Combined contribution of TbAT1 and TbMRPA to drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 150: 364-366.

Machado, C. R., L. Augusto-Pinto, R. McCulloch & S. M. Teixeira, (2006) DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res* 612: 40-57.

Marcello, L. & J. D. Barry, (2007) Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Res* 17: 1344-1352.

Marnett, L. J. & J. P. Plataras, (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet* 17: 214-221.

Martinez-Calvillo, S., D. Nguyen, K. Stuart & P. J. Myler, (2004) Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3: 506-517.

Martinez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart & P. J. Myler, (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11: 1291-1299.

Masters, J. R. & B. Koberle, (2003) Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3: 517-525.

Matsumoto, Y. & K. Kim, (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269: 699-702.

McCulloch, R. & J. D. Barry, (1999) A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev* 13: 2875-2888.

McHugh, P. J., R. D. Gill, R. Waters & J. A. Hartley, (1999) Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27: 3259-3266.

McVey, M., (2010) Strategies for DNA interstrand crosslink repair: insights from worms, flies, frogs, and slime molds. *Environ Mol Mutagen* 51: 646-658.

Min, J. H. & N. P. Pavletich, (2007) Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449: 570-575.

Morgante, P. G., C. M. Berra, M. Nakabashi, R. M. Costa, C. F. Menck & M. A. Van Sluys, (2005) Functional XPB/RAD25 redundancy in Arabidopsis genome: characterization of AtXPB2 and expression analysis. *Gene* 344: 93-103.

Morris, A. L., M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson & J. M. Thornton, (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12: 345-364.

Mousson, F., F. Ochsenbein & C. Mann, (2007) The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma* 116: 79-93.

Mu, D., C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon & A. Sancar, (1995) Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* 270: 2415-2418.

Myung, K., V. Pennaneach, E. S. Kats & R. D. Kolodner, (2003) *Saccharomyces cerevisiae* chromatin-assembly factors that act during DNA replication function in the maintenance of genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6640-6645.

Naegeli, H. & K. Sugawara, (2011) The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair (Amst)* 10: 673-683.

Narciso, L., P. Fortini, D. Pajalunga, A. Franchitto, P. Liu, P. Degan, M. Frechet, B. Demple, M. Crescenzi & E. Dogliotti, (2007) Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17010-17015.

Nishi, R., Y. Okuda, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, C. Masutani, K. Sugawara & F. Hanaoka, (2005) Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* 25: 5664-5674.

Nouspikel, T., (2009) DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66: 994-1009.

Nouspikel, T. & P. C. Hanawalt, (2006) Impaired nucleotide excision repair upon macrophage differentiation is corrected by E1 ubiquitin-activating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16188-16193.

Ogi, T., S. Limsirichaikul, R. M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N. G. Jaspers, L. H. Mullenders, S. Yamashita, M. I. Fousteri & A. R. Lehmann, (2010) Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell* 37: 714-727.

Oksenyshyn, V. & F. Coin, (2009) The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9: 90-96.

Olivero, O. A., P. K. Chang, D. M. Lopez-Larraz, M. C. Semino-Mora & M. C. Poirier, (1997) Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat Res* 391: 79-86.

Ozdemir, A., H. Masumoto, P. Fitzjohn, A. Verreault & C. Logie, (2006) Histone H3 lysine 56 acetylation: a new twist in the chromosome cycle. *Cell Cycle* 5: 2602-2608.

Parsons, J. L. & G. L. Dianov, (2013) Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)* 12: 326-333.

Parsons, J. L., Dianova, II, S. L. Allinson & G. L. Dianov, (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J* 272: 2012-2021.

Pascoalino, B. dos Santos Estudo funcional da chaperona de histonas Asf1 no *Trypanosoma brucei*. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

Passos-Silva, D.G. Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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

- Peacock, L., V. Ferris, R. Sharma, J. Sunter, M. Bailey, M. Carrington & W. Gibson, (2011) Identification of the meiotic life cycle stage of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3671-3676.
- Pei, J., B. H. Kim & N. V. Grishin, (2008) PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res* 36: 2295-2300.
- Pena-Diaz, J., M. Akbari, O. Sundheim, M. E. Farez-Vidal, S. Andersen, R. Sneve, D. Gonzalez-Pacanowska, H. E. Krokkan & G. Slupphaug, (2004) *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *J Mol Biol* 342: 787-799.
- Perez, J., C. Gallego, V. Bernier-Villamor, A. Camacho, D. Gonzalez-Pacanowska & L. M. Ruiz-Perez, (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: 771-777.
- Pirsel, M. & V. A. Bohr, (1993) Methyl methanesulfonate adduct formation and repair in the DHFR gene and in mitochondrial DNA in hamster cells. *Carcinogenesis* 14: 2105-2108.
- Pluskal, T., T. Hayashi, S. Saitoh, A. Fujisawa & M. Yanagida, (2011) Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast. *FEBS J* 278: 1299-1315.
- Pluskota-Karwatka, D., (2008) Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes. *Bioorg Chem* 36: 198-213.
- Poon, S. K., L. Peacock, W. Gibson, K. Gull & S. Kelly, (2012) A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. *Open Biol* 2: 110037.
- Povirk, L. F. & D. E. Shuker, (1994) DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res* 318: 205-226.
- Proto, W. R., G. H. Coombs & J. C. Mottram, (2013) Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 11: 58-66.
- Proudfoot, C. & R. McCulloch, (2005) Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res* 33: 6906-6919.
- Proudfoot, C. & R. McCulloch, (2006) *Trypanosoma brucei* DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells. *Mol Biochem Parasitol* 145: 245-253.
- Prousek, J., (2007) Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 79: 2325-2338.
- Rajao, M. A. Síntese translesão e reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: caracterização funcional da DNA Polimerase Kappa e análise da remoção de lesões no DNA nuclear e mitocondrial. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- Rajao, M. A., D. G. Passos-Silva, W. D. DaRocha, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, S. M. Teixeira & C. R. Machado, (2009) DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. *Mol Microbiol* 71: 185-197.
- Ramey, C. J., S. Howar, M. Adkins, J. Linger, J. Spicer & J. K. Tyler, (2004) Activation of the DNA damage checkpoint in yeast lacking the histone chaperone anti-silencing function 1. *Mol Cell Biol* 24: 10313-10327.
- Ransom, M., B. K. Dennehey & J. K. Tyler, (2010) Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* 140: 183-195.



- Ray, P. D., B. W. Huang & Y. Tsuji, (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24: 981-990.
- Reece, S. E., L. C. Pollitt, N. Colegrave & A. Gardner, (2011) The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathog* 7: e1002320.
- Richards, J. D., L. Cubeddu, J. Roberts, H. Liu & M. F. White, (2008) The archaeal XPB protein is a ssDNA-dependent ATPase with a novel partner. *J Mol Biol* 376: 634-644.
- Ridgley, E. L., Z. H. Xiong & L. Ruben, (1999) Reactive oxygen species activate a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei* brucei. *Biochem J* 340 ( Pt 1): 33-40.
- Rijkers, T., J. Van Den Ouweland, B. Morolli, A. G. Rolink, W. M. Baarends, P. P. Van Sloun, P. H. Lohman & A. Pastink, (1998) Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 18: 6423-6429.
- Rippa, V., A. Duilio, P. di Pasquale, A. Amoresano, P. Landini & M. R. Volkert, (2011) Preferential DNA damage prevention by the *E. coli* AidB gene: A new mechanism for the protection of specific genes. *DNA Repair (Amst)* 10: 934-941.
- Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes & I. Leiros, (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 66: 981-993.
- Robinson, N. P., R. McCulloch, C. Conway, A. Browitt & J. D. Barry, (2002) Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 277: 26185-26193.
- Robson, C. N. & I. D. Hickson, (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* 19: 5519-5523.
- Rocha, C. R., L. K. Lerner, O. K. Okamoto, M. C. Marchetto & C. F. Menck, (2012) The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res* 752: 25-35.
- Saffran, W. A., S. Ahmed, S. Bellevue, G. Pereira, T. Patrick, W. Sanchez, S. Thomas, M. Alberti & J. E. Hearst, (2004) DNA repair defects channel interstrand DNA cross-links into alternate recombinational and error-prone repair pathways. *J Biol Chem* 279: 36462-36469.
- Sage, J. M., O. S. Gildemeister & K. L. Knight, (2010) Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *J Biol Chem* 285: 18984-18990.
- San Filippo, J., P. Sung & H. Klein, (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229-257.
- Sands, A. T., A. Abuin, A. Sanchez, C. J. Conti & A. Bradley, (1995) High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature* 377: 162-165.
- Santos, J. H., J. N. Meyer, B. S. Mandavilli & B. Van Houten, (2006) Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 314: 183-199.
- Sarker, A. H., S. E. Tsutakawa, S. Kostek, C. Ng, D. S. Shin, M. Peris, E. Campeau, J. A. Tainer, E. Nogales & P. K. Cooper, (2005) Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* 20: 187-198.
- Sauvage, V., D. Aubert, S. Escotte-Binet & I. Villena, (2009) The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 167: 81-94.

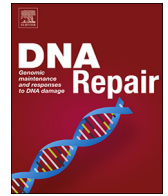
- Saxowsky, T. T., G. Choudhary, M. M. Klingbeil & P. T. Englund, (2003) *Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. *J Biol Chem* 278: 49095-49101.
- Saxowsky, T. T. & P. W. Doetsch, (2006) RNA polymerase encounters with DNA damage: transcription-coupled repair or transcriptional mutagenesis? *Chem Rev* 106: 474-488.
- Schamber-Reis, B. L., S. Nardelli, C. G. Regis-Silva, P. C. Campos, P. G. Cerqueira, S. A. Lima, G. R. Franco, A. M. Macedo, S. D. Pena, C. Cazaux, J. S. Hoffmann, M. C. Motta, S. Schenkman, S. M. Teixeira & C. R. Machado, (2012) DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Mol Biochem Parasitol* 183: 122-131.
- Scher, R., J. B. Garcia, B. Pascoalino, S. Schenkman & A. K. Cruz, (2012) Characterization of anti-silencing factor 1 in *Leishmania major*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 377-386.
- Schlecker, T., A. Schmidt, N. Dirdjaja, F. Voncken, C. Clayton & R. L. Krauth-Siegel, (2005) Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 280: 14385-14394.
- Shivji, M. K., S. R. Mukund, E. Rajendra, S. Chen, J. M. Short, J. Savill, D. Klenerman & A. R. Venkitaraman, (2009) The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single- versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13254-13259.
- Siegel, T. N., K. Gunasekera, G. A. Cross & T. Ochsenreiter, (2011) Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. *Trends Parasitol* 27: 434-441.
- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, L. E. Kemp, L. M. Figueiredo, J. E. Lowell, D. Fenyo, X. Wang, S. Dewell & G. A. Cross, (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23: 1063-1076.
- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, X. Wang, S. Dewell & G. A. Cross, (2010) Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res* 38: 4946-4957.
- Sillje, H. H., K. Takahashi, K. Tanaka, G. Van Houwe & E. A. Nigg, (1999) Mammalian homologues of the plant Tousled gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *EMBO J* 18: 5691-5702.
- Simpson, A. G., J. R. Stevens & J. Lukes, (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 22: 168-174.
- Simpson, L., A. M. Simpson, G. Kidane, L. Livingston & T. W. Spithill, (1980) The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am J Trop Med Hyg* 29: 1053-1063.
- Sloof, P. & R. Benne, (1993) RNA editing in trypanosome mitochondria: guidelines for models. *FEBS Lett* 325: 146-151.
- Sobol, R. W., J. K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R. K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky & S. H. Wilson, (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* 379: 183-186.
- Sommaruga, R. & A. G. Buma, (2000) UV-induced cell damage is species-specific among aquatic phagotrophic protists. *J Eukaryot Microbiol* 47: 450-455.
- Stordal, B. & M. Davey, (2007) Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life* 59: 696-699.

- Sunavala-Dossabhoy, G. & A. De Benedetti, (2009) Torsionless homolog, TLK1, binds and phosphorylates Rad9; TLK1 acts as a molecular chaperone in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 8: 87-102.
- Suquet, C. & M. J. Smerdon, (1993) UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *J Biol Chem* 268: 23755-23757.
- Svejstrup, J. Q., Z. Wang, W. J. Feaver, X. Wu, D. A. Bushnell, T. F. Donahue, E. C. Friedberg & R. D. Kornberg, (1995) Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell* 80: 21-28.
- Symington, L. S. & J. Gautier, (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45: 247-271.
- Tait, A., (1980) Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature* 287: 536-538.
- Taladriz, S., T. Hanke, M. J. Ramiro, M. Garcia-Diaz, M. Garcia De Lacoba, L. Blanco & V. Larraga, (2001) Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic Acids Res* 29: 3822-3834.
- Talbert, P. B. & S. Henikoff, (2010) Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 264-275.
- Tan, K. S., S. T. Leal & G. A. Cross, (2002) *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Mol Biochem Parasitol* 125: 11-21.
- Teixeira, S. M., R. M. de Paiva, M. M. Kangussu-Marcolino & W. D. Darocha, (2012) *Trypanosomatid* comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genet Mol Biol* 35: 1-17.
- Thoma, B. S., M. Wakasugi, J. Christensen, M. C. Reddy & K. M. Vasquez, (2005) Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* 33: 2993-3001.
- Tiengwe, C., L. Marcello, H. Farr, N. Dickens, S. Kelly, M. Swiderski, D. Vaughan, K. Gull, J. D. Barry, S. D. Bell & R. McCulloch, (2012) Genome-wide analysis reveals extensive functional interaction between DNA replication initiation and transcription in the genome of *Trypanosoma brucei*. *Cell Rep* 2: 185-197.
- Tijsterman, M., R. de Pril, J. G. Tasserion-de Jong & J. Brouwer, (1999) RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 934-940.
- Trenaman, A., C. Hartley, M. Prorocic, D. G. Passos-Silva, M. van den Hoek, V. Nechyporuk-Zloy, C. R. Machado & R. McCulloch, (2012) *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in a life cycle-specific genome stability process and dictates BRC repeat number-dependent RAD51 subnuclear dynamics. *Nucleic Acids Res* 41: 943-960.
- Tyler, J. K., C. R. Adams, S. R. Chen, R. Kobayashi, R. T. Kamakaka & J. T. Kadonaga, (1999) The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402: 555-560.
- Ulbert, S., L. Eide, E. Seeberg & P. Borst, (2004) Base J, found in nuclear DNA of *Trypanosoma brucei*, is not a target for DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* 3: 145-154.
- Van der Ploeg, L. H., S. H. Giannini & C. R. Cantor, (1985) Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228: 1443-1446.
- van Zandbergen, G., C. G. Luder, V. Heussler & M. Duszenko, (2010) Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? *Trends Parasitol* 26: 477-483.

- Vanhamme, L. & E. Pays, (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59: 223-240.
- Vannier, J. B., A. Depeiges, C. White & M. E. Gallego, (2009) ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5: e1000380.
- Venegas, J. A., L. Aslund & A. Solari, (2009) Cloning and characterization of a DNA polymerase beta gene from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int* 58: 187-192.
- Vermeulen, W., S. Rademakers, N. G. Jaspers, E. Appeldoorn, A. Raams, B. Klein, W. J. Kleijer, L. K. Hansen & J. H. Hoeijmakers, (2001) A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat Genet* 27: 299-303.
- Vidal, A. E., M. Harkiolaki, C. Gallego, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, K. Wilson & D. Gonzalez-Pacanowska, (2007) Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from *Leishmania major*. *J Mol Biol* 373: 827-838.
- Vilchez Larrea, S. C., G. D. Alonso, M. Schlesinger, H. N. Torres, M. M. Flawia & S. H. Fernandez Villamil, (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase plays a differential role in DNA damage-response and cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 41: 405-416.
- Walmacq, C., A. C. Cheung, M. L. Kireeva, L. Lubkowska, C. Ye, D. Gotte, J. N. Strathern, T. Carell, P. Cramer & M. Kashlev, (2012) Mechanism of translesion transcription by RNA polymerase II and its role in cellular resistance to DNA damage. *Mol Cell* 46: 18-29.
- Wang, D. & S. J. Lippard, (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4: 307-320.
- Wang, K., G. Deng, G. Chen, M. Liu, Y. Yi, T. Yang, D. R. McMillan & X. Xiao, (2011) Heat shock protein 70 inhibits hydrogen peroxide-induced nucleolar fragmentation via suppressing cleavage and down-regulation of nucleolin. *Cell Stress Chaperones* 17: 121-130.
- Wang, L. & S. J. Brown, (2006) BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* 34: W243-248.
- Westbrook, J., Z. Feng, L. Chen, H. Yang & H. M. Berman, (2003) The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acids Res* 31: 489-491.
- WHO, (<http://www.who.int/topics/en/>).
- Wiederstein, M. & M. J. Sippl, (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35: W407-410.
- Williams, S. K., D. Truong & J. K. Tyler, (2008) Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9000-9005.
- Woodhouse, B. C., Dianova, II, J. L. Parsons & G. L. Dianov, (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 7: 932-940.
- Wu, H. I., J. A. Brown, M. J. Dorie, L. Lazzeroni & J. M. Brown, (2004) Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res* 64: 3940-3948.
- Yan, C., M. Terribilini, F. Wu, R. L. Jernigan, D. Dobbs & V. Honavar, (2006) Predicting DNA-binding sites of proteins from amino acid sequence. *BMC Bioinformatics* 7: 262.
- Zhang, X. Y., J. Langenick, D. Traynor, M. M. Babu, R. R. Kay & K. J. Patel, (2009) Xpf and not the Fanconi anaemia proteins or Rev3 accounts for the extreme resistance to cisplatin in *Dictyostelium discoideum*. *PLoS Genet* 5: e1000645.

Zhou, B. B. & J. Bartek, (2004) Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4: 216-225.

## **Anexos**



## The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome

J.P. Vieira-da-Rocha<sup>a</sup>, D.G. Passos-Silva<sup>a</sup>, I.C. Mendes<sup>a</sup>, E.A. Rocha<sup>a</sup>, D.A. Gomes<sup>a</sup>,  
C.R. Machado<sup>a,\*</sup>, R. McCulloch<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, 30161-970, MG, Brazil

<sup>b</sup> The Wellcome Centre for Molecular Parasitology, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Sir Graeme Davies Building, 120 University Place, Glasgow, G12 8TA, UK

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Trypanosome  
Life cycle  
DNA damage response  
Replication  
Repair  
Cell cycle

### ABSTRACT

Genomes are affected by a wide range of damage, which has resulted in the evolution of a number of widely conserved DNA repair pathways. Most of these repair reactions have been described in the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, which is a genetically tractable eukaryotic microbe and important human and animal parasite, but little work has considered how the DNA damage response operates throughout the *T. brucei* life cycle. Using quantitative PCR we have assessed damage induction and repair in both the nuclear and mitochondrial genomes of the parasite. We show differing kinetics of repair for three forms of DNA damage, and dramatic differences in repair between replicative life cycle forms found in the tsetse fly midgut and the mammal. We find that mammal-infective *T. brucei* cells repair oxidative and crosslink-induced DNA damage more efficiently than tsetse-infective cells and, moreover, very distinct patterns of induction and repair of DNA alkylating damage in the two life cycle forms. We also reveal robust repair of DNA lesions in the highly unusual *T. brucei* mitochondrial genome (the kinetoplast). By examining mutants we show that nuclear alkylation damage is repaired by the concerted action of two repair pathways, and that Rad51 acts in kinetoplast repair. Finally, we correlate repair with cell cycle arrest and cell growth, revealing that induced DNA damage has strikingly differing effects on the two life cycle stages, with distinct timing of alkylation-induced cell cycle arrest and higher levels of damage induced death in mammal-infective cells. Our data reveal that *T. brucei* regulates the DNA damage response during its life cycle, a capacity that may be shared by many microbial pathogens that exist in variant environments during growth and transmission.

### 1. Introduction

*Trypanosoma brucei* is the causative agent of sleeping sickness in humans and nagana in livestock. The parasite has a complex life cycle, undergoing multiple changes as it develops within and transmits between mammal hosts and the tsetse fly vector. Such changes include alterations in metabolism [1], composition of surface proteins [2], and organelle organization inside the cell body [3]. Within tsetse flies (*Glossina* genus), *T. brucei* differentiates between replicative and non-replicative forms in both the digestive system and in the salivary glands [4]. Currently, only replicative procyclic forms (PCF) cells from the fly midgut are routinely grown and genetically manipulated in culture

(Fig. 1A). Non-replicative metacyclic form cells in the tsetse salivary gland establish infections in mammals, after fly feeding, by differentiating into the replicative long slender bloodstream form (BSF), which can also be routinely cultured and modified (Fig. 1A). BSF cell survival in the mammal critically depends on expression of a ‘coat’ composed of a single variant surface glycoprotein (VSG), which is periodically switched to an antigenically distinct VSG type to thwart clearance by the host adaptive immune response [5–7]. In contrast, PCF cells do not require VSG antigenic variation and, instead, they express different forms of procyclin on their surface [8]. Despite these differences in the cell surface proteome, allied to alterations in cell biology and metabolism, both PCF and BSF cells appear to function to establish

**Abbreviations:** BER, base excision repair; BSF, bloodstream form; DR, direct repair; DSBs, double strand breaks; HR, homologous recombination; ICL, interstrand crosslink; kDNA, kinetoplast DNA; MMR, mismatch repair; MMS, methyl methanesulfonate; nDNA, nuclear DNA; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, non-homologous end joining; PCF, procyclic form; PI, propidium iodide; TLS, translesion synthesis; VSG, variant surface glycoprotein

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [crmachad@icb.ufmg.br](mailto:crmachad@icb.ufmg.br) (C.R. Machado), [richard.mcculloch@glasgow.ac.uk](mailto:richard.mcculloch@glasgow.ac.uk) (R. McCulloch).

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.005>

Received 27 June 2018; Received in revised form 12 October 2018; Accepted 12 November 2018

Available online 14 November 2018

1568-7864/© 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription

Carlos R. Machado,<sup>1\*\*†</sup> João P. Vieira-da-Rocha,<sup>1†</sup>  
Isabela Cecilia Mendes,<sup>1,2</sup> Matheus A. Rajão,<sup>3</sup>  
Lucio Marcello,<sup>2</sup> Mainá Bitar,<sup>1</sup>  
Marcela G. Drummond,<sup>4</sup> Priscila Grynberg,<sup>1</sup>  
Denise A. A. Oliveira,<sup>4</sup> Catarina Marques,<sup>2</sup>  
Ben Van Houten<sup>5</sup> and Richard McCulloch<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil.

<sup>2</sup>The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Sir Graeme Davies Building, 120 University Place, Glasgow, G12 8TA, UK.

<sup>3</sup>Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37 Fátima, Rio de Janeiro 20231-050, RJ, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Genética Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine and The University of Pittsburgh Cancer Institute, Hillman Cancer Center, Pittsburgh, PA 15213, USA.

## Summary

**Nucleotide excision repair (NER) is a highly conserved genome repair pathway acting on helix distorting DNA lesions. NER is divided into two subpathways: global genome NER (GG-NER), which is responsible for repair throughout genomes, and transcription-coupled NER (TC-NER), which acts on lesions that impede transcription. The extent of the *Trypanosoma brucei* genome that is transcribed is highly unusual,**

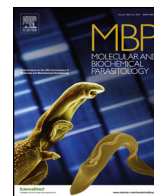
since most genes are organized in multigene transcription units, each transcribed from a single promoter. Given this transcription organization, we have addressed the importance of NER to *T. brucei* genome maintenance by performing RNAi against all predicted contributing factors. Our results indicate that TC-NER is the main pathway of NER repair, but only CSB, XPBz and XPG contribute. Moreover, we show that UV lesions are inefficiently repaired in *T. brucei*, perhaps due to preferential use of RNA polymerase translesion synthesis. RNAi of XPC and DDB was found to be lethal, and we show that these factors act in inter-strand cross-link repair. XPD and XPB appear only to act in transcription, not repair. This work indicates that the predominance of multigenic transcription in *T. brucei* has resulted in pronounced adaptation of NER relative to the host and may be an attractive drug target.

## Introduction

DNA genomes are exposed to a myriad of agents that modify or alter their structures. Some of these agents, like reactive oxygen species and reactive nitrogen species, can be produced endogenously, while others, such as ionizing radiation, UV light and harmful chemicals, are derived from the environment. To maintain genomic stability most living organisms possess multiple pathways to repair such DNA damage. Nucleotide excision repair (NER) is responsible for removing a remarkable variety of DNA lesions, including bulky adducts covalently attached to DNA and other forms of damage that distort the double helix structure (Naegeli and Sugawara, 2011). NER defects in humans are associated with the cancer-prone syndrome xeroderma pigmentosum (XP) and with the developmental disorders Cockayne syndrome and trichothiodystrophy (Lehmann, 2001; Vermeulen *et al.*, 2001; Emmert *et al.*, 2009; Cameroni *et al.*, 2010). NER is composed of two subpathways: Global Genome Nucleotide Excision Repair (GG-NER), which recognizes lesions genome-wide, and Transcription-Coupled NER (TC-NER), which recognizes DNA lesions that block elongation of RNA polymerase (Pol) in the transcribed strand of active

Accepted 22 March, 2014. For correspondence. \*E-mail richard.mcculloch@glasgow.ac.uk; Tel. (+44) 141 330 5946; Fax (+44) 141 330 8269. \*\*E-mail crmachad@icb.ufmg.br; Tel. (+55) 31 3409 2643; Fax (+55) 31 3409 2984. †These authors contributed equally to this work.





## *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* present distinct DNA damage responses



Juliana B.F. Garcia<sup>a,1</sup>, João P.Vieira da Rocha<sup>b,1</sup>, Héllida M. Costa-Silva<sup>b</sup>, Ceres L. Alves<sup>b</sup>, Carlos R. Machado<sup>b,\*\*</sup>, Angela K. Cruz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 December 2015  
Received in revised form 10 May 2016  
Accepted 13 May 2016  
Available online 14 May 2016

#### Keywords:

*Leishmania major*  
*Trypanosoma cruzi*  
DNA damage response  
Anti-silencing factor 1  
Methyl methanesulfonate  
Gamma irradiation

### ABSTRACT

*Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* are medically relevant parasites and interesting model organisms, as they present unique biological processes. Despite increasing data regarding the mechanisms of gene expression regulation, there is little information on how the DNA damage response (DDR) occurs in trypanosomatids. We found that *L. major* presented a higher radiosensitivity than *T. cruzi*. *L. major* showed G1 arrest and displayed high mortality in response to ionizing radiation as a result of the inefficient repair of double-strand breaks (DSBs). Conversely, *T. cruzi* exhibited arrest in the S/G2 cell cycle phase, was able to efficiently repair DSBs and did not display high rates of cell death after exposure to gamma irradiation. *L. major* showed higher resistance to alkylating DNA damage, and only *L. major* was able to promote DNA repair and growth recovery in the presence of MMS. ASF1c overexpression did not interfere with the efficiency of DNA repair in either of the parasites but did accentuate the DNA damage checkpoint response, thereby delaying cell fate after damage. The observed differences in the DNA damage responses of *T. cruzi* and *L. major* may originate from the distinct preferred routes of genetic plasticity of the two parasites, i.e., DNA recombination versus amplification.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* are trypanosomatids of medical and economic relevance, as they cause diseases in humans and animals. Leishmaniasis and Chagas disease affect 12 and 6–7 million people, respectively. Hundreds of millions of people are currently at risk of infection (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). In addition to their medical importance, as ancient eukaryotes, trypanosomatids are interesting model organisms because they present unique biological processes. The control of gene expression in these organisms occurs mainly at the posttranscriptional level, where genes are transcribed in large polycistronic units and processed by a *trans*-splicing mechanism [1,2].

The genetic organization of the trypanosomatids is highly conserved [3], as is their genetic plasticity. The *T. cruzi* genome displays a high frequency of widespread and focal gene copy number variations, notably including a number located in mucins and *trans*-sialidase-rich regions. Additionally, the *T. cruzi* genome presents whole-chromosome copy variations [4,5]. The plasticity of the *Leishmania* genome is mostly associated with the process of gene amplification, which may encompass short or long chromosome regions, entire chromosomes or even the whole genome, and is linked to a loose control of ploidy [6–11]. The magnitude of this plasticity gave rise to the concept known as mosaic aneuploidy [12–14].

The interface between transcription and other DNA-related processes, such as DNA replication and repair, involves an intricate protein network. The histone chaperone ASF1 (Anti-silencing factor 1) acts to promote the loading of histones H3 and H4 onto newly replicated DNA [15]. Yeast with an ASF1 deletion are highly sensitive to DNA damaging agents, suggesting a role of ASF1 in the modulation of chromatin structure during DNA repair [15,16]. After DNA repair, ASF1 acts in concert with the Rtt109 acetyltransferase to incorporate an acetylated H3 histone (H3K56Ac) in the nucleo-

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: julianaborio@yahoo.com.br (J.B.F. Garcia), joapv@yahoo.com.br (J.P.Vieira da Rocha), hellidamarina@yahoo.com.br (H.M. Costa-Silva), ceres\_luciana@yahoo.com.br (C.L. Alves), crmachad@icb.ufmg.br (C.R. Machado), akcruz@fmrp.usp.br (A.K. Cruz).

<sup>1</sup> Authors have equally contributed to the manuscript.