

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO DO GENE DA FOTOLIASE DE
TRIPANOSSOMATÍDEOS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO
GENE DE *Trypanosoma brucei* EM *Trypanosoma cruzi*

ORIENTADO: Egídio Paulo Francisco Nhavene

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

CO-ORIENTADORA: Dra. Ceres Luciana Alves

BELO HORIZONTE
Março – 2014

Egídio Paulo Francisco Nhavene

ESTUDO DO GENE DA FOTOLIASE DE
TRIPANOSSOMATÍDEOS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO
GENE DE *Trypanosoma brucei* EM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-graduação
em Genética da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
pré-requisito obrigatório para
obtenção do título de Mestre em
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos
Renato Machado

Co-orientadora: Dra. Ceres
Luciana Alves

Belo Horizonte
Março – 2014

Nhavene, Egídio Paulo Francisco.

Estudo do gene da fotoliase de tripanossomatídeos : expressão heteróloga do gene de trypanosomabrucei em trypanosomacruzi [manuscrito] / Egídio Paulo Francisco Nhavene. - 2014.

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

Orientador: Carlos Renato Machado. Co-orientadora. Ceres Luciana Alves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Tripanossoma cruzi - Teses. 2. Reparo do DNA- Teses. 3. Reparo por excisão de nucleotídeos. 4. Reparo acoplado a transcrição. 5. Fotorreativação. 6. Fotoliase. 7. Genética - Teses I. Machado, Carlos Renato. II. Alves, Ceres Luciana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"ESTUDO DO GENE DA FOTOLIASE DE
TRIPANOSSOMASTIDEOS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO
GENE DE Trypanosoma brucei EM Trypanosoma cruzi."**

Egídio Paulo Francisco Nhavene

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Carlos R. Machado

Dr. Carlos Renato Machado - Orientador
UFMG

Ceres Luciana Alves
Dra. Ceres Luciana Alves - Coorientadora
UFMG

Anderson Miyoshi
Dr. Anderson Miyoshi
UFMG

Camila Carrião M. Garcia
Dra. Camila Carrião M. Garcia
UFOP

Belo Horizonte, 31 de março de 2014.

Dedicatória

Dedico este trabalho, a minha Mãe Maria Rodrigues Magaia, por ser umas das pessoas que sempre acreditou em mim e especialmente ao meu Pai Francisco Seneta (*in memorian*) e ao meu Padrasto César Francês do César Cuna (*in memorian*), os quais deram toda sua vida, seu amor e seu trabalho, formaram o meu carácter e me ensinaram a lutar em busca do meu melhor, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo incentivo nos estudos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Ao Deus Altíssimo todo-poderoso Meu Senhor e Rei e minha Fonte, que com tanto amor, me proporciona a saúde e a energia necessária para seguir em frente realizando os meus sonhos, suprimindo todas as minhas necessidades segundo as suas riquezas, colocando pessoas ao meu redor que me possam ajudar em cada fase da minha vida (I Samuel 7:12 ...Ebenzer, e disse: Até aqui me ajudou o Senhor...).

Ao meu Orientador, Professor Dr. Carlos Renato Machado, eterna gratidão, admiração e respeito por tudo que me ensinou, por ter acreditado em mim e ter me dado à oportunidade durante esses dois anos de trabalhar em seu Laboratório Genética Bioquímica, local onde aprendi, cresci e saí levando uma grande experiência e cujo apoio e palavras de incentivo, carinho e preocupação, me ajudaram a manter forte o espírito. É difícil transmitir em palavras todas as suas contribuições para a minha vida pessoal e profissional. Que Deus abençoe e ilumine-o sempre.

À minha Co-orientadora Dra. Ceres Luciana Alves, pelas grandes ajudas, contribuições na bancada, puxões de orelhas, ensinamentos e pela orientação carinhosa e generosa em todas as etapas deste trabalho, eterna gratidão, admiração e respeito. Que Deus vos abençoe e ilumine sempre.

As Professoras Dra. Andréa Macedo, Dra. Glória Franco, eterna gratidão, admiração e respeito, pelos ensinamentos e contribuições de diversas formas, com colaborações, sugestões e críticas essenciais ao meu trabalho. Que Deus vos abençoe e ilumine sempre.

À Senhora Neuza Rodrigues Antunes, eterna gratidão, admiração e respeito por tudo, pela sua generosidade, jamais me esquecerei da sua boa disposição para tudo, mesmo nos momentos apertados, sempre me ajudaste, meu muito obrigado Mãe. Que Deus abençoe e ilumine-a sempre.

Ao Dr. Pedro Henrique Nascimento de Aguiar, pelas grandes ajudas, contribuições na bancada, puxões de orelhas, ensinamentos e pela orientação carinhosa e generosa em todas as etapas deste trabalho, eterna gratidão, admiração e respeito. Que Deus vos abençoe e ilumine sempre.

A minha líder, mãe e amiga, Professora Dra. Cláudia Baule, eterna gratidão, admiração e respeito por tudo que me ensinou, por ter acreditado em mim e ter me dado à oportunidade de estudar, lançando no mundo da ciência e cujo apoio e palavras de incentivo, me ajudaram a manter forte o espírito. Minha sincera e profunda gratidão. Que Deus abençoe e ilumine-a sempre.

Aos Colegas do Grupo de Reparo de Tripanossomatídeos: Hugo Oliveira, Bruno Repolês, Héllida Marina, Anna Cláudia, Cristiane Freitas, Paula Goncalves, Isabela Mendes, Selma Santos, João Pedro, Pedro Aguiar, Ceres Alves, Jarbas Ivan, Sabrina Lima, Marianna Lima, Samuel Lima. Agradeço pelo apoio incondicional, pela grande amizade, sinceridade e cumplicidade nas horas difíceis deixando o dia de trabalho mais divertido.

Aos colegas do LGB: André, Carlos, Elisângela, Helaine, Heron, Mainá, Mariana C, Mariana B, Michele, Priscila G, Priscila C, Pricila, Sílvia, Thiago, Thomaz, Isabella, Ítalo, Joice, Marcela, Rodrigo, Tiago, Viviane, Daniele, Maíra, Raony, Leonardo, Polly, Natália, Ludmila, Caroline, Wagson, Bruna e Daniela, agradeço-vos pelo carinho, pelas conversas, pelo apoio moral, pelos almoços em boa companhia, enfim, por todos os momentos que tornaram estes dois anos de LGB muito prazerosos e por toda a experiência que me transmitiram.

Aos meus amigos da Igreja Batista Getsemani e Aliança Bíblica Universitária: Pastores Jorge Linhares, Daniel Fialho, Fernando Viana, Davi Lago, Marcelo Mirasi, Carlos Marcio, Maria Geralda, Virginia Soares, Renata, Ana, Diego, Heider, Sabine, Regiane, Luciano, Raquel, etc meu muito obrigado pelo incentivo e colaboração em todos os momentos da minha formação cultural.

Aos meus amigos da UFMG Wanderson Marques, Debora Hilário, Leticia Assunção, Leo Barros, Ana Caroline, meu muito obrigado pelo apoio moral, pelos almoços em boa companhia, enfim, por momentos marcantes que tornaram estes dois anos de UFMG muito prazerosos.

Aos meus amigos estudantes moçambicanos, angolanos, cabo-verdianos, congolenses, guineenses, colombianos, beninenses, são-tomenses, dominicanos e haitianos em Belo

Horizonte – UFMG, meu muito obrigado pelo incentivo e colaboração em todos os momentos da minha formação cultural, pelo apoio moral, pelos almoços em boa companhia, enfim, por todos os momentos que tornaram estes dois anos de UFMG muito prazerosos.

Aos mentores Dra. Raquel, Dr. Edgar, Dr. Ivan e Dr. Armando e meus amigos, Sr. Bento, Sra. Gloria, Mila, Cesaltina, Emerson, Emanuel, Lória, Lola, Yuna, Dércio, Jane, Honório, Cláudio, Antônio, Américo, Hédio e Dino, pela amizade, incentivo e colaboração em todos os momentos da minha formação.

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), Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste projeto.

A todos os docentes e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG que ao longo do curso contribuíram para a minha formação técnico-científica e cultural.

A minha mãe Maria Rodrigues Magaia, aos meus irmãos Arnaldo, Leonel, Abel, Alberto, Laurência, Carolina, Cláudia, Francisco e Nelson aos sobrinhos Abigail, aos primos das famílias Nhavene e Magaia, por serem as das pessoas sempre acreditaram em mim, dando-me sempre votos de confiança, meu muito obrigado pelo amor incondicional. Que Deus vos abençoe e ilumine sempre.

À minha amada, minha grande amiga Michela Gomes de Oliveira Laice e sua mãe Ana de Rosaria – obrigado pelo vosso apoio. Este trabalho também é vosso fruto.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

MEU MUITO OBRIGADO, KHANIMAMBO!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanossomatídeos	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3. <i>Trypanosoma brucei</i>	5
1.4. O Genoma dos Tripanossomatídeos	7
1.5. Reparo de DNA em Tripanossomatídeos	7
1.5.1. Reparo de DNA e Lesões geradas por luz UV em Tripanossomatídeos	8
1.5.2. Radiação Ultravioleta	8
1.5.3. DNA Fotoliase	10
1.6. Fotorreativação – PHR	11
1.7. Reparo por Excisão de Nucleotídeos – NER	14
1.8. Gene da Fotoliase em Tripanossomatídeos	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Alinhamento de sequências	22
3.2. Extração de DNA genômico de <i>T. brucei</i>	22
3.3. Iniciadores	22
3.3.1. Amplificação por PCR para Clonagem	23
3.3.2. Clonagem	23
3.3.3. Transformação de Bactérias	24
3.3.4. PCR de colônia de bactérias transformadas	24
3.3.5. Preparação do DNA plasmidal em pequena escala (Mini-Prep)	25

3.3.6.	Digestão com Enzimas de Restrição.....	25
3.3.7.	Purificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose.....	25
3.3.8.	Ligação dos fragmentos de DNA	26
3.3.9.	Preparação do DNA plasmidal em larga escala (Maxi-Prep).....	26
3.4.	Obtenção de cepa CL Brener <i>T. cruzi</i> modificada	27
3.4.1.	Transfecção e seleção dos parasitos da cepa CL Brener <i>T. cruzi</i>	27
3.4.2.	Transfecção e seleção dos parasitos da cepa CL Brener <i>T. cruzi</i> CSB+/- ...	27
3.5.	Extração de RNA e ensaio de RT-PCR	27
3.6.	Curva de sobrevivência a luz UV	28
3.7.	Análise Estatística.....	29
4.	RESULTADOS	30
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÕES	48
7.	PERSPECTIVAS	49
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia dos tripanossomatídeos..	2
Figura 2. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> ..	4
Figura 3. Ciclo de vida do <i>T. brucei</i> ..	6
Figura 4. Lesões no DNA causadas por irradiação à luz UV.	9
Figura 5. Cofatores da DNA fotoliase..	11
Figura 6. Mecanismo da PHR.....	13
Figura 7. Mecanismo do NER.....	15
Figura 8. Reparo de lesões causadas por UV em <i>T. cruzi</i>	17
Figura 9. Reparo de lesões causadas por UV em <i>T. cruzi</i> CSB+/-..	18
Figura 10. Alinhamento de sequências de aminoácidos da fotoliase nuclear dos Tripanossomatídeos.....	19
Figura 11. Pseudogene da fotoliase nuclear do <i>T. cruzi</i> ..	30
Figura 12. Amplificação por PCR do gene nuclear da fotoliase do <i>T. brucei</i>	31
Figura 13. PCR de colônia do gene nuclear da fotoliase de <i>T. brucei</i> no pGEM... 32	
Figura 14. Digestão da Fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> no pGEM.....	32
Figura 15. PCR de colônia no pROCK-Fotoliase.....	33
Figura 16. RT-PCR no selvagen <i>T. cruzi</i>	34
Figura 17. RT-PCR no cepa de <i>T. cruzi</i> CSB+/-..	35
Figura 18. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> que expressa o gene da fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> 6 horas o tratamento com luz UV.....	36
Figura 19. Sobrevivência da cepa <i>T. cruzi</i> CSB+/- que expressa o gene da fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> 6 horas após o tratamento com luz UV.	37
Figura 20. Sobrevivência da cepa <i>T. cruzi</i> CSB+/- que expressa o gene da fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> 24 horas após o tratamento com luz UV.	38

Figura 21. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> que expressa o gene da fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> 24 horas após o tratamento com luz UV.	39
Figura 22. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> que expressa o gene da fotoliase nuclear de <i>T. brucei</i> em presença de luz branca.....	40
Figura 23. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> não é influenciada pelo meio de cultura LIT.41	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados -----	23
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Razão molar fragmento/vetor -----	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP** – Apurínico / apirimidínico
- BER** – Reparo por Excisão da Base
- BSA** – *Bovine Serum Albumin*
- CPD** – Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
- CSA/B** – Síndrome Cockayne A e Síndrome Cockayne B
- DDB** – *Damage DNA Binding* - ligação ao DNA lesado
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNMP** – desorribonucleotídeos-monofosfatos
- dNTP** – desoxirribonucleotídeos-trifosfatos
- DSB** – Quebra de fita dupla de DNA
- EDTA** – Ácido Etilenodiamina Tetracético
- FAD** – Dinucleotido Adenina e Flavina
- FADH_{ox}** – FADHox oxidase
- GGR** – Reparo do Genoma Global
- HCl** – Acido Clorídrico
- HDF** – Hidroxi Didemetil Flavina
- kDNA** – DNA mitocondrial
- KAP** – proteína associada os cinetoplasto
- LIT** – *Liver Infusion Tryptone*
- HR** – Recombinação Homologa
- MTHF** – Metenil Tetra Hidro Folato
- MMR** – *Mismatch Repair* - Reparo de Base Mal pareadas
- ng** – nano gramas
- nm** – Nanómetros
- NaCl** – Cloreto de Sódio
- NER** – *Nucleotide Excision Repair* - Reparo por Excisão de Nucleotídeos -
- NHEJ** – Junção de Extremidades não Homologas
- PBS** – Tampão fosfato-salino
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PHR** – Fotoreativação
- PCNA** – antígeno celular de proliferação nuclear
- rpm** – rotações por minuto
- ROS** – Espécies Reativas a Oxigénio

RFC – proteína de replicação A
RPA – proteína de replicação C
RNA – Ácido Ribonucleico
RT-PCR – Transcriptase Reversa PCR
SFBi – Soro fetal bovino inativado
SSB – quebra de fita simples
ssDNA – DNA de fita simples
TF_{II}H – Fator de transcrição
TCR – Reparo Acoplado a Transcrição
TLS – Síntese translesão
UV – Ultravioleta
WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION
XPA/B/C/D/E/F/G – Xeroderma Pigmentosum – A, B, C, D, E, F, G

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são protozoários parasitas causadores da Tripanossomíase Americana e Africana. Ambos são caracterizados pela presença de um flagelo simples e um cinetoplasto que é uma mitocôndria única e alongada que ocupa grande parte do volume celular, concatenados em uma rede de DNA. Apresentam também características morfológicas muito homogêneas, definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante. No interior dos hospedeiros invertebrados insetos ocorrem sob a forma tripomastigotas metacíclicos e epimastigotas; e nos hospedeiros vertebrados mamíferos ocorre sob a forma amastigota e tripomastigota sanguíneo. O sequenciamento do genoma desses parasitos revelou a existência de genes relacionados à manutenção do DNA tais como: a reversão direta das modificações de base por processos de dimetilação e por ação das fotoliasas ou dioxigenases ou ainda por retirada de bases incorporadas erradamente no DNA recém-replicado pelo MMR, retirada de danos volumosos por NER e retirada de bases incorporadas erradamente pelo BER, reparo de DSB e SSB por HR. Dentre as vias de reparo acima descritas, a Fotorreativação é um mecanismo de reparo direto que utiliza fotoliasas para catalisar a reversão de dímeros de pirimidina em monômeros. Existem vários tipos de fotoliasas de acordo com a sua especificidade de substrato. Outro mecanismo que repara as lesões induzidas por UV é o NER, que se subdivide em duas subvias: Reparo do Genoma Global e Reparo Acoplado a Transcrição. O *T. brucei* possui dois genes da fotoliase, um nuclear codificador da fotoliase criptocromo DASH e outro mitocondrial codificador da CPD fotoliase I. No entanto, o *T. cruzi* possui apenas o gene da fotoliase mitocondrial criptocromo DASH. No presente trabalho estudamos o efeito da irradiação, por luz UV, em *T. cruzi* selvagens, *T. cruzi* superexpressor do gene da fotoliase nuclear de *T. brucei*, *T. cruzi* deficientes no gene CSB (heminocaute) e *T. cruzi* heminocaute no gene CSB que superexpressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei*. Os resultados obtidos mostraram que o *T. cruzi* que superexpressa o gene fotoliase nuclear de *T. brucei* são mais resistentes à radiação UV do que o tipo selvagem. Outro dado importante é que as células selvagens, quando colocadas por 60 minutos sob a luz branca, após tratamento com luz UV, não retornam o crescimento. Não se verificou a mesma atividade em células deficientes no gene CSB. Esses dados sugerem que a fotoliase de *T. brucei* é funcional e a sua atividade é dependente da ação do gene CSB.

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* are the protozoa parasites that cause African and American trypanosomiasis. Both are characterized by the presence of a single flagellum, a kinetoplast, which is elongated and single mitochondria that occupies much of the cell volume concatenated into a network of DNA. These parasites also exhibit homogeneous morphological characteristics, defined according to the position of the kinetoplast in relation to the nucleus and the presence or absence of flagellum and undulating membrane. Inside of the invertebrate's insect host they occur as metacyclic trypomastigotes and epimastigotes forms, while inside of the mammiferous vertebrates hosts may be found as amastigote and bloodstream trypomastigote forms. The genome sequencing of these parasites showed the existence of genes that is related to DNA maintenance such as direct reversal of base changes by dimethylation processes or by the action of photolyases and dioxygenases or by removal of incorrectly incorporated bases repairing by MMR, removal of bulky damage by NER and removal of damage bases by BER, repair of SSBs and repair of DSB by HR. Among the repair pathways described above, Photoreactivation is a direct repair mechanism that catalyzes the reversion of pyrimidine dimers in monomers. There are several kinds of photolyases according to their substrate specificity. Another mechanism to repair UV-induced lesions is NER, which can be divided into two major pathways: Global Genome Repair and the Transcription Coupled Repair. The *T. brucei* has two photolyase genes, a nuclear photolyase gene which encodes a single stranded photolyase or cryptochromes DASH and a mitochondrial photolyase gene which encodes a CPD photolyase class I. However, the *T. cruzi* has only the mitochondrial photolyase gene which encodes a single stranded photolyase or cryptochromes DASH. In the present work we studied the effect of UV radiation in wild-type cells, *T. cruzi* strains heterologously expressing the *T. brucei* nuclear photolyase gene, *T. cruzi* CSB single-knockout cells and CSB single-knockout *T. cruzi* strains heterologously expressing the *T. brucei* nuclear photolyase gene. The results show that *T. cruzi* heterologously photolyase the nuclear gene of *T. brucei* are more resistant to UV irradiation than the wild type. There was not the same activity in *T. cruzi* CSB single-knockout strains heterologously expressing the *T. brucei* nuclear photolyase gene. Another important fact is that the wild-type cells, when placed for 60 min under white light after treatment with UV light, do not return to growth. These data suggest that photolyase from *T. brucei* is functional and its activity is dependent on the action of the CSB gene.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomatídeos

Os Tripanossomatídeos são parasitas obrigatórios que apresentam uma grande diversidade de hospedeiros invertebrados e vertebrados, com ampla distribuição nos diferentes continentes (SIMPSON et al., 2006). Eles pertencem ao reino Protozoa, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que inclui parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (CAVALIER, 2004; EL-SAYED et al. 2005; GUEVARA et al. 2005; BALMER et al. 2011).

Os tripanossomatídeos são conhecidos desde 1841, através de estudos feitos por Gustav Valentin (SÁ, 2005) e possuem espécies parasitas de importância médica e econômica. A espécie *Trypanosoma brucei* foi descoberta em 1894, pelo médico britânico David Bruce, no sangue de um viajante europeu pelo rio Gambia na África Ocidental. Este parasito causa a doença do sono ou Tripanossomíase Africana, são transmitidos pela picada pela da mosca tsé-tsé (SCHUMUNIS, 1999; MACHADO et al. 2006; BALMER et al. 2011; AMARAL, 2012). A espécie *Trypanosoma cruzi* descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas no sangue de pacientes na região de Minas Gerais, Brasil. Eles são transmitidos pelas fezes infectadas de triatomíneos durante o repasso sanguíneo (TOMO, 1916; DELAPORTE, 1995; KROPF, 2004), e causam a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana (TOMO, 1916; DELAPORTE, 1995; KROPF 2004; MACHADO et al. 2006; MASSAD, 2008; SILVA et al. 2010). Ambos parasitas são caracterizados pela presença de um flagelo simples e cinetoplasto que é uma mitocôndria única e alongada, contendo grande conteúdo de DNA composto por uma rede de maxicírculos e minicírculos formando uma combinação única na natureza e localizada próximo ao corpo basal do flagelo constituindo o DNA mitocondrial kDNA (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; MACHADO et al. 2006; GABALDON et al. 2010; SILVA et al. 2010; ZUMA et al. 2011).

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* apresentam características morfológicas muito homogêneas, definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante. O *T. cruzi* no interior do hospedeiro invertebrado ocorre sob a forma tripomastigotas metacíclicos e epimastigotas. Nos hospedeiros vertebrados mamíferos (incluindo seres humanos) ocorre sob forma amastigota e tripomastigota sanguíneo, sendo: a forma amastigota ocorrendo

só em *T. cruzi*, apresentando a forma arredondada e com flagelo curto que não se exterioriza; a forma epimastigota apresenta o cinetoplasto e o cinetossomo anteriores e próximos ao núcleo, com a membrana ondulante iniciando a partir dele; e a forma tripomastigota apresenta cinetossomo posterior, e o flagelo forma a borda de uma membrana ondulante que se desenvolve junto à célula do parasito (FIGURA 1) (GABALDON et al., 2010).

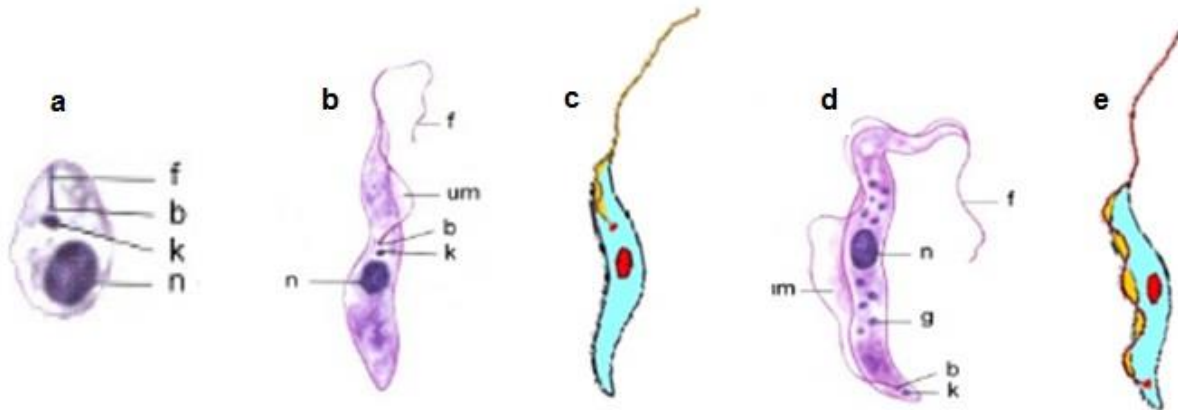


Figura 1. Morfologia dos tripanossomatídeos. (a) Amastigotas; (b) Epimastigotas; (d) Tripomastigotas, estágios morfológicos do *Trypanosoma cruzi*. (c) Epimastigota procíclica, (e) Tripomastigota Metacíclica/*Bloodstream* estágios morfológicos do *Trypanosoma brucei*.

f – flagelo, b – cinetossomo, k – cinetoplasto, n – núcleo e um – borda da membrana. Adaptado de DoCAMPO et al., 2005.

O *T. brucei* apresenta vários estágios morfológicos. No interior do hospedeiro invertebrado (insetos do gênero *Glossina*) ocorre sob forma tripomastigotas metacíclicos e epimastigotas replicativas. No interior dos hospedeiros vertebrados (mamíferos incluindo seres humanos) ocorre sob forma tripomastigotas sanguínea. A forma epimastigota apresenta o cinetoplasto e cinetossomo anteriores próximos ao núcleo, com a membrana ondulante iniciando a partir dele e a forma tripomastigota se apresenta com cinetossomo posterior e o flagelo formando a borda de uma membrana ondulante que se desenvolve

junto à célula do parasito (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; MACHADO et al. 2006, GABALDON et al. 2010).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário parasito intracelular, causador da Tripanossomíase Americana também conhecida como doença de Chagas, que é um dos maiores problemas de saúde na América do Sul e Central (GUEVARA et al. 2005, PIRES et al. 2007; WHO, 2013). O seu ciclo de vida é muito complexo com diferentes características morfológicas e metabólicas que lhe permitem adaptar-se e alternando-se entre dois hospedeiros. O hospedeiro invertebrado é o inseto triatomíneo que é um parasita hematófago obrigatório pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Os outros hospedeiros vertebrados são mamíferos entre os quais encontramos o homem (GUEVARA et al., 2005). O ciclo inicia-se quando o inseto vetor durante o repasso sanguíneo defeca sobre o hospedeiro e os parasitos presentes nas fezes entram em contato com a pele, contaminando-o (MASSAD, 2008). Pode ocorrer também a transmissão congênita (GURTLER et al. 2003; DORN et al. 2007), através de transfusão sanguínea ou por transplante de órgãos (SCHMUNIS, 1999). O *T. cruzi* apresenta três diferentes estágios de desenvolvimento entre o inseto vetor e hospedeiro vertebrado mamífero, sendo que as formas tripomastigotas são ingeridas através da hematofagia e na porção final do trato digestivo do inseto vetor transformam-se em formas epimastigotas e multiplicam e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectante para os vertebrados mamíferos onde são eliminadas durante a defecação. Nos hospedeiros vertebrados mamíferos, as formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas replicativas, no interior das células, estas se multiplicam por sucessivas divisões binárias, diferenciando-se em formas tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberadas no meio extracelular, infectando as células vizinhas ou caem na circulação sanguínea, onde são ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação (FIGURA 2) (GARCIA et al., 2010).

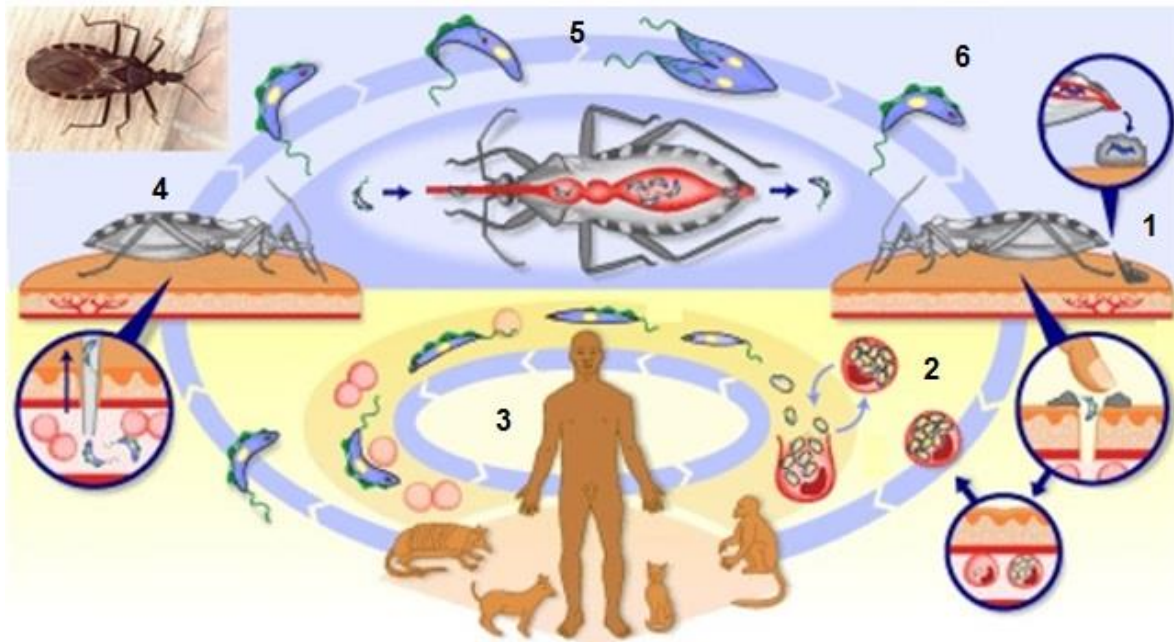


Figura 2. Ciclo de vida do *T. cruzi*. O ciclo mostra as várias formas do parasito alternando-se entre hospedeiros vertebrados mamíferos, e insetos da família Triatominae, com diferentes estágios morfológicos em cada um dos hospedeiros: formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas infectivos em vetores hematófagos e formas amastigotas intracelulares replicativas e tripomastigotas na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados mamíferos. Durante a picada, o triatomíneo infectado com *T. cruzi* defeca próximo ao local e as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado pelo orifício da picada (1). Os parasitas invadem células do sistema fagocítico mononuclear cutâneo e se diferenciam em formas amastigotas, capazes de replicação (2). Essas formas são liberadas na corrente sanguínea, diferenciam-se em formas tripomastigotas que vão se disseminar pelo organismo, atacando músculos e tecidos (3). Um triatomíneo não infectado adquire as formas tripomastigotas ao picar um hospedeiro vertebrado contaminado (4). Essas formas se diferenciam em formas epimastigotas, capazes de multiplicação no intestino posterior do vetor (5). Na porção final do trato digestivo do inseto vetor, os parasitas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes (6). Adaptado de PROTO *et al.*, 2013.

1.3. *Trypanosoma brucei*

O *T. brucei* é um protozoário parasito extracelular causador da Tripanossomíase Africana, também conhecida como doença de Sono, que é um dos maiores problemas de saúde na África subsaariana (MACLEOD et al. 2001; BERRIMAN et al. 2005; MACHADO et al. 2005; DANIELS et al. 2010). Ele subdivide-se em três subespécies, *T. b. brucei*, que tem como hospedeiro intermediário a mosca tsé-tsé do género *Glossina* e o mamífero vertebrado, não humano, como hospedeiro, são encontrados em toda África subsaariana. O *T. b. rhodosiense*, tem humanos como hospedeiro vertebrado mamífero, são encontrados na região oriental da África causando a forma aguda da doença do sono e o *T. b. gambiense*, tem humanos como hospedeiros definitivos e são encontrados na região ocidental da África causando a forma crônica da doença do sono (MACLEOD et al. 2001; VASSELA et al. 2001; BALMER et al. 2011; BARRETT & CROFT, 2012; SIMO et al. 2012; DUFFY et al. 2013; KNÜSEL et al. 2013). Durante o seu ciclo de vida, para sua sobrevivência, ele adapta-se a complexas mudanças bioquímicas e morfológicas, subdividindo-se a forma tripomastigota sanguínea em longa e delgada, na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, e em condições de alta parasitemia, se diferencia em formas tripomastigota sanguínea encurtada e grossa. 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 que 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 tripomastigotas metacíclicas são transmitidas para o hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor (FIGURA 3) (GRINSVEN et al. 2009; DANIELS et al. 2010; AKIYOSHI & GULL, 2013; BUTTER et al. 2013).

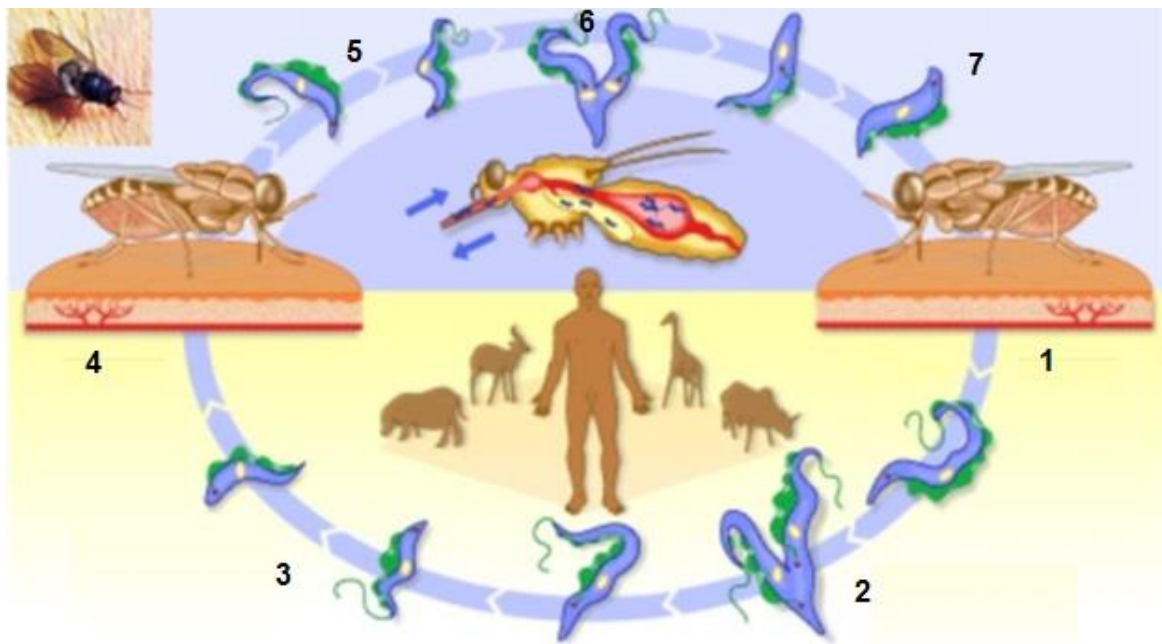


Figura 3. Ciclo de vida do *T. brucei*. O ciclo de vida do parasito alterna-se entre o inseto vetor do genero *Glossina* e o hospedeiro vertebrado mamífero. Durante o ciclo, a mosca contaminada injeta formas tripomastigotas metacíclicas durante a picada (1). O parasita se diferencia em forma tripomastigota sanguínea, longa e delgada (*slender*) que se multiplica na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado mamífero (2), espalhando-se na corrente sanguínea, podendo atingir o sistema nervoso central. Com a alta parasitemia, essas formas se tornam mais curtas e largas (*stumpy*) (3), outra mosca ingere essas formas tripomastigotas, contaminando-se (4) e no intestino médio da mosca Tsé-tsé, juntamente com o sangue ingerido pelo inseto se diferencia em formas procíclicas que migram para o pró-ventrículo, crescem em comprimento e dividem-se assimetricamente originando formas epimastigotas (5) que migram para as glândulas salivares onde se multiplicam (6), em seguida, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (7) e o ciclo inicia-se novamente após a picada da mosca Tsé-tsé onde os parasitas aderem às células epiteliais do hospedeiro vertebrado. Adaptado de PROTO *et al.*, 2013.

1.4. O Genoma dos Tripanossomatídeos

O genoma de tripanossomatídeos apresenta características peculiares, diferente dos demais eucariotos em diversos processos nucleares tais como a transcrição e a compactação do DNA, organizando-se em diversos cromossomas e o número e tamanho variam de acordo com a espécie. O tamanho do genoma do *T. cruzi* é maior quando comparado ao tamanho do genoma do *T. brucei* (EL-SAYED et al., 2005). A replicação do DNA nuclear de tripanossomatídeos aparenta ser similar ao encontrado em eucariotos superiores (DANIELS et al., 2010), onde grande parte das proteínas que compõem a forquilha de replicação estão conservadas, tais como a DNA polimerases α , δ e ϵ , a proteína de replicação A (RPA), o fator de replicação C (RFC) e o antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA) (EL-SAYED et al., 2005).

O kDNA de tripanossomatídeos tem características únicas, não encontradas em outros organismos. A única mitocôndria que ocupa grande parte do volume celular, contém uma região rica em DNA, constituída por moléculas circulares de fita dupla, contém 40 a 50 maxicírculos que codificam as proteínas e RNAs necessárias a atividade mitocondrial e 5000 a 10000 minicírculos que codificam moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos dos genes do maxicírculos (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; EL-SAYED et al. 2005).

O kDNA é empacotado por quatro tipos de proteínas semelhantes as histonas, denominadas de KAP (Proteínas associadas ao Cinetoplasto) dando a forma de disco ao cinetoplasto (LIU et al., 2005). Análises do genoma dos tripanossomatídeos revelou diferenças nos mecanismos de manutenção da integridade do DNA nuclear e mitocondrial (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004 & EL-SAYED et al. 2005).

1.5. Reparo de DNA em Tripanossomatídeos

O DNA é suscetível à ação de agentes genotóxicos endógenos tais como: o metabolismo oxidativo, que resulta em moléculas reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}); processos de metilação e alquilação e de agentes exógenos, tais como: a radiação ionizante (raios X e raios γ) e luz ultravioleta (UV) (DIDERICH et al., 2011). Sendo diversas as formas de danos no DNA, varias são as vias de reparo de DNA que são usadas, tais como: limpeza do pool de nucleotídeos, a

reversão direta das modificações de base por processos como a de dimetilação por ação das fotolases ou dioxigenases, ou ainda por retirada de bases incorporadas erradamente no DNA recém-replicado pelo reparo de erro de pareamento (MMR do inglês *Mismatch Repair*), retirada de danos volumosos por meio de reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*), e retirada de bases modificadas pelo reparo por excisão de base (BER do inglês *Base Excision Repair*) (SILVA et al., 2010).

No DNA ocorrem também quebras de fita simples (SSBs do inglês *Single Strand Breaks*) e quebras de fitas duplas (DSBs do inglês *Double Strand Breaks*), pela ação de agentes genotóxicos exógenos e endógenos, que podem ser reparados por recombinação homóloga (HR do inglês *Homologous Recombination*). Apesar destes mecanismos reparem a maioria das lesões do DNA, alguns dos danos permanecem, levando a mutações ou ao bloqueio da maquinaria de replicação. DNA polimerases alternativas podem ignorar essas lesões de forma livre de erros ou propenso a erros usando um processo conhecido como síntese translesão (TLS do inglês *Translesion Synthesis*) (SILVA et al., 2010).

O sequenciamento do genoma dos tripanossomatídeos demonstrou a presença de grande parte dos genes das principais vias de reparo de DNA. Isto tem possibilitado estudos que podem levar a uma melhor compreensão dos múltiplos processos vitais desses parasitos (EL-SAYED et al. 2005; GABALDÓN et al. 2010 & SILVA et al. 2010).

1.5.1. Reparo de DNA e Lesões geradas por luz UV em Tripanossomatídeos

1.5.2. Radiação Ultravioleta

A ação de agentes genotóxicos exógenos ou fatores ambientais como a radiação ultravioleta (UV) pode causar danos à molécula de DNA. As lesões causadas pela luz UV têm grande relevância biológica, sendo que desde o começo da evolução da vida no planeta, a maioria dos organismos desenvolveram múltiplas estratégias de sobrevivência e mecanismos biológicos no sentido de minimizar os efeitos genotóxicos gerados pela radiação UV (SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; BATISTA et al. 2008; LIMA-BESSA et al. 2008; RASTOGI et al. 2010; CORTAT et al 2013; Yi & He, 2013).

A radiação UV subdivide-se em três bandas segundo o comprimento de onda, sendo a UV-A na ordem dos 320 a 400 nm, UV-B na ordem dos 280 a 320 nm e a UV-C na ordem dos 200 a 280 nm (SINHA & HÄDER, 2002; RASTOGI et al. 2010; CORTAT et

al. 2013; Yi & He, 2013). A natureza química e a formação de lesões dependem em muito da absorção dos comprimentos de onda incidente sobre a célula, onde a absorção de comprimento de ondas referentes as bandas UV-B e UV-C resultam na formação de dímeros de pirimidina *Cis – syn –* ciclobutano (CPDs) em que ocorre a formação de ligações covalentes entre os carbonos 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes, formando-se deste modo o anel ciclobutano. Outra lesão é a 6 – 4 pirimidina pirimidona (6 – 4 PPs) que são formadas por uma ligação covalente entre os carbonos 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas. Esses fotoprodutos podem gerar mutações típicas caracterizadas por transições C – T que incluem mutações CC – TT em sequencias, no DNA. Também pode ocorrer a formação de moléculas reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH[•]), peroxinitrito e oxigênio singlete (O²⁻). As espécies reativas do oxigênio estão mais associadas com o comprimento de luz UVA. Estas lesões interferem em vários processos celulares como replicação, transcrição e segregação cromossômica, o que pode levar a apoptose, parada do ciclo celular, aberrações cromossômicas e envelhecimento (FIGURA 4) (SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; LI et al. 2006; BATISTA et al. 2008; LIMA-BESSA et al. 2008; RASTOGI et al. 2010; LIU et al. 2011; DIDERICH et al. 2011; CORTAT et al. 2013; Yi & He, 2013).

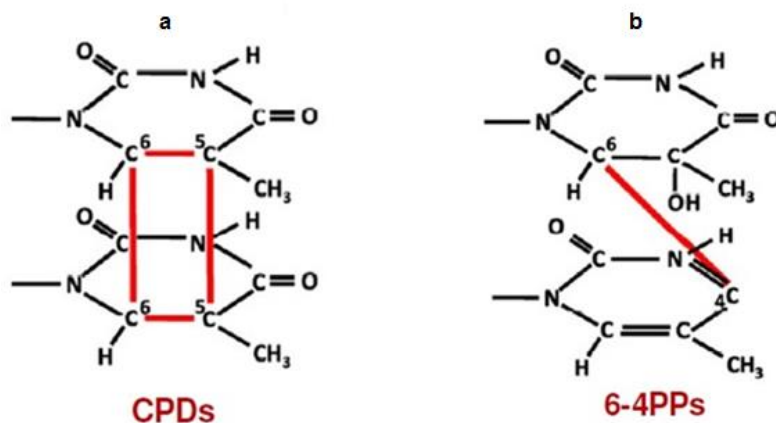


Figura 4. Lesões no DNA causadas por irradiação à luz UV. Absorção da luz UV pelo DNA com a formação de lesões do tipo (a) Dímeros de Pirimidina Ciclobutano (CPDs) formação de um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de carbono C6 e C5 de ambas as bases nitrogenadas. As (b) 6 – 4 Pirimidina Pirimidona (6 – 4 PPs) formação de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3' respectivamente. Adaptado de CORTAT *et al.*, 2013.

1.5.3. DNA Fotoliase

As DNA fotólises são enzimas que catalisam o processo de fotorreativação de dímeros de pirimidina na molécula de DNA, e podem ser conhecidas também como deoxiribodipirimidina fotolases ou enzimas fotorreativas (WITKIN, 1969; FRIEDBERG et al., 1995; KOEHLER et al. 1996; EISEN & HANAWALT, 1999; BRETTEL & BYRDIN, 2010). Elas estão largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, arqueias e células eucariotas (EISEN & HANAWALT, 1999).

DNA fotolases são flavoproteínas compostas por 450 – 550 resíduos de aminoácidos ligados covalentemente a dois cromóforos ou cofatores, compostas estruturalmente por domínio α/β na extremidade aminoterminal menos conservada e domínio α – helicoidal na extremidade carboxiterminal mais conservada, unidos por uma região ligante (SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; SANCAR, 2003; LLEDÓ & LINCH, 2009; BRETTEL & BYRDIN, 2010; LIEDVOGEL & MOURITSEN, 2010; THIAGARAJAN et al. 2011; Yi & He, 2013; YAMAMOTO et al. 2013).

O Dinucleótido de Flavina e Adenina (FAD) é o cromóforo principal e o mais comum em tipos de fotoliase e é ligado ao domínio α – helicoidal na extremidade carboxiterminal, atuando como cofator foto-catalítico (SANCAR, 2003; LLEDÓ & LINCH, 2009 & LIU et al. 2011). Ele pode existir em três estados: forma oxidada (FAD_{ox}), forma neutra ($FADH^0$) e forma aniônica reduzida ($FADH^-$) que é a mais ativa em DNA fotolases (SCHUL et al. 2002; LI et al., 2006; BRETTEL & BYRDIN, 2010; THIAGARAJAN et al. 2011; SELBY & SANCAR, 2011; Yi & He, 2013). Os cromóforos secundários podem ser divididos em dois grupos, classe folato fotolases que contém a molécula pterina meteniltetrahydrofolato (MTHF), sendo que esta classe é menos eficiente na transferência de energia absorvida. O segundo grupo é composto pela molécula deazaflavina – 8 – hidróxi – 7, 8 – didimetil – 5 deazarriboflavina (HDF) e é mais eficiente na transferência de energia absorvida. Ambas estão ligadas ao domínio α/β na extremidade aminoterminal, atuando como fotoantena (SCHUL et al. 2002; SANCAR, 2003; FRIEDBERG, 2003; BAPTISTA et al. 2008; LLEDÓ & LINCH, 2009; BRETTEL & BYRDIN, 2010; THIAGARAJAN et al. 2011; YAMAMOTO et al. 2013). As DNA fotolases são classificadas de acordo com a homologia de sequência em classe I CPD, II CPD e III CPD fotoliase, (6 – 4) fotoliase e fotoliase de fita simples (LLEDÓ & LINCH, 2009; GABALDÓN et al. 2010). Também são classificadas de acordo com especificidade do substrato, em lesões do tipo CPDs que são reparadas pela fotoliase do tipo CPDs presente em todos os reinos

incluindo vírus. As lesões do tipo 6 – 4 pirimidina pirimidona ou 6 – 4 fotoprodutos são reparadas pela fotoliase do tipo 6 – 4 fotoliase que está presente somente em eucariotas. Por fim, as lesões do tipo CPDS de fitas simples de DNA são reparadas pela fotoliase CPD de fita simples, encontrada em eubactérias, plantas e animais (FIGURA 5) (SANCAR, 2003; SELBY & SANCAR, 2006; LI et al. 2006; LLEDÓ & LINCH, 2009; GABALDÓN et al. 2010; RASTOGI et al. 2010; THIAGARAJAN et al. 2011).

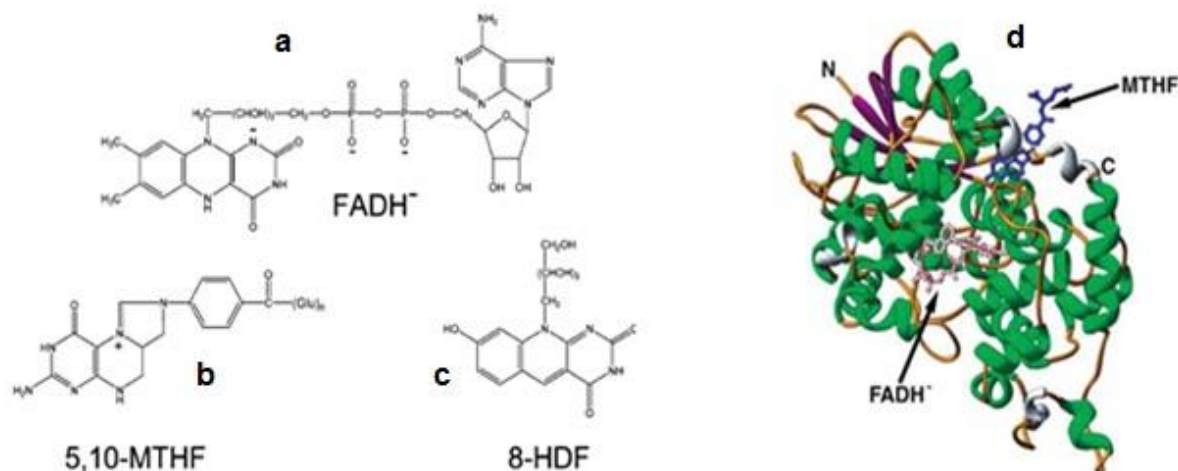


Figura 5. Cofatores da DNA fotoliase. Todas DNA fotoliasas contem o (a) cofator catalítico FADH⁻ na sua forma reduzida, Cromóforos secundários (b) MTHF e (c) HDF. (d) Cofator catalítico FADH⁻ ligado ao α – helicoidal na extremidade carboxiterminal e o cromóforo secundário MTHF ligada ao domínio α/β na extremidade aminoterminal, atuando como fotoantena. Adaptado de SANCAR, 2003.

1.6. Fotorreativação – PHR

Fotorreativação é um processo descrito pela primeira vez por Kelner e Dulbecco em 1949, como sendo uma forma de reparo de lesões induzidas por UV de maneira eficiente e direta. Caracteriza-se por ser realizada por uma única enzima, a DNA fotoliase, que remove lesões do tipo CPDs e 6 – 4 PPs, fazendo a reversão dos dímeros de pirimidina em monómeros de pirimidinas usando comprimentos de onda na ordem dos 320 – 500 nm (KOEHLER et al. 1996; EISEN & HANAWALT, 1999; SINHA & HÄDER,

2002; SANCAR, 2003; LLEDÓ & LINCH, 2009; BRETTEL & BYRDIN, 2010; RASTOGI et al. 2010; CORTAT et al. 2013; YAMAMOTO et al. 2013). As lesões do tipo CPDS são mais frequentes perfazendo cerca de 75 – 90 %, enquanto as 6 – 4 PPs correspondem a cerca de 10 – 25% e são as mais lesivas ao DNA e mais rapidamente reparadas em relação as CPDs (KOEHLER et al. 1996; SINHA & HÄDER, 2002; BRETTEL & BYRDIN, 2010; RASTOGI et al. 2010; CORTAT et al. 2013; Yi & He, 2013; YAMAMOTO et al. 2013).

A reversão direta de lesões no DNA é o mecanismo de reparo mais simples e mais eficiente, baseado em uma reação de reconhecimento da lesão e reversão da mesma.

A incidência da luz UV sobre o DNA origina a formação de fotoprodutos que distorce a dupla hélice do DNA através de ligações covalentes entre as pirimidinas adjacentes ou vizinhas, que se tornam barreiras físicas bloqueando a ação das RNA polimerases que atuam na transcrição e das DNA polimerases que atuam na replicação. As DNA fotoliasas, através do cromóforo/cofator MTHF ou HDF, absorve luz visível no comprimento de onda na ordem dos 300 – 500 nm que excita os elétrons do cromóforo/cofator catalítico FADH⁺, resultando num ^{*}FADH⁺ instável que transfere o elétron excitado para a ligação covalente entre dímeros de pirimidinas adjacentes ou vizinhas, convertendo-as em sua forma nativa, monómeros de pirimidina. Por sua vez o FADH⁺ é regenerado pelo elétron recebido a partir da conversão do dímero de pirimidina a monómeros de pirimidina. Deste modo, o reparo é energeticamente favorável já que não ocorre perda de elétrons pelos cofatores e não ocorre a excisão do DNA (FIGURA 6) (SANCAR, 1994; FRIEDBERG et al. 1995; KOEHLER et al. 1996; EISEN & HANAWALT, 1999; SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; FRIEDBERG, 2003; SANCAR, 2003; LLEDÓ & LINCH, 2009; BRETTEL & BYRDIN, 2010; DIDERICH et al. 2011; Yi & He, 2013; YAMAMOTO et al. 2013).

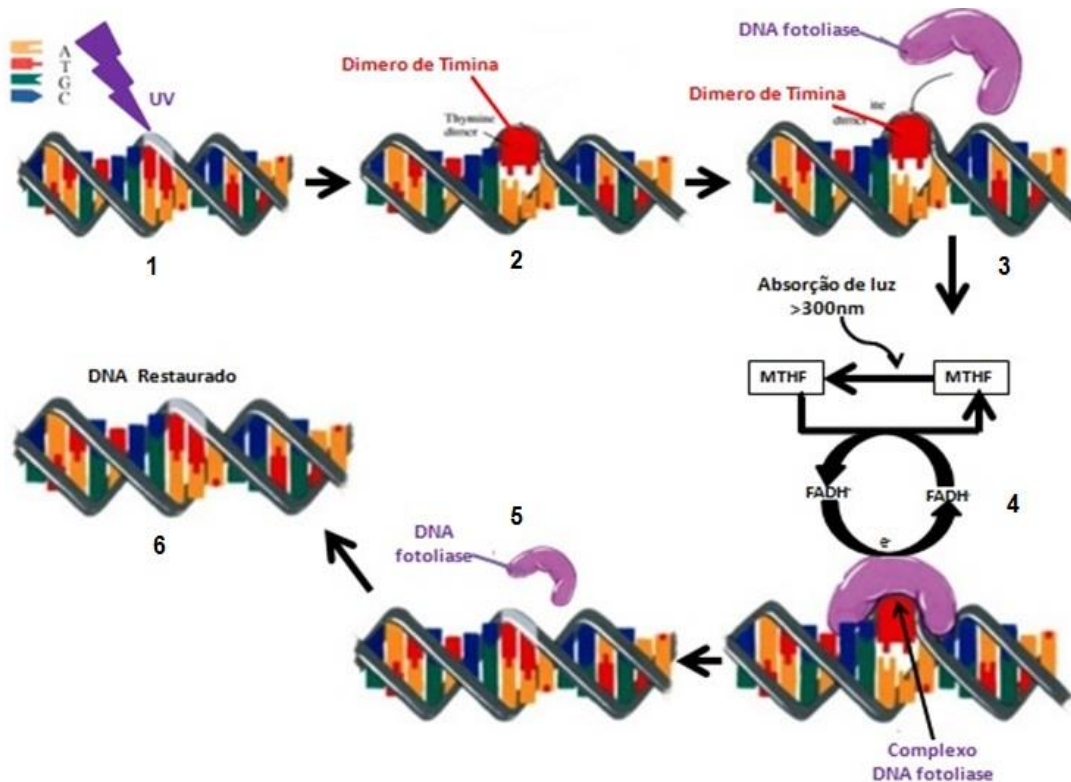


Figura 6. Mecanismo da PHR. Passos da fotorreativação (1) incidência da luz UV sobre o DNA; (2) formação do dímero de timina; (3) reconhecimento e ligação da DNA fotoliase a lesão, no escuro, com alta afinidade e especificidade; (4) ativação da DNA fotoliase por fóton de luz pelo cromóforo foto antena: um fóton de luz azul (300-500nm) e absorvido pelo MTHF; a energia da excitação passa para o FADH⁻ sitio ativo, a Flavina excitada FADH⁻ doa um elétron para o dímero de pirimidinas gerando um dímero radical instável, ocorrendo um rearranjo de elétrons restaurando as pirimidinas monoméricas e o elétron e transferido de volta ao radical Flavina para regenerar FADH⁻; (5) restauração do DNA com a reversão da lesão e liberação da DNA fotoliase; (6) DNA restaurado na forma nativa. Adaptado de RASTOGI *et al.*, 2010.

1.7. Reparo por Excisão de Nucleotídeos – NER

Depois da descoberta da fotorreativação, reparo em presença de luz, nos anos 40 por Kelner, diversos grupos de pesquisa nos anos 60, tal como o de Hanawalt, dedicaram-se ao estudo de reparo em ausência de luz, onde demonstraram a ocorrência de síntese de DNA nas células após lesões causadas por agentes genotóxicos exógenos como a luz UV. O processo ficou conhecido por *dark - repair* ou reparo por excisão de nucleótidos (EISEN & HANAWALT, 1999; SCHUL et al. 2002; LIMA-BESSA et al. 2008; RASTOGI et al. 2010; VROUWE et al. 2010; DIDERICH et al. 2011).

O reparo por excisão de nucleotídeos detecta a presença de distorções estruturais na dupla hélice causadas por adutos volumosos ou *crosslinks* gerados por agentes genotóxicos exógenos, como a luz UV. Após a identificação da fita danificada, a área da lesão é excisada e resintetizada por DNA polimerases e posteriormente religadas (NOUSPIKEL, 2009). O princípio bioquímico geral do reparo por excisão de nucleotídeos é muito conservado desde bactérias até humanos. Em eucariotos, é verificada a existência de sete genes (XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF e XPG) responsáveis pela sensibilidade à luz UV e cujas mutações causam anomalias conhecidas por *Xeroderma Pigmentosum* (XP). A *Síndrome Cockayne* (CS) é causada pelo defeito dos genes CSA e CSB (SCHUL et al. 2002; LIMA-BESSA et al. 2008; NEWMAN et al. 2008; VROUWE et al. 2010; DIDERICH et al. 2011). No processo do NER, os genes XP e CS desempenham várias funções no reconhecimento do dano e na incisão do DNA lesado, envolvendo a ação de 30 proteínas atuando em cinco passos consecutivos (SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; CORTAT et al. 2013): o reconhecimento da lesão; abertura da dupla hélice do DNA onde se localiza a lesão; dupla incisão nas extremidades dessa lesão; síntese de nova fita de DNA usando como molde a fita não danificada; ligação da porção 5' da nova fita sintetizada. O NER é subdividido em duas sub-vias: o reparo do genoma global (GGR) e o reparo acoplado à transcrição (TCR). No GGR o reconhecimento da lesão e o recrutamento das proteínas envolvidas no reparo são realizados pelos complexos proteicos XPC-HR23B e UV-DDB/XPE (DDB-*Damage DNA Binding* - proteína de ligação ao DNA lesado). No TCR, a lesão no DNA faz com que haja a parada da RNA polimerase II durante a transcrição, o que funciona como sinal de reconhecimento do dano. São requeridas as proteínas CSA e CSB para o deslocamento da polimerase parada, permitindo o acesso da maquinaria de reparo ao local da lesão (FIGURA 7) (DIDERICH et al., 2011).

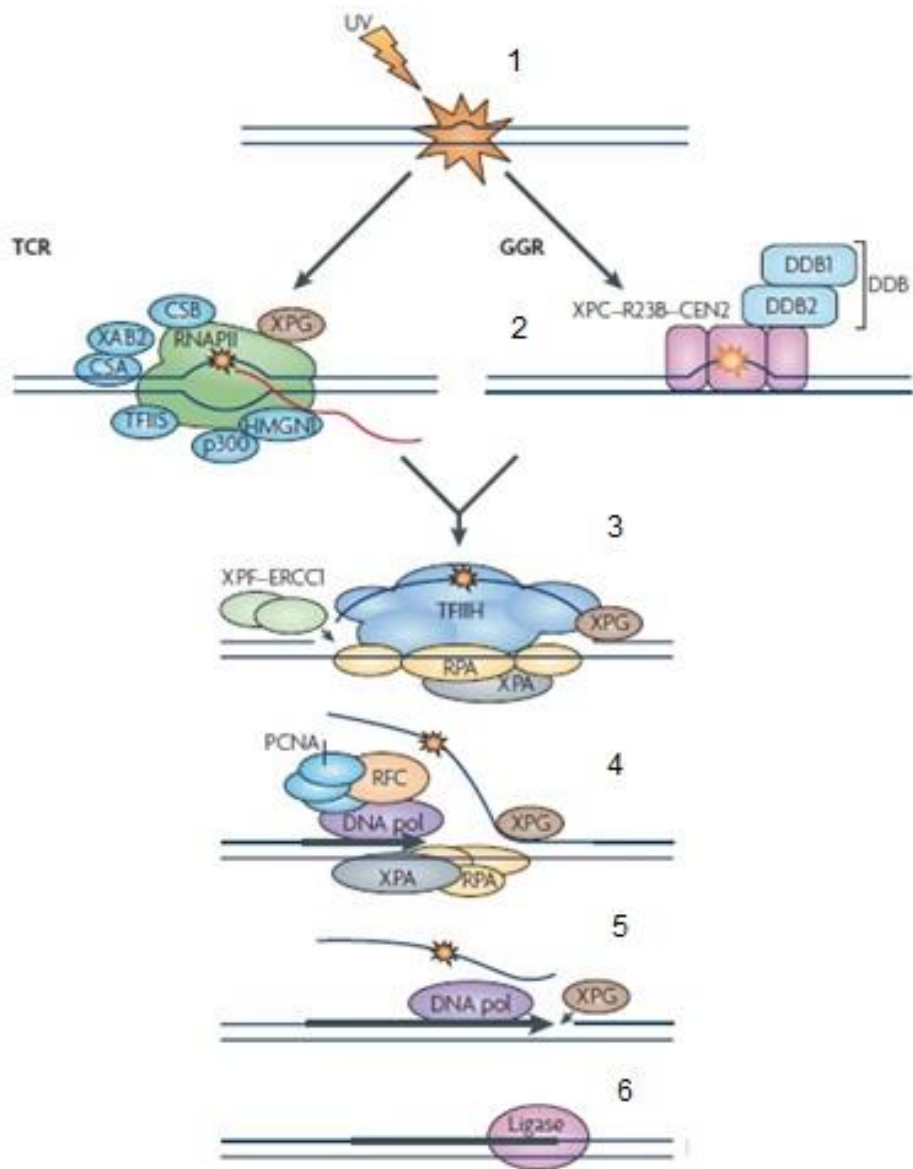


Figura 7. Mecanismo do NER. Lesões do genoma global são reparadas pelo GGR e as lesões da fita transcrita de um gene são reparadas pelo TCR, pelos seguintes passos **(1)** o reconhecimento da lesão; **(2)** abertura da dupla hélice do DNA onde se localiza a lesão; **(3)** dupla incisão nas extremidades dessa lesão; **(4)** síntese de nova fita de DNA usando como molde a fita não danificada; **(5)** ligação da porção 5' da nova fita sintetizada a sequência original; **(6)** restauração do DNA na forma nativa. Adaptado de DIDERICH *et al.*, 2011.

Ambas sub-vias tem estágios subsequentes semelhantes, onde ocorre a formação do complexo de relaxamento do DNA ao redor da lesão pelo fator de transcrição TF_{II}H composto por helicases XPB e XPD, complexo RPA-XPA que estabilizam as proteínas no local da lesão. Segue-se, então, a excisão da região do DNA lesado pelas endonucleases específicas ERCC1/XPF e XPG que fazem a incisão a 5' e 3', respectivamente. A ressíntese do DNA tem início e é feita pela ação dos fatores de replicação RPA, RFC, PCNA, ligases I e II, DNA polimerases δ e ϵ que sintetizam o novo fragmento de DNA tendo como molde a fita complementar intacta do DNA, preenchendo assim a região lesada e excisada do DNA, assim restabelecendo a integridade do DNA (SCHUL et al. 2002; SINHA & HÄDER, 2002; LIMA-BESSA et al. 2008; VROUWE et al. 2010; DIDERICH et al. 2011).

A via de NER é 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 (EL-SAYED et al. 2005; SILVA et al. 2010). Ao compararmos a via de NER dos tripanossomatídeos com a de outros organismos, observamos a ausência de homólogos 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. Outra diferença perceptível é a ausência do complexo CAK em TF_{II}H, 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 TF_{II}H é um passo crítico para o recrutamento de XPF/ERCC1 e XPG ao sítio da lesão (COIN et al., 2008).

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 proteínas, estão organizados em unidades policistrônicas, as quais não apresentam sequências típicas presentes em 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). Em consequência da ausência de promotores para RNA pol II, a transcrição desses policistrôns ocorre de

forma constitutiva ao longo de todo o genoma (SIEGEL et al., 2009). Esse modo de organização genica parece ser único entre protozoários da família Trypanosomatidae.

Estudos feitos em *T. cruzi* analisando a superexpressão da DNA polimerase η (Pol η), proteína envolvida na síntese translesão de dímeros de pirimidina, observou-se que Pol η não confere proteção contra a luz UV (MOURA et al., 2009). Os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, analisando a resposta à luz UV, cinética de reparo do DNA nuclear e mitocondrial de *T. cruzi*, expostos a uma dose de 1500 J/m^2 de radiação UV, e deixados em recuperação por até 24 horas mostrou que as lesões na mitocôndria foram parcialmente reparadas pelo *T. cruzi*, uma vez que este possui o gene da fotoliase mitocondrial envolvido no reparo a fotolesões. Curiosamente, diferente do que é visto para a mitocôndria, não se verifica o reparo de lesões causadas por luz UV no genoma nuclear, como o genoma do *T. cruzi* não possui o homólogo do gene da fotoliase nuclear, seria esperado que o reparo de lesões induzidas por UV refletisse a ação do NER. (FIGURA 8).

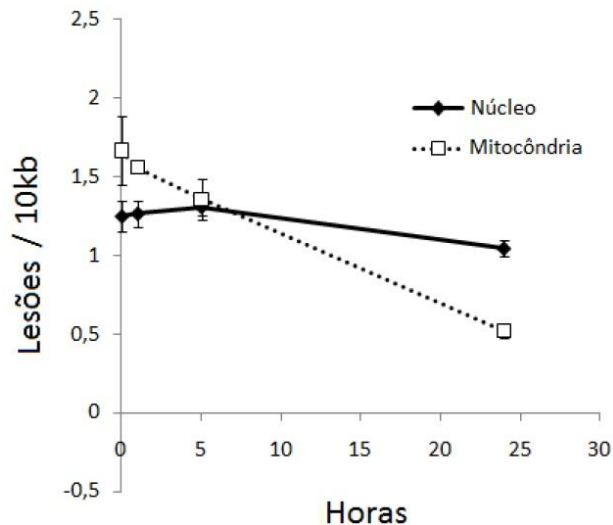


Figura 8. Reparo de lesões causadas por UV em *T. cruzi*. Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial, após tratamento com 1500 J/m^2 de radiação UV. Em *T. cruzi* não ocorre o reparo de lesões no DNA nuclear e as lesões no DNA mitocondrial foram parcialmente reparadas, visto que, o genoma do *T. cruzi* não codifica nenhum homólogo da fotoliase (RAJÃO, Tese de Doutorado; Figura 2.16c do capítulo 2).

Em estudos subsequentes feitos pelo nosso grupo de pesquisa, analisando a resposta a luz UV mostrou-se que células deficientes no gene CSB (heminocaute), responsável pelo reconhecimento da RNA polimerase parada em frente da lesão são mais sensíveis à exposição à luz UV, mesmo que essas lesões não sejam removidas (FIGURA 9).

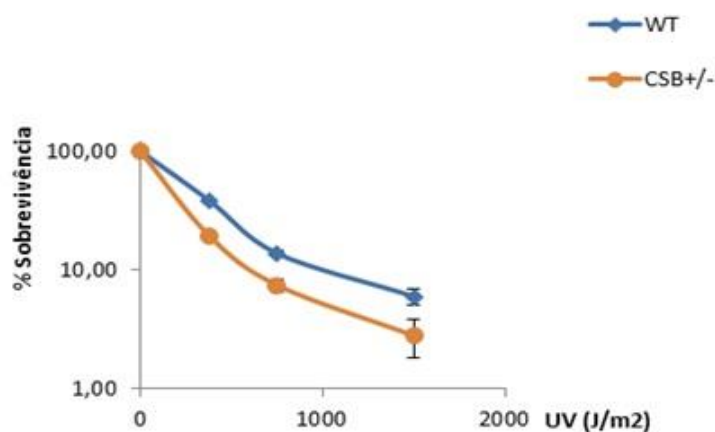


Figura 9. Reparo de lesões causadas por UV em *T. cruzi* CSB+/-. Ao nocautear um dos genes do CSB de *T. cruzi* e expostos a doses de 500, 700, e 1500 J/m² de radiação faz com que o *T. cruzi* seja mais sensível à luz UV e em relação selvagem WT (MENDES, dados não publicados).

1.8. Gene da Fotoliase em Tripanossomatídeos

O gene da fotoliase pode ser encontrado em bactérias, arqueias e eucariotas, realizando diversas funções nos organismos desses reinos. No geral, os tripanossomatídeos possuem duas cópias do gene da fotoliase, podendo-se encontrar a fotoliase nuclear e a fotoliase mitocondrial que foram provavelmente usadas no processo de reparo a luz UV durante a evolução destes (NARE et al., 2009; GABALDON et al., 2010).

A análise filogenética feita por LLEDO & LYNCH em 2009 revelou que os tripanossomatídeos possuem o gene da fotoliase diferente dos demais genes da fotoliase das outras famílias, e a análise da sequência de aminoácidos da fotoliase mitocondrial de *T. brucei*, *L. major* e *T. cruzi*, feitos por HUANG et al., (2006) e NARE et al., (2009) mostrou que o gene da fotoliase mitocondrial de *T. brucei* e *L. major* apresentam

características semelhantes a CPD fotoliase classe I e o gene da fotoliase mitocondrial do *T. cruzi* apresenta características semelhantes a fotoliase 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. Análise da sequência de aminoácidos da fotoliase nuclear dos *T. brucei* e *L. major* apresentam características semelhantes à criptocromos DASH e no *T. cruzi* apresenta-se sob a forma de pseudogene não possuindo função de reparo (FIGURA 10)

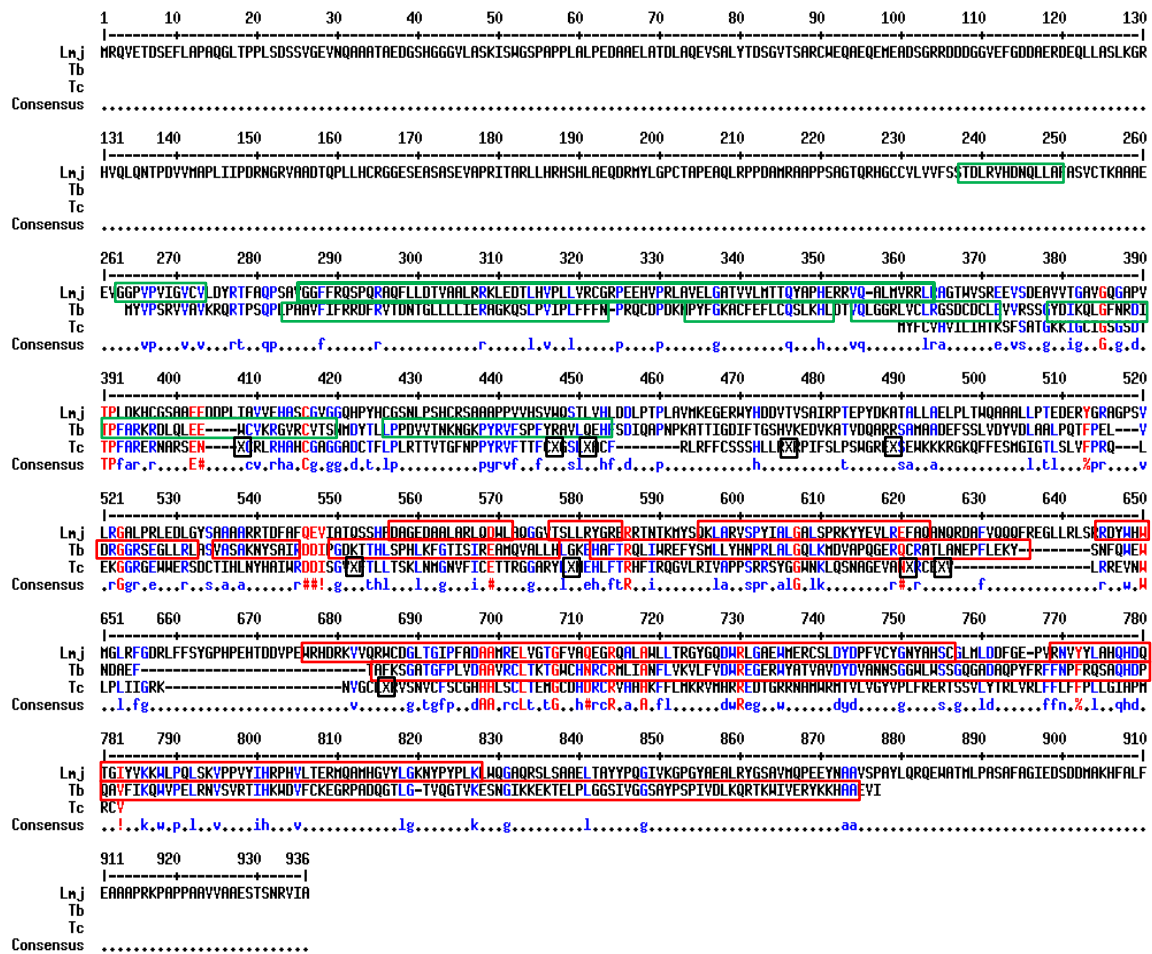


Figura 10. Alinhamento de sequencias de aminoácidos da fotoliase nuclear dos *Tripanossomatídeos*. Regiões conservadas de domínio FAD α – helicoidal na extremidade carboxiterminal (retângulos vermelhos) e DNA fotoliase (retângulos verdes), e stop códon (retângulos pretos) Lmj - *Leishmania major*, Tb - *Trypanosoma brucei* e Tc - *Trypanosoma cruzi* o gene da fotoliase nuclear sob forma de um pseudogene sem função de reparo.

Os criptocromos DASH provavelmente descendem das DNA fotoliasas, uma vez que são capazes de atuar na defesa a radiação UV e como fotorreceptores. Os criptocromos DASH de plantas são mais similares e próximas as CPDs fotoliasa enquanto que os criptocromos DASH em animais são similares e mais próximas a 6 – 4 fotoliasas (BRUDLER et al., 2003; LIEDVOGEL & MOURITSEN, 2009). Também mostraram que criptocromos DASH funcionam como reguladores de transcrição no reparo específico a lesões CPDs no DNA de fita simples (POKORNY et al 2008). Os criptocromos DASH apresentam algumas características semelhantes as CPDs fotoliasa de classe I, (i) ligam-se ao substrato com alta afinidade; (ii) reagem de forma rápida e eficiente devido a posição específica dos cofatores; (iii) baixa afinidade ao produto da reação (POKORNY et al 2008). Estudos feitos por SELBY & SANCAR (2011) mostraram que a diferença entre os criptocromos DASH e as CPDs fotoliasas de classe I, reside na capacidade dos criptocromos DASH repararem somente lesões UV no DNA de fita simples, e segundo POKORNY *et al.*, (2008) os criptocromos DASH tem a capacidade de reconhecer a lesão UV no DNA de fita dupla, pois todos os resíduos essenciais para o contato com a lesão assim como os cofatores estão conservados, mas os criptocromos DASH perderam a capacidade de revirar a lesão devida a interrupção da ligação do hidrogênio na fita dupla.

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 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*, um cinetoplastídeo de vida livre, representante do táxon mais próximo ao grupo dos tripanossomatídeos (SIMPSON et al., 2006).

Segundo BAER *et al.*, (2007), as taxas de mutação do genoma entre as espécies variam entre as gerações e a capacidade de reparo a lesões no DNA é um dos fatores que explicam a taxa de evolução molecular. A ausência do gene da fotoliasa em algumas espécies afeta o processo de replicação e de reparo do DNA, visto que estes influenciam a taxa de mutação espontânea em uma ampla gama de organismos expostos à luz solar (LLEDO & LYNCH, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Verificar se a expressão heteróloga da fotoliase nuclear de *T. brucei* em *T. cruzi* é funcional e entender por que o *T. cruzi* perdeu esse gene.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar o que ocorre com uma célula de *T. cruzi* que superexpressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei*;
- Superexpressar o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* no *T. cruzi* heminocaute para o gene CSB e estudar os fenótipos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Alinhamento de sequências

As sequências de aminoácidos da fotoliase nuclear de *L. major*, *T. brucei* e de todas as cepas CL Brener de *T. cruzi* foram localizadas na base de dados (<http://tritrypdb.org>), a tradução das sequências das cepas CL Brener de *T. cruzi* (pseudogene) foi realizada com o uso do programa *orf finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>). As sequências de aminoácidos da fotoliase nuclear foram alinhadas mediante o uso do programa *multialign* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e os domínios FAD E DNA fotoliasas foram localizados mediante o uso do programa *pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

3.2. Extração de DNA genômico de *Trypanosoma brucei*

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 *Trypanosoma brucei*.

3.3. Iniciadores

Os iniciadores utilizados para amplificar o gene investigado foram sintetizados pela companhia *Integrated DNA Technologies* (IDT) e estão representados na Tabela 1. A sequência do gene fotoliase nuclear de *Trypanosoma brucei* foi localizada na base de dados (<http://tritrypdb.org>) e os iniciadores desenhados a partir de sequências do clone *Trypanosoma brucei* TREU927, no cromossoma 10 da base 2,711,696 a 2,713,402. Todos iniciadores foram diluídos em água mili Q e estocados em alíquotas na concentração de 200 µM.

Tabela 1. Iniciadores utilizados

<u>Iniciador</u>	<u>Sequencia*</u>	<u>Finalidade</u>
Foto1 <i>Xba</i> F	5' - <u>TCTAGA</u> ATG TAC GTA CCG AGT CGT GT - 3'	Superexpressão
Foto1RpRock <i>Sal</i> I	5' - <u>GTCGAC</u> CTA AAT CAC CTC TGC TGC ATG - 3'	Superexpressão

*Os sítios de restrição presentes nos iniciadores estão sublinhados

3.3.1. Amplificação por PCR para Clonagem

O fragmento de DNA codificador da fotoliase foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) a partir de DNA genómico de *Trypanosoma brucei* utilizando-se iniciadores descritos na tabela 1, os quais possuem sítios para as enzimas de restrição *Xba*I e *Sal*I.

A amplificação foi feita por PCR em volume final de 20 µL, contendo 0,5 µM dos iniciadores *Foto1 Xba forward* e *Foto1 pRock Sal I reverse*, 200 µM de cada dNTP e 0,2 unidade de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B (Tris-HCl 10 mM pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM). No tubo da PCR foi adicionado 1 ng de DNA genómico. A reação foi realizada em termociclador de acordo com o seguinte programa:

- Primeira desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de:
- desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
- anelamento dos iniciadores a 55 °C por 1 minuto;
- extensão a 72 °C por 1 minuto;
- extensão final a 72 °C por 10 minutos;
- fim da reação a 4 °C.

Após a reação da PCR, 10 µL dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (Tris base 40 mM pH 7,2, acetato de sódio 20 mM, sal tetrassódico de etilenodiaminatetracético (EDTA) 1 mM). A eletroforese foi realizada a 60 V por 40 minutos. Os fragmentos amplificados foram corados por exposição do gel a uma solução de brometo de etídio (10 µg/mL) por 15 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta de ondas curtas.

3.3.2. Clonagem

Confirmada a amplificação do fragmento mediante a comparação com um padrão de peso molecular de DNA de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder), nos restantes 10 µL, uma

alíquota de 3 µL do produto de PCR foram ligados a 1 µL de vetor *pGEM[®]-T Easy*, 5 µL do tampão T₄ DNA ligase, 1 µL de T₄ ligase. O vetor *pGEM[®]-T Easy*, possui gene de resistência a ampicilina para a seleção em bactérias, além de um sítio múltiplo de clonagem. Essa região permite a ligação do fragmento de DNA em uma região contendo sítios para diversas enzimas de restrição flanqueando o fragmento de interesse. As reações de clonagem ocorreram a 4°C, por 16 horas, todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante (Promega).

3.3.3. Transformação de Bactérias

O plasmídeo gerado pGEM - Fotoliase foi usado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes. Na transformação, as células incubadas com o plasmídeo foram submetidas a uma descarga elétrica de 3400 volts por 2,5 milisegundos em eletroporador (BioRad). Em seguida foram, adicionados 500 µL de meio 2xYT líquido (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura e 0,5 % NaCl) e as células foram incubadas por 45 minutos a 37 °C sob agitação (180 rpm). Uma alíquota das células transformadas foi plaqueada em placas de cultura contendo 2xYT ágar (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl e 1,5 % de ágar) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

3.3.4. PCR de colônia de bactérias transformadas

As colônias de bactérias *E.coli* DH5α transformadas foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto através de PCR de colônias. Os clones selecionados foram isolados direto da placa, utilizando-se um palito estéril e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR, cada reação continha em volume final de 10µL, contendo 0,2 µM dos iniciadores *Foto1 Xba forward* e *Foto1 pRock Sal I reverse*, 200 µM de cada dNTP e 0,1 unidade de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) em tampão de reação 1B (Tris-HCl 10 mM pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM). Foi também realizado um controle negativo (sem adição de DNA). As reações foram realizadas em termociclador utilizando o mesmo programa já descrito anteriormente. Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com

brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular.

3.3.5. Preparação do DNA plasmidal em pequena escala (Mini-Prep)

Para obtenção do DNA plasmidal foram selecionados três clones, os quais foram inoculados em tubos contendo 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A incubação foi feita por 16 horas a 37 °C sob agitação a 180 rpm. Os DNAs plasmidiais foram então purificados utilizando-se o *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit*, #K0502, #K0503 conforme especificação do fabricante e dosados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA).

3.3.6. Digestão com Enzimas de Restrição

O plasmídeo recombinante pGEM-Fotoliase foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Sal* I (Promega) para liberar o fragmento Fotoliase, e o vetor pROCK-GFP-HIGRO foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I para retirar o fragmento GFP deixando as extremidades para a ligação a *orf* de Fotoliase. As condições de digestão foram iguais para os dois vetores, sendo utilizados aproximadamente 2 µg de DNA dos vetores. As digestões foram feitas em tampão de digestão apropriado para cada enzima, na concentração especificada pelo fabricante, com 1 µL de cada enzima e BSA 1 µg/µL. As reações foram incubadas a 37 °C durante a noite.

As digestões do vetor de pGEM-Fotoliase e do vetor pROCK-GFP-HIGRO foram visualizadas em gel de agarose 1% em tampão TAE, corado com brometo de etídio, utilizando-se, para comparação, os vetores pGEM-Fotoliase e do vetor pROCK-GFP-HIGRO não digeridos.

3.3.7. Purificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose

Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio. O fragmento de interesse de 1700 pb (Fotoliase) proveniente do pGEM-Fotoliase e o vetor pROCK digerido (8000 pb) foram

puncionados do gel e purificados utilizando-se o *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, conforme especificação do fabricante, sendo então, ressuspendidos em um volume final de 40 µL de água MiliQ autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

3.3.8. Ligação dos fragmentos de DNA

Após a digestão com as enzimas de restrição apropriadas e a purificação em gel de agarose 1%, o fragmento de DNA codificador da Fotoliase foi ligado ao vetor pROCK obedecendo-se a razão molar fragmento/vetor igual a 3:1; conforme a equação 1:

Equação 1. Razão molar fragmento/vetor

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

A ligação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 6 unidades de T4 DNA ligase (GE Healthcare) em tampão de ligação. Foram utilizados aproximadamente 50 ng de vetor e aproximadamente 1,8 µg do fragmento para a ligação. A reação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

O plasmídeo gerado (pROCK-Fotoliase) foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes. O protocolo para a transformação, a PCR de colônias e a *miniprep* foram realizados conforme descrito no item 3.2.3. A confirmação da clonagem da *orf* da Fotoliase no vetor de expressão pROCK foi realizada através de digestão com as enzimas de restrição *Xba* I e *Sal* I, seguindo mesmo protocolo descrito anteriormente.

3.3.9. Preparação do DNA plasmidal em larga escala (Maxi-Prep)

Após a confirmação da digestão, foi realizada a extração do plasmídeo recombinante pROCK-Fotoliase em larga escala com o kit *GenElute™ HP Plasmid Maxiprep* (Sigma-Aldrich) e cerca de 1 mg do plasmídeo de interesse foi obtido em alto grau de pureza a partir de 500 mL de cultura de bactérias em fase estacionária, sedimentadas por 10 min de centrifugação a 5 000 g, seguindo as determinações do kit.

3.4. Obtenção de cepa CL Brener *T. cruzi* modificada

3.4.1. Transfecção e seleção dos parasitos da cepa CL Brener *T. cruzi*

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha *et al.*, (2004). Como preparação para a etapa de transfecção, 100 µg do vetor pROCK-Fotoliase foi linearizado com a enzima de restrição *Not* I, precipitados com isopropanol e solubilizados em 50 µL de água *milli Q* estéril. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram lavados e ressuspensos em tampão de eletroporação (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8,0, e 5 mM MgCl₂) a uma concentração final de 1 x 10⁸ células/mL. Em uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser* de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução de DNA de interesse. Em seguida foi aplicado o campo eletromagnético de dois pulsos de 0,3 kV e 500 µF, intervalados por 30 segundos. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT (5g *Liver Digest Neutralized*, 4g NaCl, 5g Bacto Tryptose, 0,4g KCl, 8,0g Na₂HPO₄, 2,0g de Dextrose, 10mL Hemin 0.2%, pH 7,3, 900 mL de H₂O MillQ) contendo 10% de soro fetal bovino inativado (LIT completo) onde sofreram seleção, por cerca de 6 semanas, através do cultivo na presença de 200 µg/mL de Higromicina.

3.4.2. Transfecção e seleção dos parasitos de *T. cruzi* heminocaute para o gene CSB

A transfecção do vetor pROCK-Fotoliase em epimastigotas de *T. cruzi* heminocaute para o gene CSB foi realizada por eletroporação, de acordo com passo acima descrito. As células foram então transferidas para garrafas de cultura contendo 5 mL de meio LIT completo onde sofreram seleção por cerca de 6 semanas, através do cultivo na presença de 200 µg/mL de Higromicina/Neomicina.

3.5. Extração de RNA e ensaio de RT-PCR

O RNA total de parasitos epimastigotas das cepas Fotoliase e Fotoliase-CSB +/- foi extraído utilizando o reagente *TRIZOL*[®] (Invitrogen). Para cada extração foram

utilizados 2×10^8 células de *T. cruzi* epimastigotas em fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 3000 g por 10 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lisadas pela adição de 1 mL de TRizol e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Ao lisado de células formado adicionou-se 200 µL de clorofórmio seguido de mais 3 min de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4 °C para separação da fase aquosa. À esta fase aquosa incolor separada adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico e a mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o RNA foi precipitado por centrifugação a 12000 g por 10 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (7500 g, 5 min, 4 °C). Após a secagem do precipitado, o RNA foi ressuscitado em 60 µL de H₂O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e dosado em *NanoDrop*. A integridade do RNA extraído foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído e corado com brometo de etídeo. A fim de garantir uma boa qualidade dos RNAs a serem utilizados nos experimentos de RT-PCR, as amostras foram tratadas com DNase (Ambion – cat: AM 1906) e em seguida purificadas com auxílio do kit *RNeasy MiniElute™ Cleanup* (Qiagen). Foram tratados 45 µg de RNA para cada amostra seguindo recomendações dos fabricantes da enzima DNase e do kit. As amostras de RNA livres de impurezas e contaminantes foram quantificadas novamente no *NanoDrop* e visualizadas em gel de agarose 1,2% desnaturante. Finalmente, o cDNA foi sintetizado a partir dos RNAs totais de *T. cruzi* usando o kit *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada uma reação de controle negativo para cada amostra de cDNA sintetizado, contendo todos os reagentes utilizados no kit, o RNA total, mas sem a enzima transcriptase reversa.

A reação de PCR para avaliar a expressão do gene Fotoliase procedeu-se em seguida, utilizando-se 5 pMol dos iniciadores Foto1 *Xba* I F 5' - TCTAGA ATG TAC GTA CCG AGT CGT GT - 3' e Foto1RpRock *Sa*I I 5' - GTCGAC CTA AAT CAC CTC TGC TGC ATG - 3'. O programa de PCR seguido foi o mesmo descrito no item 3.2.1.

3.6. Curva de sobrevivência a luz UV

Culturas epimastigotas de *T. cruzi* selvagem, *T. cruzi* superexpressora de fotoliase nuclear do *T. brucei* e *T. cruzi* CSB+/- superexpressora de fotoliase nuclear do *T. brucei* foram crescidas em meio LIT em sua fase exponencial de crescimento. Após a

determinação da densidade de parasitos por contagem em câmara de Neubauer, o meio contendo parasitos foi diluído para uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL. O tratamento com radiação UV foi feito irradiando uma placa de Petri devidamente identificada, contendo 5 mL de parasitos em meio de cultura LIT. A irradiação foi feita em um UV *Crosslinker* (FisherBiotech) previamente esterilizado. As células foram irradiadas com $500 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ de UVC, e os controles foram realizados na ausência de luz UV garantindo 100% de sobrevivência. Após a exposição a luz UV, as culturas foram distribuídas em placas de 24 poços devidamente identificados, cada poço apresentava inicialmente 1 mL de cultura à densidade de 1×10^7 células/mL, e deixadas para recuperar em presença de luz branca nos tempos 1, 10 e 60 minutos e na ausência de luz branca (escuro). Após esse período de tratamento com luz branca, as culturas foram incubadas a 28°C , as placas eram mantidas vedadas durante o período de incubação 6 e 24 horas depois do tratamento, a sobrevivência das culturas foi determinada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer, na presença do corante vital eritrosina. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das culturas controle não tratadas crescidas sob as mesmas condições, a média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

3.7. Análise Estatística

Nos experimentos de curva de sobrevivência, os gráficos foram gerados utilizando as médias e desvio padrão, e as análises estatísticas foram feitas com o teste de Kruskal-Wallis de análise de variância simples (One Way ANOVA), utilizando o programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Como descrito na Introdução, o sequenciamento de cepas CL Brener *T. cruzi* revelou que o gene da fotoliase nuclear, esta presente como um pseudogene. Para verificarmos se isso poderia ser um erro de anotação, nós alinhámos a sequência da fotoliase de outras cepas de *T. cruzi*. Como pode ser visto na figura 11, a tradução da sequência revela a presença de vários stop códons (representados por um “x” na sequência) em todas as cepas o que sugere que o gene da fotoliase já era um pseudogene no ancestral do *T. cruzi*. No mesmo alinhamento da sequência do pseudogene do *T. cruzi*, verifica-se também que entre as demais cepas do *T. cruzi* não existem regiões de domínios FAD, MTHF e HDF, o que sugere que o pseudogene de *T. cruzi* não possui atividade fotoliase.

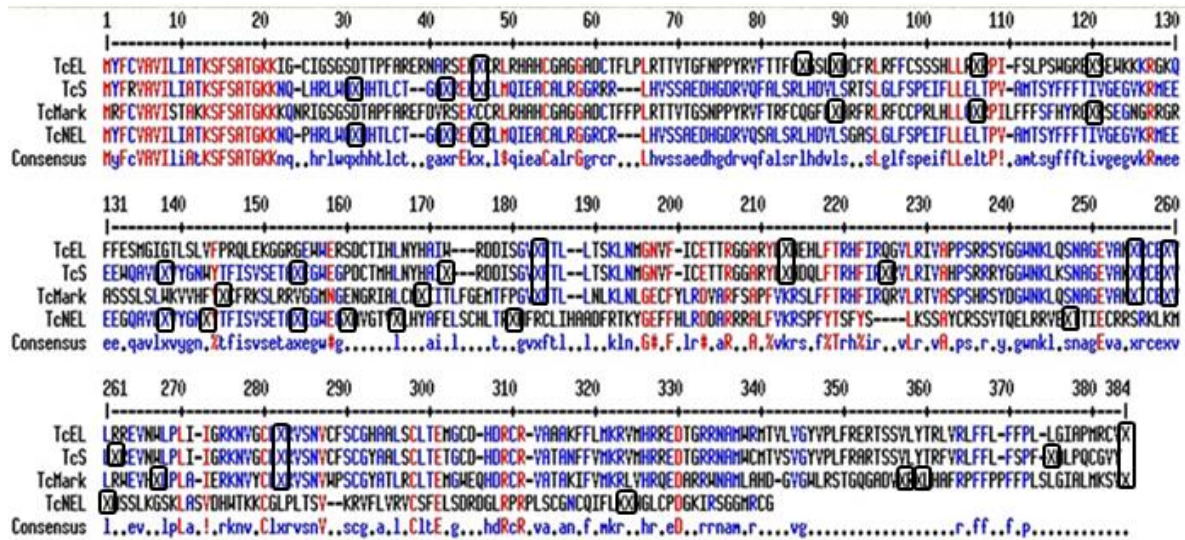


Figura 11. Pseudogene da fotoliase nuclear do *T. cruzi*. Similaridade entre os ortólogos do pseudogene da fotoliase nuclear em *Trypanosoma cruzi*, estes não apresentam domínios de domínio FAD α – helicoidal na extremidade carboxiterminal e DNA fotoliase, apresentam vários stop códons representados por um “x” na sequência (em retângulos pretos) ao longo das suas sequências. **TCEL** - *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like; **TcS**- *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1; **TcMark** – *Trypanosoma cruzi* Marinkellei; **TcNEL** – *Trypanosoma cruzi* CL Brener não Esmeraldo-like.

O Projeto Genoma do *T. brucei* revelou que este organismo possui duas cópias do gene da fotoliase (BERRIMAN et al. 2005; EL-SAYED et al. 2005). Visando investigar o papel de fotoliase no *T. cruzi*, nós decidimos estudar uma das cópias deste gene (<http://www.tritrypdb.org>, no de acesso *T. brucei* TREU927 protein coding gene on Tb927_10_v5.1 from 2,711,216 to 2,713,413 (*Chromosome: 10*). Este gene corresponde a fotoliase nuclear e tem similaridade com o pseudogene da fotoliase presente no *T. cruzi*. O fragmento de DNA codificador da fotoliase foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *T. brucei* utilizando-se iniciadores descritos na tabela 1, esta amplificação gerou um fragmento com o peso molecular esperado de 1700 pb (FIGURA 12).

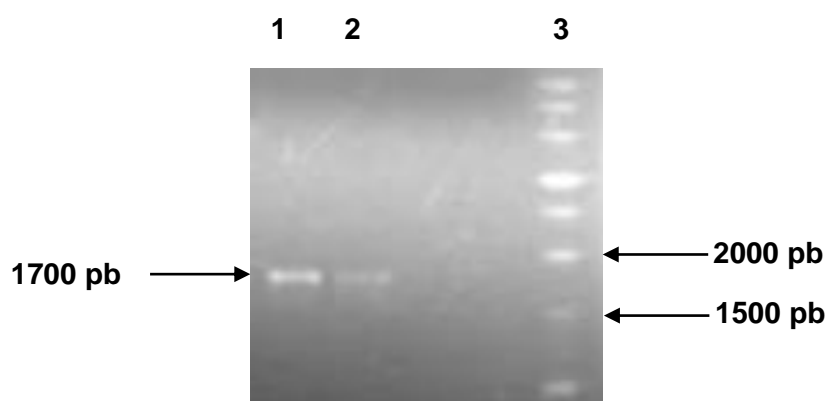


Figura 12. Amplificação por PCR do gene nuclear da fotoliase do *T. brucei*. (1 e 2) Fotoliase nuclear de *T. brucei* com um fragmento com peso molecular esperado de 1700 pb, (2) padrão de peso molecular de DNA 100 kb *Plus DNA Ladder*.

Confirmada a amplificação do fragmento mediante a comparação com um padrão de peso molecular de DNA de 100 Kb (100 Kb Plus DNA Ladder), 3 μ L do produto de PCR foram ligados a 1 μ L de vetor *pGEM*. O plasmídeo gerado *pGEM-Fotoliase* foi usado na transformação de *E. coli* DH5 α eletrocompetente. Colônias de *E. coli* DH5 α transformadas foram então escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto através de PCR de colônias (FIGURA 13). Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação ao padrão de peso molecular 1kb *DNA ladder*. Apenas uma colônia mostrou a presença do clone de interesse e a mesma foi utilizada em experimentos posteriores.



Figura 13. PCR de colônia do gene nuclear da fotoliase de *T. brucei* no pGEM. (1 a 10) PCR de colônia de bactérias transformadas com o plasmídeo pGEM, (11) padrão de peso molecular de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder*.

O plasmídeo recombinante pGEM-Fotoliase foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Sal* I (Promega) para liberar o fragmento Fotoliase (FIGURA 14).

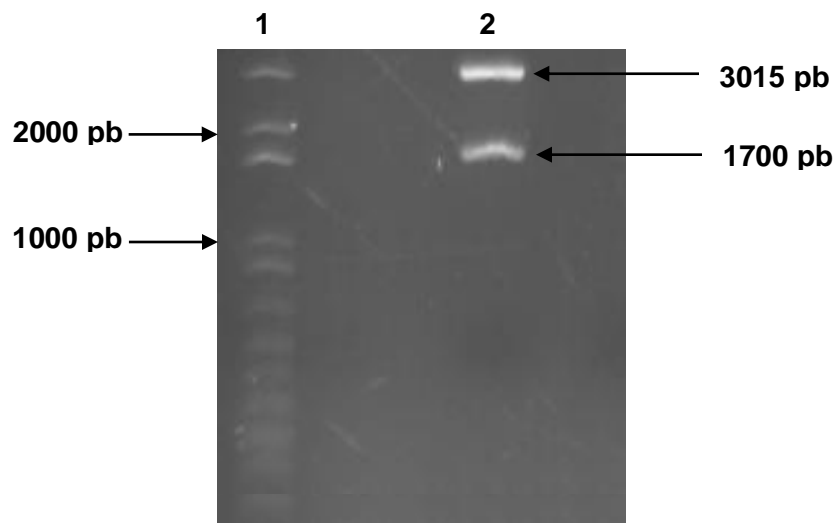


Figura 14. Digestão da Fotoliase nuclear de *Trypanosoma brucei* no pGEM. (1) padrão de peso molecular de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder*, (2) Fotoliase nuclear de *Trypanosoma brucei* com um tamanho esperado de 1700 pb, e pGEM com um tamanho esperado de 3015 pb.

O vetor pROCK-GFP-HIGRO também foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I para retirar o fragmento GFP deixando as extremidades para a ligação de Fotoliase. As digestões do vetor de pGEM-Fotoliase e do vetor pROCK-GFP-HIGRO foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular.

Após a digestão com as enzimas de restrição apropriadas e a purificação do gel de agarose 1%, o fragmento de DNA codificador da Fotoliase foi ligado ao vetor pROCK, e transformadas em *E. coli* DH5 α . As colônias de bactérias *E. coli* DH5 α transformadas foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto através de PCR de colônias. Na figura 15, mostramos a PCR de uma colônia que foi positiva em eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado e confirmado pela a amplificação do fragmento mediante a comparação com um padrão de peso molecular.

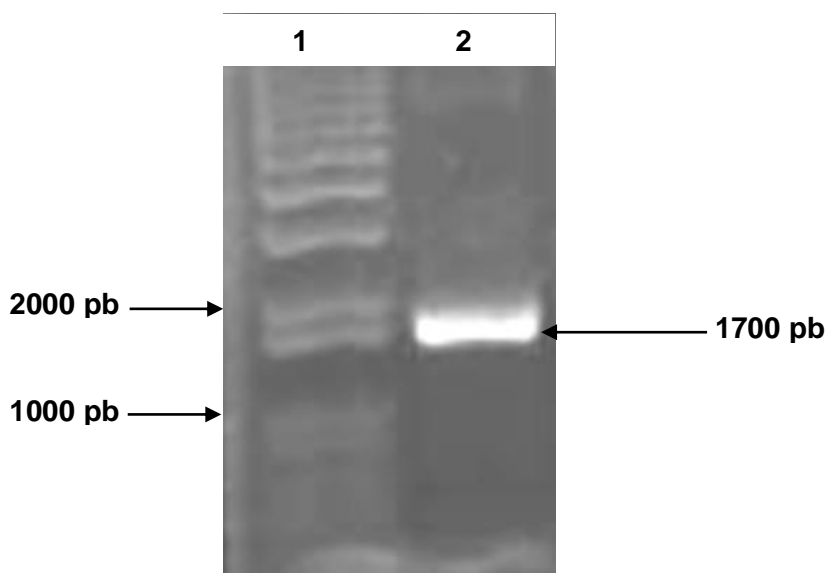


Figura 15. PCR de colônia no pROCK-Fotoliase. (1) padrão de peso molecular de DNA 1 kb Plus DNA Ladder; (2) Colônia contendo o plasmídeo pROCK-Fotoliase nuclear de *T. brucei* com um tamanho esperado de 1700 pb.

A expressão heteróloga da *orf* da Fotoliase de *T. brucei*, clonado no vetor de expressão pROCK, transfectado em epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* foi confirmada através da RT-PCR a partir do RNA total extraído dos parasitos (FIGURA 16).

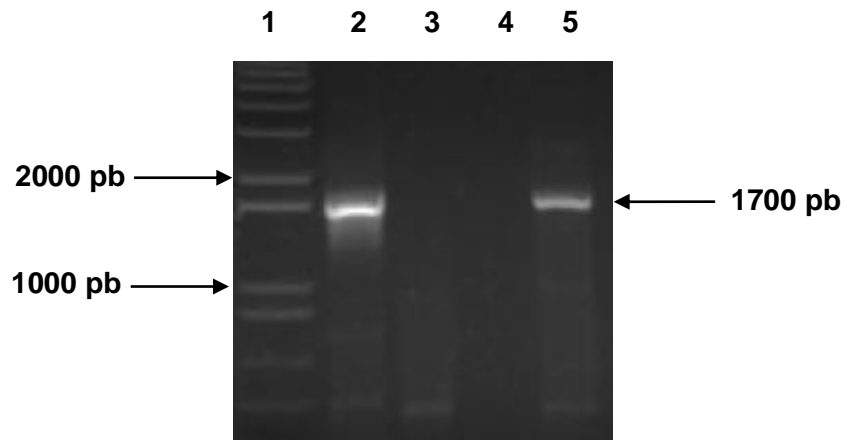


Figura 16. RT-PCR no selvagen *T. cruzi*. A expressão heteróloga da Fotoliase por RT-PCR do RNA total dos parasitos com o vetor pROCK-Fotoliase com um tamanho esperado de 1700 pb. (1) Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*, (2) Controlo positivo DNA total de *T. brucei*, (3) Controlo negativo vetor vazio pROCK, (4) Controlo negativo sem cDNA molde (5) RT-PCR do cDNA do vetor pROCK-Fotoliase no CL Brener *T. cruzi*.

O fragmento esperado de 1700 pb de peso molecular da *orf* da fotoliase foi amplificado a partir do cDNA de parasitos transformados com o gene de interesse e do controlo positivo, sendo que o mesmo fragmento não pôde ser amplificado a partir da cultura de epimastigota transformada apenas com o vetor pROCK (vazio).

A expressao heteróloga da *orf* da Fotoliase de *T. brucei*, clonado no vetor de expressão pROCK e transfectado em epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* CSB+/-, foi confirmada através da RT-PCR a partir do RNA total extraído dos parasitos transformados. O fragmento esperado de 1700 pb da *orf* da Fotoliase foi amplificado a partir do cDNA de parasitos transformados com a *orf* de interesse e do controlo positivo, sendo que o mesmo fragmento não pôde ser amplificado a partir da cultura de epimastigota transformada com o vetor pROCK (vazio) e da cepa CL Brener de *T. cruzi* CSB+/- (FIGURA 17).

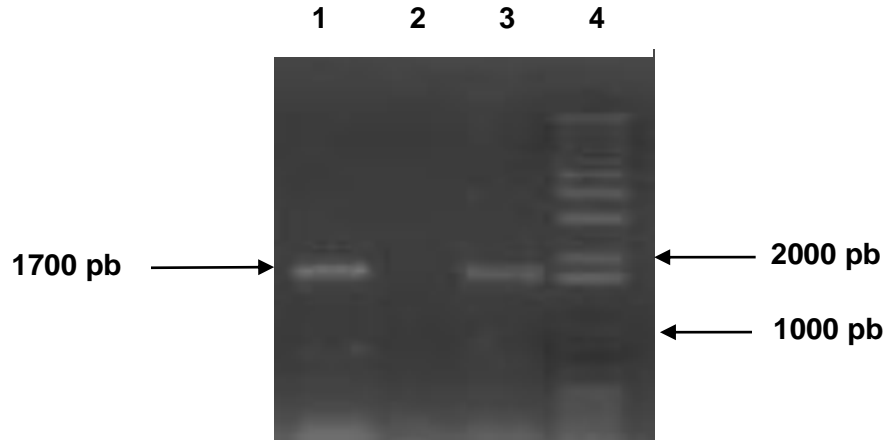


Figura 17. RT-PCR no cepa de *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB. A confirmação da expressão heteróloga da Fotoliase por RT-PCR do RNA total dos parasitos com o vetor pROCK-Fotoliase com um tamanho esperado de 1700 pb. (1) Controlo positivo DNA total de *T. brucei*; (2) Controlo negativo vetor vazio pROCK; (3) RT-PCR do cDNA do vetor pROCK-Fotoliase no cepa de *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB (4) Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*.

Para verificarmos se a fotoliase de *T. brucei* é funcional, irradiamos células selvagens de *Trypanosoma cruzi* (WT) e as células transfectados com a fotoliase de *T. brucei*. Após a irradiação, as células foram expostas à luz branca por 1, 10 e 60 minutos. Na figura 18 é possível ver que após seis horas de irradiação, as células WT apresentam aproximadamente 50% de morte. Já as células transfectados com a fotoliase de *T. brucei* apresentam uma sobrevivência similar às cepas não irradiadas. Fica evidente que a sobrevivência é fruto da atividade da fotoliase porque quando as células não são expostas a luz branca após a irradiação por luz UV, não se verifica diferença entre as células selvagens e aquela que expressa a fotoliase de *T. brucei*.

Uma vez que verificamos que a fotoliase é funcional, analisamos se a mesma era uma fotoliase que reconhece a lesão em DNA fita simples ou fita dupla. Para isso, nós utilizamos a cepa de *T. cruzi* CSB+/- . Esse gene é fundamental para reconhecer uma RNA polimerase parada em frente à lesão e iniciar o processo de reparo que gera a fita simples no DNA. Como pode ser visto nas figuras 19 e 20, em células deficientes no gene CSB, não é possível verificar a atividade da fotoliase, mesmo com exposição a 60 minutos de luz branca. Não observamos diferenças nem com 6 horas, nem com 24 horas após a exposição à luz UV com a subsequente exposição à luz branca.

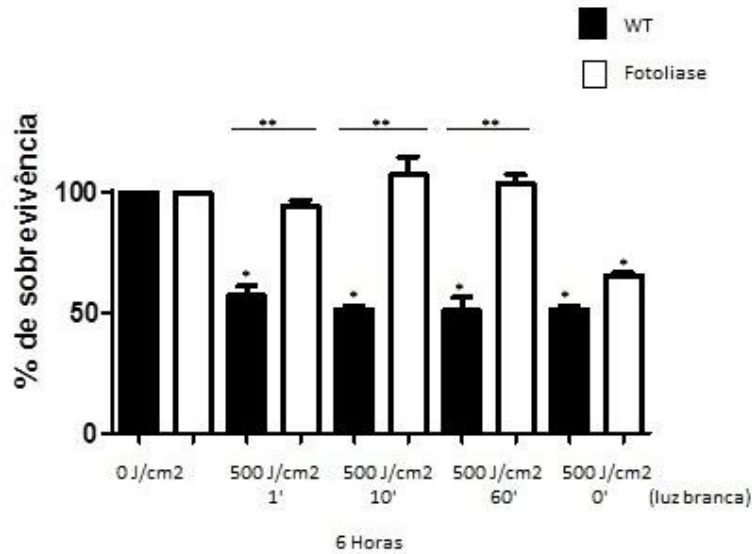


Figura 18. Sobrevivência do *T. cruzi* que expressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* 6 horas o tratamento com luz UV. O gene da fotoliase nuclear de *Trypanosoma brucei* clonado no vetor de expressão pROCK transfectado em epimastigotas *T. cruzi* (**Fotoliase**) e o *T. cruzi* transformada com o vetor pROCK vazio (**WT**). Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da Fotoliase e do WT 6 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 1, 10 e 60 minutos, em relação ao não tratado com luz UV 0 J/cm² (P < 0,05); Ocorrem (**) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre a Fotoliase e o WT tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Não ocorrem diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre as Fotoliasas tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre os WT tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 0, 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Não ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre a Fotoliase e o WT tratados a 500 J/cm² em relação ao tratado a 500 J/cm² deixados a luz branca 0 minutos (escuro) (P < 0,05).

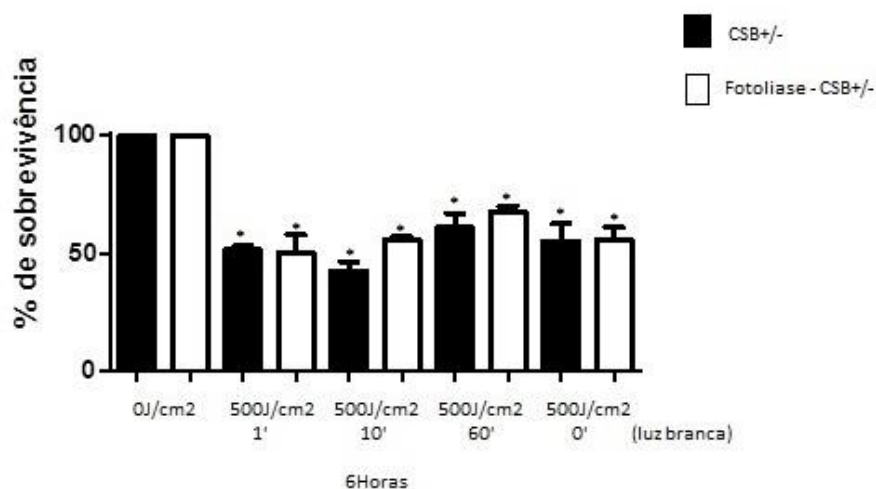


Figura 19. Sobrevivência da cepa *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB que expressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* 6 horas após o tratamento com luz UV. O gene da fotoliase de *T. brucei* clonado no vetor de expressão pROCK transfectado no cepa *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB (**Fotoliase-CSB+/-**) e CL Brener de *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB (**CSB+/-**). Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da Fotoliase-CSB+/- e do CSB+/- 6 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 0, 1, 10 e 60 minutos, em relação ao não tratado com luz UV 0 J/cm² (P < 0,05); Não ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da entre Fotoliase-CSB+/- e do CSB+/- 6 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 0, 1 e 60 minutos. Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da entre Fotoliase-CSB+/- e do CSB+/- 6 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 10 minutos.

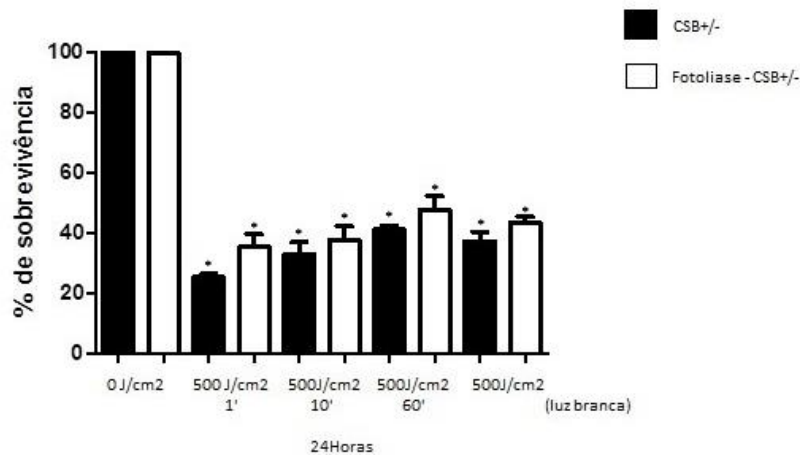


Figura 20. Sobrevivência da cepa *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB que expressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* 24 horas após o tratamento com luz UV. O gene da fotoliase de *T. brucei* clonado no vetor de expressão pROCK transfectado no cepa *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB (**Fotoliase-CSB+/-**) e CL Brener de *T. cruzi* hemi-nocaute para o gene CSB (**CSB+/-**). Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da Fotoliase-CSB+/- e do CSB+/- 24 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 0, 1, 10 e 60 minutos, em relação ao não tratado com luz UV 0 J/cm²; Não ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da entre Fotoliase-CSB+/- e do CSB+/- 24 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 0, 1, 10 e 60 minutos. Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência do CSB+/- 24 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 1, 10 e 60 minutos. Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da Fotoliase-CSB+/- 24 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05).

Para verificarmos a capacidade de retomada do crescimento das células irradiadas, fizemos o mesmo experimento descrito na figura 18, mas dessa vez a contagem das células foi realizada 24 horas após a exposição à luz UV. Nesse experimento podemos confirmar a capacidade da fotoliase de *T. brucei* de aumentar a resistência à luz UV em células de *T. cruzi*, mas o dado mais relevante nesse experimento é que as células selvagens, após serem irradiadas com luz UV, não conseguem crescer adequadamente quando colocadas por 60 minutos na luz branca (Figura 21).

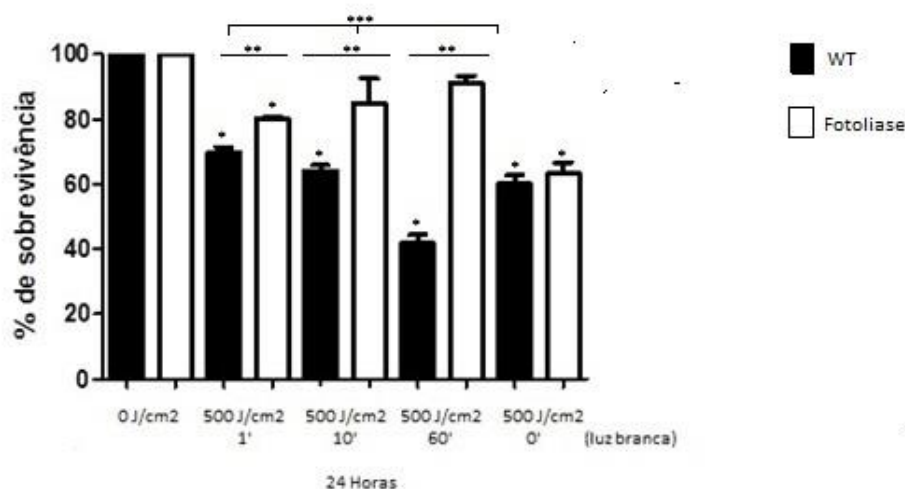


Figura 21. Sobrevivência do *T. cruzi* que expressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* 24 horas após o tratamento com luz UV. O gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* clonado no vetor de expressão pROCK transfectado em epimastigotas *T. cruzi* (**Fotoliase**) e o *T. cruzi* transformada com o vetor pROCK vazio (**WT**). Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência da Fotoliase e do WT 6 horas após o tratamento com luz UV a 500 J/cm², e deixados em luz branca durante 1, 10 e 60 minutos, em relação ao não tratado com luz UV 0 J/cm² (P < 0,05); Ocorrem (**) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre a Fotoliase e o WT tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Não ocorrem diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre as Fotoliases tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre os WT tratados a 500 J/cm² e deixados a luz branca 0, 1, 10 e 60 minutos (P < 0,05); Não ocorrem (*) diferenças estatisticamente significativa na percentagem de sobrevivência entre a Fotoliase e o WT tratados a 500 J/cm² em relação ao tratado a 500 J/cm² deixados a luz branca 0 minutos (escuro) (P < 0,05).

Para entender por que as células selvagens não conseguem voltar a crescer após a exposição à luz UV e 60 minutos na luz branca, verificamos se a exposição à luz branca poderia ser letal para célula. Quando a exposição à luz branca é realizada sem previa exposição à luz UV (FIGURA 22), não verificamos nenhuma diferença no crescimento do *T. cruzi*, o que mostra que a luz branca não é tóxica para o parasito.

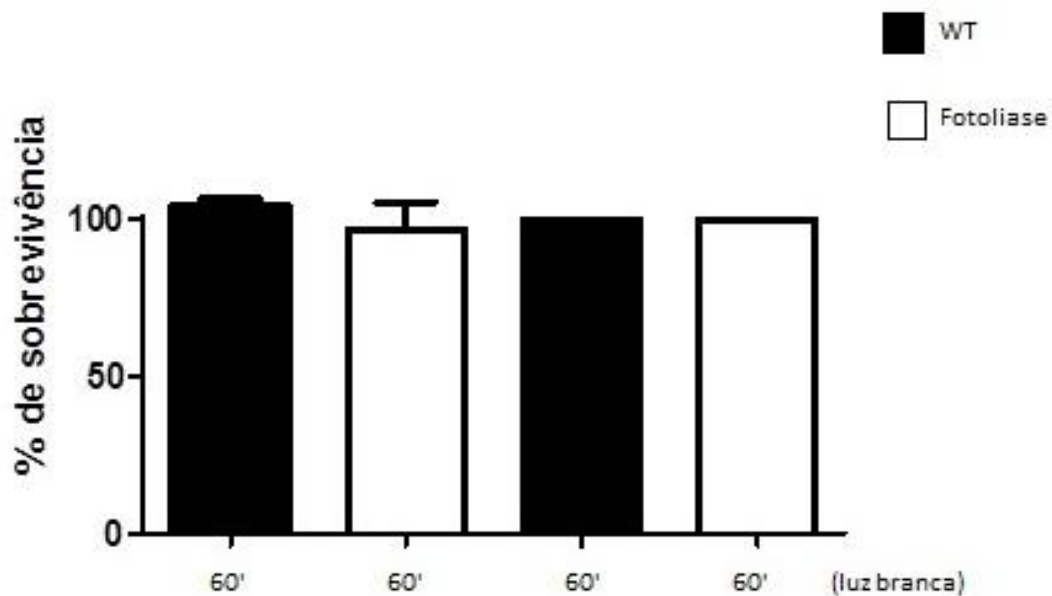


Figura 22. Sobrevivência do *T. cruzi* que expressa o gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* em presença de luz branca. O gene da fotoliase nuclear de *T. brucei* clonado no vetor de expressão pROCK transfectado em epimastigotas *T. cruzi* (**Fotoliase**) e o *T. cruzi* transformada com o vetor pROCK vazio (**WT**). Não ocorrem diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência entre a Fotoliase e o WT, 60 minutos após o tratamento com luz branca.

Para investigar se o não crescimento da célula selvagem após exposição à luz UV e luz branca era devido a modificações no meio de cultura, irradiamos o meio de cultura com 500 J/cm² de luz UV e depois expusemos o meio a diferentes tempos a luz branca (1, 10 e 60 minutos). O meio irradiado foi utilizado no crescimento de células de *T. cruzi* que não foram irradiadas. Como pode ser visto na figura 23, o meio irradiado não é tóxico para o *T. cruzi*.

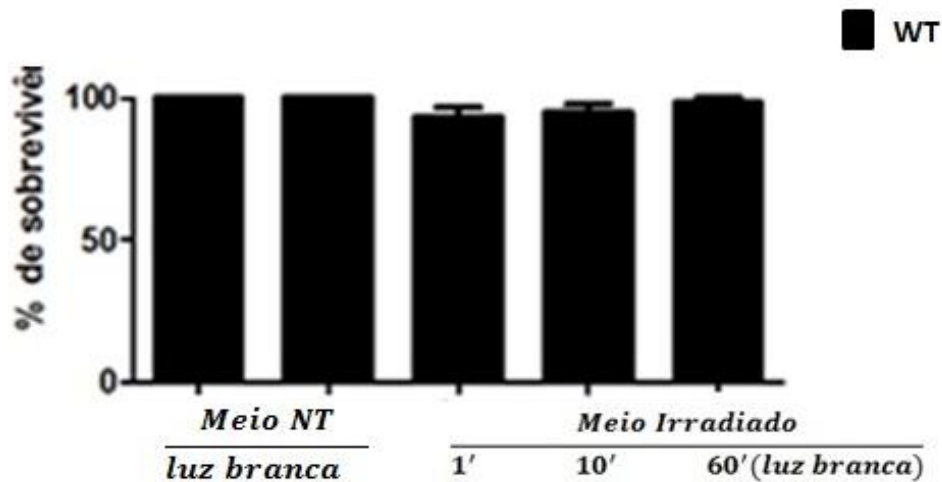


Figura 23. Sobrevivência do *T. cruzi* não é influenciada pelo meio de cultura LIT. O *T. cruzi* transformada com o vetor pROCK vazio (WT). Não ocorrem diferenças estatisticamente significativas na percentagem de sobrevivência entre o WT irradiado a 500 J/cm², deixados a 1, 10 e 60 minutos após o tratamento com luz branca em relação ao não irradiado 0 J/cm².

5. DISCUSSÃO

Historicamente, a investigação dos danos causados por luz UV marca o início do estudo de reparo do DNA e um dos organismos mais estudados e usados em experimento de laboratório é a bactéria *E. coli* que elucidou muitos aspectos do reparo de DNA e de adaptação a um novo ambiente. Com a crescente disponibilidade de genomas sequenciados, verifica-se uma grande conservação e similaridades dos genes de reparo nos organismos. A expressão heteróloga tem se mostrado uma ferramenta eficaz no estudo de genes de reparo de DNA. Um bom exemplo dessa abordagem é a caracterização do sistema GO em *T. cruzi*.

A bactéria *E. coli* possui as enzimas MutM, MutY, MutT (sistema GO) para o reconhecimento e remoção específica de lesões 8-oxoG, e estas mesmas enzimas são correspondentes em eucariotos a OGG1, MUTYH e MTH (BARNES & LINDAHL, 2004; DAVID et al. 2007).

No estudo feito por FURTADO *et al.*, (2012), caracterizou-se o homólogo da 8-oxoG DNA glicosilase de *T. cruzi* (TcOGG1) mostrando que este gene é capaz de complementar leveduras deficientes de OGG1 reduzindo sua taxa de mutação. Também foi visto que a glicosilase TcOGG1, quando superexpressa, é capaz de diminuir o nível de 8-oxoG tanto no núcleo quanto na mitocôndria após tratamento com H₂O₂. Em um estudo feito por KUNRATH-LIMA (não publicado) demonstrou que o gene TcMYH do *Trypanosoma cruzi* é um homólogo funcional de MutY. Ele é capaz de complementar bactérias deficientes nesse gene, diminuindo sua taxa de mutação. Além disso, foi demonstrado que a proteína recombinante TcMYH remove a adenina pareada com 8-oxoG de um substrato fluorescente de 30mer *in vitro*.

A enzima MutT de *E. coli* é uma 8-oxo-dGTPase, que hidrolisa 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos a 8-oxo-dGMP, impedindo assim a incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA (NAKABEPPU et al., 2006). Supõe-se que uma enzima com atividade de 8-oxo-dGTPase seja de grande importância para a estabilidade genômica e viabilidade celular do *T. cruzi*, mas curiosamente, este gene não foi encontrado no genoma deste após o seu sequenciamento completo (EL-SAYED et al., 2005). Com o intuito de confirmar a importância desse gene, AGUIAR *et al.*, (2013) demonstrou que cepas de *T. cruzi* que expressam o mRNA de MutT de *E. coli* (MutT) apresentaram menos lesões no DNA nuclear quando comparados ao controle selvagem pROCK. A expressão exógena de MutT permite um melhor controle da incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA

do *T. cruzi* prevenindo melhor lesões que poderiam se originar da incorporação da 8-oxoG. Uma vez que a expressão heteróloga de MutT indicou que a mesma seria importante para o *T. cruzi* procurou-se verificar se o parasito realmente não expressava esse gene. A busca no genoma revelou a presença de um erro de anotação em um gene que poderia ser similar ao gene MutT. O estudo desse gene mostrou que o mesmo tem atividade de 8-oxo-dGTPase, pois foi capaz de complementar bactérias deficientes em MutT (AGUIAR et al., 2013). Portanto, a expressão heteróloga permitiu caracterizar todo o sistema GO de *T. cruzi*.

Outro exemplo de uso da expressão heteróloga foi com o gene ODC (Ornithine Decarboxilase). Segundo CARRILO *et al.*, (1999) e BARCLAY *et al.*, (2011) o *T. cruzi* não expressa o gene ODC e a ausência do gene ODC inibe o crescimento do parasito após o tratamento com α -difluorometilornitine (DFMO). Para confirmarem essa hipótese, os autores transfectaram o gene ODC de *Crithidia fasciculata* que induziu a expressão normal de ODC em epimastigotas de *T. cruzi*. As células transformadas foram capazes sobreviver ao tratamento com α -difluorometilornitine (DFMO). Além de serem resistentes ao DFMO, os parasitos modificados apresentaram uma maior metaciclo genese. Esses dados mostraram a importância das poliaminas no metabolismo do *T. cruzi*, assim como a eficácia do uso da abordagem de expressão heteróloga.

No caso das lesões provocadas por luz UV, uma das estratégias desenvolvidas pelas células no reparo a distorções estruturais causadas por luz UV é a PHR também conhecida como *light repair* – fotoreparo. Essa é uma forma de reparo eficiente e direto, através da enzima DNA fotoliase que remove distorções estruturais do tipo CPDs e 6–4 PPs em presença de luz, sem a necessidade de excisão da base lesada, ocorrendo somente a reversão da lesão. A outra estratégia de reparo a distorções estruturais causadas por luz UV é o NER, também conhecido como *dark repair*, que reconhece e elimina grande variedade de lesões. O NER pode ser subdividido em duas subvias, o GGR e TCR, onde ocorre a participação de vários complexos enzimáticos na excisão dos nucleotídeos lesados e síntese de um novo fragmento de nucleotídeos (MITCHELL et al. 2003; BATISTA et al. 2008; DIDERICH et al. 2011). Ambas são estratégias bastante conservadas desde procaríotos até eucariotos superiores.

O Projeto Genoma o tripanossomatídeos revelou que estes possuem duas cópias do gene da fotoliase (BERRIMAN et al. 2005; EL-SAYED et al. 2005; NARE et al. 2009), mas curiosamente, uma das fotoliasas de *T. cruzi* está presente em forma de pseudogene. Pela análise da sequência do genoma de diferentes cepas de *T. cruzi* ficou

evidente que o gene da fotoliase nuclear se tornou um pseudogene em um ancestral do *T. cruzi* depois deste ter divergido da *L. major* e do *T. brucei*. Não é possível afirmar se ocorreu uma pressão seletiva para eliminação desse gene, mas é curioso verificar que entre os Tripanosomatídeos que causam doenças, o *T. cruzi* é o único que pode ser exposto à irradiação solar em uma parte do seu ciclo de vida.

Visando avaliar a funcionalidade do gene da fotoliase nuclear do *T. brucei* e entender a razão da perda deste gene por parte do *T. cruzi*, investigamos o papel de fotoliase em tripanossomatídeos. Nesse trabalho estudamos a expressão heteróloga deste gene em *T. cruzi*. Vários estudos mostraram a funcionalidade do gene da fotoliase no reparo a distorções estruturais do tipo CPDs e 6 – 4 PPs no DNA que interferem em mecanismos celulares, como a replicação e transcrição em diversos organismos tais como: *S. typhimurium*, *A. nidulans*, *H. halobium*, *M. thermoautotrophicum*, *S. griseus*, *S. acutus*, *S. cerevisiae*, *E. coli* e etc (KOEHLER et al. 1996; LI et al. 2006; EISEN & HANAWALT 1999; MITCHELL et al. 2003; BATISTA et al. 2008; LIMA – BESSA et al. 2008; DIDERICH et al. 2011; LIU et al. 2011; CORTAT et al. 2013).

Para verificarmos a funcionalidade do gene da fotoliase de *T. brucei* irradiamos as culturas de epimastigotas transformadas com o vetor pROCK vazio denominadas de selvagens de *T. cruzi* (WT) e as células modificadas com a fotoliase de *T. brucei*. Após a irradiação, as células foram expostas à luz branca por 1, 10 e 60 minutos e na figura 18 é possível ver que após seis horas de irradiação, as células WT apresentam aproximadamente 50% de morte. Já as células modificadas com a fotoliase de *T. brucei* apresentam uma sobrevivência similar às cepas não irradiadas. Fica evidente que a sobrevivência é fruto da atividade da fotoliase porque quando as células não são expostas a luz branca, após a irradiação por luz UV, não se verifica diferença entre as células selvagens e aquela que expressa a fotoliase de *T. brucei*. Esses dados estão de acordo com os estudos feitos por CORTAT *et al.*, (2013) que observaram que fibroblastos transfectados com o gene da fotoliase apresentaram uma maior resistência a UV. Outros estudos de expressão heteróloga ou não de fotoliase também mostraram a capacidade da fotoliase de atuar em diferentes organismos de forma ectópica. Entre esses estudos podemos citar: KULMS *et al.*, (1999) com o gene da fotoliase da cianobactéria *A. nidulans* expresso temporariamente em células HeLa reduziram grandemente a apoptose induzida por luz UV; estudos feitos por YASUI *et al.*, (1992) e PRAKASH, (1975) mostrando a eficiente fotorreativação em *S. cerevisiae* contendo os genes CPD fotoliase nuclear e

mitocondrial, deste modo observa-se que o gene da fotoliase tem alguma função no DNA reparando lesões causados por luz UV.

O fato da fotoliase de *T. brucei* ser funcional, mesmo que esta célula não seja exposta a luz UV durante o seu ciclo de vida, está de acordo com os estudos feitos por NARE *et al.*, (2009) que mostraram que em *L. major*, que possui o gene da fotoliase mitocondrial e nuclear, quando expostas a luz UV e deixadas em luz branca ocorre a atividade de fotoreparo.

Uma vez que foi verificada a funcionalidade da fotoliase, analisamos se a mesma é uma fotoliase que reconhece a lesão em DNA fita simples ou fita dupla. O nosso grupo de pesquisa utilizou cepas de *T. cruzi* CSB+/- . Esse gene é fundamental para reconhecer uma RNA polimerase parada em frente à lesão e iniciar o processo de reparo que gera a fita simples no DNA. Como pode ser visto nas figuras 19 e 20, em células deficientes no gene CSB, não é possível verificar a atividade da fotoliase, mesmo com exposição a 60 minutos de luz branca. Não observamos diferenças nem com 6 horas, nem com 24 horas após a exposição à luz UV com a subsequente exposição à luz branca. Fotoliasas capazes de reconhecer a lesão em fita dupla de DNA foram capazes de complementar células deficientes em reparo de DNA, como foi verificado em células de pacientes de *Xeroderma Pigmentosum* que se tornaram resistentes a luz UV quando expressavam uma fotoliase ectópica (CORTAT *et al.*, 2013). Não encontramos na literatura nenhum estudo de expressão heteróloga de fotoliasas em células deficientes no gene CSB, portanto, não podemos afirmar se o gene CSB apresenta outra função que interfira na atividade de fotoliase. Pretendemos expressar a fotoliase de *E. coli*, capaz de reconhecer a lesão na fita dupla do DNA, no parasito deficiente no gene CSB para verificarmos se a ausência de complementação da fotoliase de *T. brucei* é devido a ela reconhecer fita simples no DNA ou ser dependente de uma interação com o gene CSB.

Verificada a capacidade de aumentar à resistência a irradiação das células modificadas, fizemos o mesmo experimento descrito na figura 18, mas dessa vez a contagem das células foi realizada 24 horas após a exposição à luz UV. Confirmamos a capacidade da fotoliase de *T. brucei* de aumentar a resistência à luz UV em células de *T. cruzi* (Figura 21), mas o dado mais relevante nesse experimento é que as células selvagens, após serem irradiadas com luz UV, não conseguem crescer adequadamente quando colocadas por 60 minutos na luz branca. Quando as células foram expostas sem previa exposição à luz UV (Figura 22), não verificamos nenhuma diferença no crescimento do *T. cruzi*, o que mostra que a luz branca não é tóxica para o parasito.

Também verificamos a hipótese de que o meio de cultura influenciasse no não crescimento da célula selvagem após exposição à luz UV. Mas quando se irradiou o meio de cultura com 500 J/cm² de luz UV e depois expusemos o meio a diferentes tempos a luz branca (1, 10 e 60 minutos), o meio irradiado não foi tóxico para o crescimento de células de *T. cruzi* que não foram irradiadas previamente.

A deficiência em responder a luz UV é capaz de levar a problemas no crescimento celular. YAMAIZUMI & SUGANO (1994), LJUNGAMAN *et al.*, (2001) MARINI *et al.*, (2006) demonstram que em células de fibroblastos deficientes na subvia TCR ocorre o bloqueio persistente da RNA polimerase por UV ativando a fosforilação da p53 e a parada do ciclo celular. VROUWE *et al.*, (2010) mostrou que a ausência da replicação e transcrição em células deficientes NER elícita uma sinalização dependente da ATR prevenindo a passagem das células nas fases G₀ - G₁ para a fase S, mostrando deste modo que o mecanismo ATR esta relacionado com o reconhecimento da lesão causadas por luz UV. Os genes das subvias NER atuam durante a replicação do DNA e de acordo com SCHUL *et al.*, (2002) o NER pode reparar uma fração mínima de lesões por UV na ausência de PHR. THOMA (1999) demonstrou que 75% do dano ao DNA gerado pela luz UV é reparado imediatamente pelas fotoliase. O auxílio da fotoliase ao reparo feito pelo NER a lesões CPDs foi observado em leveduras *S. cerevisiae* (FRIEDBERG, 2003), e TANIDA *et al.*, (2005) mostrou que a CPD fotoliase melhoram o reparo de NER em *E. coli*. A interação entre as fotoliase e RNA polimerase não esta totalmente esclarecida e provavelmente a RNA polimerase para no local da lesão reconhecido pelos genes CSB e XPG deixando em fitas simples um substrato para ação das DNA fotoliasas de fita simples que fluem pelo DNA convertendo os dímeros em monômeros de timina. Portanto, é evidente o papel que a fotoliase pode exercer na progressão do ciclo celular, mas não está claro porque de na ausência desse gene, a luz branca pode retardar o crescimento celular. Uma possibilidade é que na ausência da fotoliase, o gene CSB não possa realizar adequadamente a sua função na presença de luz branca e, dessa maneira, a parada da RNA polimerase sinalize para a parada do ciclo celular, o que pode ser dependente do gene CSB. Já foi mostrado que células de *T. cruzi* quando tratadas com agentes que inibem a replicação, como a camptotecina, são capazes de sinalizar para os primeiros passos de apoptose pela exposição da fosfatidilserina na membrana nuclear (ZUMA *et al.*, 2011). Pretendemos verificar se a exposição à luz branca, após a exposição à luz UV, é capaz de fazer a mesma sinalização nas células selvagens. Uma hipótese bastante interessante para essa parada do ciclo celular na presença de luz branca é que essa

ocorre para impedir a progressão de células de *T. cruzi* que tenham sido muito expostos à luz solar durante o seu ciclo de vida. Essa pode ser uma razão para a seleção de cepas de *T. cruzi* que tenham perdido a fotoliase durante a evolução, pois assim, permitiria diferenciar às células que ficaram mais expostas à irradiação solar daquelas que penetraram mais rapidamente no hospedeiro e, dessa forma, podem apresentar uma capacidade reprodutiva mais apropriada.

A sensibilidade à luz branca após a luz UV também pode ser fruto da atividade da fotoliase mitocondrial. O gene da fotoliase mitocondrial do tipo fita simples em *T. cruzi* possui características similares e semelhantes aos encontrados em cianobacteria *A. nidulans* pertencente à família dos criptocromos DASH (HUANG et al., 2006; POKORNY et al., 2008). Este gene é fortemente associado ao cinetoplasto e é expresso somente em formas epimastigotas replicativas encontradas no interior do hospedeiro intermediário (GABALDON et al., 2010). Apesar de se ter estudado a localização dessa proteína, não se sabe se ela é realmente funcional. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostram que a presença de luz branca não interfere no reparo de lesões provocadas por luz UV no genoma mitocondrial, o que sugere que a fotoliase mitocondrial pode não estar envolvida com o reparo de DNA, mas pode ter algum papel na sinalização para a parada do ciclo celular quando a célula é exposta a luz branca após irradiação com luz UV.

Portanto, nesse trabalho fomos capazes de mostrar que a fotoliase de *T. brucei* é funcional e que sua atividade é dependente da atividade da proteína CSB. Além disso, verificamos que a exposição à luz branca é tóxica para o *T. cruzi* quando esta é realizada após a irradiação com luz UV.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a fotoliase nuclear de *T. brucei* é funcional e a sua atividade é dependente da atividade da proteína CSB. Quando o *T. cruzi* é submetido a irradiação com luz UV, ele torna-se sensível à luz branca.

7. PERSPECTIVAS

- Uso dos anticorpos 6 – 4 PPs e CPDs para a localização da lesão e identificação do tipo de lesão que é reparada pela fotoliase de *T. brucei*;
- Construção do hemi-nocaute para o gene da fotoliase mitocondrial do *T. cruzi*;
- Análise dos marcadores de parada do ciclo celular após exposição à luz UV e luz branca;
- Expressão da fotoliase de *Escherichia coli* em células de *T. cruzi*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. H. N., FURTADO, C., REPOLES, B. M., RIBEIRO, G. A., MENDES, I. C., PELOSO, E. F., GADELHA, F. R., MACEDO, A. M., FRANCO, G. R., PENA, S. D. J., TEIXEIRA, S. M. R., VIEIRA, L. Q., GUARNERI, A. A., ANDRADE, L. O. & C. R. MACHADO. Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLOS*. Belo Horizonte, v. 7, n. 6, p. 1 – 13, 2013.

AKIYOSHI, B. & K. GULL. Evolutionary cell biology of Chromosome segregation: Insights from Trypanosomes. **Open Biology**. Oxford, v. 3, p. 1 – 13, 2013.

AMARAL, I. Bacteria or parasite? The Controversy over the Etiology of Sleeping Sickness and the Portuguese participation, 1898-1904. **História, Ciências, Saúde**. Manguinhos- Rio de Janeiro, p. 1 – 26, 2012..

BAER, C. F., MIYAMOTO, M. M. & D. R. DENVER. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. **Natural Reviews Genetics**. Oregon, v. 8, p. 619 – 631, 2007.

BALMER, O., BEADELL, J. S., GIBSON, W & A. CACCONE. Phylogeography and Taxonomy of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. Basel, v. 5, n. 2, p. 961 – 966, 2011.

BARCLAY, J. J., MOROSI, L. G., VANRELL, M. C., TREJO, E. C., ROMANO, P. S. & C. CARRILLO. *Trypanosoma cruzi* Coexpressing Ornithine Decarboxylase and Green Fluorescence Proteins as a Tool to Study the Role of Polyamines in Chagas Disease Pathology. **Enzyme Research**. Buenos Aires, p 1 – 11. 2011.

BARNES, D. E. & T. LINDAHL. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annual Review of Genetics**. Hertfordshire, v. 38, p. 445 – 476. 2004.

BARRETT, M. P. & S. L. CROFT. Management of Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **British Medical Bulletin**. London, v. 104, p. 175 – 196, 2012

BATISTA, L. F. Z., KAINA, B., MENEGHINI, R. & C. F. M. MENCK. How DNA lesions are turned into Powerful killing structures: Insights from UV – induced apoptosis. **Mutation Research**. São Paulo, v. 12, p. 1 – 12, 2008.

BERRIMAN, M., GHEDIN, E., FOWLER, C. H., BLANDIN, G. I., RENAULD, H., BARTHOLOMEU, D. C., LENNARD, N. J., CALER, J., HAMLIN, N. E., HAAS, B., BOHME, U., HANNICK, L., ASLETT, M. A., SHALLOM, J., MARCELLO, L., HOU, L., WICKSTEAD, B., ALSMARK, U. C. M., ARROWSMITH, C., ATKIN, R. A., BARRON, A. J., BRINGAUD, F., BROOKS, K., CARRINGTON, M., CHEREVACH, I., CHILLINGWORTH, T. J., CHURCHER, C., CLARK, L. N., CORTON, C. H., CRONIN, A., DAVIES, R. M., DOGGETT, J., DJIKENG, A., FELDBLYUM, T., FIELD, M. C., FRASER, A., GOODHEAD, I., HANCE, Z., HARPER, D., HARRIS, B. R., HAUSER, H., HOSTETLER, J., IVENS, A., JAGELS, K., JOHNSON, D., JOHNSON, J., JONES, K., KERHORNOU, A. X., KOO, H., LARKE, N., LANDFEAR, S., LARKIN, C., LEECH, V., LINE, V., LORD, A., MACLEOD, A., MOONEY, P. J., MOULE, S., MARTIN, D. M. A., MORGAN, G. W., MUNGALL, K., NORBERTCZAK, H., ORMOND, D., PAI, G., PEACOCK, C. S., PETERSON, J., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., RAJANDREAM, M. A., REITTER, C., SALZBERG, S. L., SANDERS, M., SCHOBEL, S., SHARP, S., SIMMONDS, M., SIMPSON, A. J., TALLON, L., TURNER, C. M. R., TAIT, A., TIVEY, A. R., AKEN, S. V., WALKER, D., WANLESS, D., WANG, S., WHITE, B., WHITE, O., WHITEHEAD, S., WOODWARD, J., WORTMAN, J., ADAMS, M. D., EMBLEY, T. M., GULL, K., ULLU, E., BARRY, J. D., FAIRLAMB, A. H., OPPERDOES, F., BARRELL, B. G., DONELSON, J. E., HALL, N., FRASER, C. M., MELVILLE, S. E. & N. M. EL-SAYED. The Genome of the African Trypanosome: *Trypanosoma brucei*. **Science**. New York, v. 309, p. 416 – 422, 2005.

BRETTEL, K. & M. BYRDIN. Reaction mechanisms of DNA photolyase. **Current Opinion in Structural Biology**. Gif-sur-Yvette, v. 20, p. 693–701, 2010.

BRUDLER, R., HITOMI, K., DAYASU, H., TOH, H., KUCHO, K., ISHIURA, M., KAANEHISA, M., ROBERTS, V. A., TODO, T., TAINER, J. A., & E. D. GETZOFF. Identification of New Cryptochrome Class: Structure, Function and Evolution. **Molecular Cell**. Kyoto, v. 11, p. 59 – 67, 2003.

BUTTER, F., BUCERIUS, F., MICHEL, M., CICOVA, Z., MANN, M. & C. J. JANZEN. Comparative Proteomics of Two Life Cycle Stages of Stable Isotope-labeled *Trypanosoma brucei* Reveals Novel Components of the Parasite's Host Adaptation Machinery. **Molecular & Cellular Proteomics**. Martinsried, v. 12, n.1, p. 172 – 179, 2013

CARRILLO, C., CEJAS, S., GONZFILEZ, N. S. & I. D. ALGRANATI. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. **FEBS Letters**. Buenos Aires, v. 454, p. 192 - 196. 1999.

CAVALIER, S. T. Only six Kingdom of Life. **The Royal Society**. London, v. 271, p. 1251 – 1262, 2004.

CHIGANCAS, V., MIYAJI, N. E., MUOTRI, A. R., JACYSYN, J. F., MENDES, G. P. A., YASUI, A., & C. F. M. MENCK. Photorepair Prevents Ultraviolet-induced Apoptosis in Human Cells Expressing the Marsupial Photolyase Gene. *Cancer Research*. Sao Paulo, v. 60, p. 2458 – 2463, 2000.

CLEAVER, J. E. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. **Nature**. New York, v. 5, p. 564 – 574. 2005.

CORTAT, B., GARCIA, C. C. M., QUINET, A., SCHUCH, A. P., BESSA, K. M. L. & C. F. M. MENCK. The Relative Roles of DNA damage Induced by UVA Irradiation in Human Cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**. São Paulo, v. 12 p. 1483 – 1495, 2013.

DANIELS, J. P.; GULL, K. & B. WICKSTEAD. Cell Biology of the Trypanosome Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Oxford, v. 74, n. 4, p. 552 – 569, 2010.

DAROCHA, W. D., SILVA, R. A., BARTHOLOMEU, D. C., PIRES, S. F., FREITAS, J. M., MACEDO, A. M., VAZQUEZ, M. P., LEVIN, M. J. & S. M. R TEIXEIRA. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Res**. Belo Horizonte, v. 92, p. 113 – 120. 2004.

DAYASU, H., ISHIKAWA, T., KUMA, K., IWAI, S., TODO, T. & H. TOH. Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. **Gene Cells**. Kyoto, v. 9, p 479 – 495, 2004.

DAVID S. S., O'SHEA V. L. & S. KUNDU. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**. California, v. 447, p. 941 – 950. 2007.

DELAPORTE, F. Chagas, the Logic and the Discovery. **Historia, Ciencia, Saude**. ,Manguinhos - Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 39 -53, 1995.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M. & J. H. J HOEIJIMAKERS. Premature Aging and Cancer in Nucleotide Excision Repair disorders. **DNA Repair**. Rotterdam, v. 10, p. 772 – 780, 2011.

DORN P. L., PERNICIARO, L., YABSLEY, M. J., ROELLIG, D. M., BALSAMO, G., DIAZ, J., & D. WESSON. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Emerging Infectious Diseases**. Louisiana, v. 13, n. 4, p. 605 – 617, 2007.

DUFFY C. W., MACLEAN, L., SWEENEY, L., COOPER, A., TURNER, C. M. R., TAIT, A., STERNBERG, J., MORRISON L. J., & A. MACLEOD. Population Genetics of *Trypanosoma brucei rhodesiense*: Clonality and Diversity within and between Foci. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. Glasgow, v. 7, n. 11, p. 2526 – 2537, 2013.

EISEN, J. A. & P. C. HANAWALT. A Phylogenomic Study of DNA Repair Genes, Proteins, and Processes. **Mutation Research**. Stanford, v. 435, n. 3, p. 171 – 213, 1999.

EL-SAYED, N. M., MYLER, P. J., BLANDIN, G., BERRIMAN, M., CRABTREE, J., AGGARWAL, G., CALER, E., RENAULD, H., WORTHEY, E. A., HERTZ-FOWLER, C., GHEDIN, E., PEACOCK, C., BARTHOLOMEU, D. C., HAAS, B. J., TRAN, A. N., WORTMAN, J. R., ALSMARK, U. C., ANGIUOLI, S., ANUPAMA, A., BADGER, J., BRINGAUD, F., CADAG, E., CARLTON, J. M., CERQUEIRA, G. C., CREASY, T., DELCHER, A. L., DJIKENG, A., EMBLEY, T. M., HAUSER, C., IVENS, A. C., KUMMERFELD, S. K., PEREIRA-LEAL, J. B., NILSSON, D., PETERSON, J., SALZBERG, S. L., SHALLOM, J., SILVA, J. C., SUNDARAM, J., WESTENBERGER, S., WHITE, O.,

MELVILLE, S. E., DONELSON, J. E., ANDERSSON, B., STUART, K. D. & N. HALL. Comparative genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, New York, v. 309, n. 5733, p. 404 – 409, 2005.

FURTADO, C., KUNRATH-LIMA, M., RAJÃO, M. A., MENDES, I. C., MOURA, M. B., CAMPOS, P. C., MACEDO, A. M., FRANCO, G. R., PENA, S. D. J., TEIXEIRA, S. M. R., HOUTEN, B. V. & C. R. MACHADO. Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**. Belo Horizonte, v. 7, n. 8, p. 1 - 11. 2012.

FRIEDBERG, E. C. DNA Damage and Repair. **Nature**. Dallas, v. 421, p. 436 – 440, 2003.

GABALDON, C. M., LABRADOR, L., ARRAIZ, G., CONCEPCION, L. J. & L. AVILAN. *Trypanosoma cruzi*: A kinetoplast-associated Protein of the Photolyase/cryptochrome Family. **Experimental Parasitology**, La Hechicera, v. 124, p. 350 – 356, 2010.

GARCIA, E. S., GENTA, F. A., DE AZAMBUJA, P., & G. A. SCHAUB. Interactions between Intestinal compounds of Triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, Bochum, v. 26, p. 499 – 505, 2010.

GOOL, A. J., CITTERIO, E., RADEMAKERS, S., OS, R., VERMEULEN W., CONSTANTINOU, A., EGLY, J. M., BOOTSMA, D. & J. H. J. HOEIJMAKERS. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. **The EMBO Journal**. Rotterdam, v.16 n.19 p.5955 – 5965, 1997.

GRINSVEN, K. W. A., ABBEELE, J. V. D., BOSSCHE, P. V. D., HELLEMOND, J. J. V. & A. G. M. TIELENS. Adaptations in the Glucose Metabolism of Procyclic *Trypanosoma brucei* Isolates from Tse-tse Flies and during Differentiation of Bloodstream Forms. **Eucaryotic Cell**. Rotterdam, v. 8, n. 8, p. 1307 – 1313, 2009.

GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; BLANCO, M. T. A.; UMEZAWA, E.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M.; AÑEZ, N. & J. L. RAMIREZ. Expression of Fluorescent Genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma Rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Its Application to Parasite – Vector Biology. **Journal of Medical Entomology**. Caracas, v. 42, n. 1, p. 48 – 56, 2005.

GÜRTLER, R. E., SEGURA E. L. & J. E. COHEN. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. Louisiana, v. 9, n. 1, p. 29 – 32, 2003.

HUANG, Y., BAXTER, R., SMITH, B. S., PARTCH, C. L., COLBERT, C. L. & J. DEISENHOFER. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. **PNAS**. Dallas, v. 103, n. 47, p. 17701 – 17706, 2006.

IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A., MURPHY, L., AGGARWAL, G., BERRIMAN, M., SISK, E., RAJANDREAM, M., ADLEM, E., AERT, R., ANUPAMA, A., APOSTOLOU, Z., ATTIPOE, P., BASON, N., BAUSER, C., BECK, A., BEVERLEY, S. M., BIANCHETTIN, G., BORZYM, K., BOTHE, G., BRUSCHI, C. V., COLLINS, M., CADAG, E., CIARLONI, L., CLAYTON, C., COULSON, R. M. R., CRONIN, A., CRUZ, A. K., DAVIES, R. M., GAUDENZI, J., DOBSON, D. E., DUESTERHOEFT, A., FAZELINA, G., FOSKER, N., FRASCH, A. C., FRASER, A., FUCHS, M., GABEL, C., GOBLE, A., GOFFEAU, A., HARRIS, D., FOWLER, C. H., HILBERT, H., HORN, D., HUANG, Y., KLAGES, S., KNIGHTS, A., KUBE, M., LARKE, N., LITVIN, L., LORD, A., LOUIE, T., MARRA, M., MASUY, D., MATTHEWS, K., MICHAELI, S., MOTTRAM, J. C., AUER, S. M., MUNDEN, H., NELSON, S., NORBERTCZAK, H., OLIVER, K., O'NEIL, S., PENTONY, M., POHL, T. M., PRICE, C., PURNELLE, E., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., REINHARDT, R., RIEGER, M., RINTA, J., ROBBEN, J., ROBERTSON, L., RUIZ, J. C., RUTTER, S., SAUNDERS, D., SCHAFER, M., SCHEIN, J., SCHWARTZ, D. C., SEEGER, K., SEYLER, A., SHARP, S., SHIN, H., SIVAM, D., SQUARES, R., SQUARES, S., TOSATO, V., VOGT, C., VOLCKAERT, G., WAMBUTT, R., WARREN, T., WEDLER, H., WOODWARD, J., ZHOU, S., ZIMMERMANN, W., SMITH, D. F., BLACKWELL, J. M., STUART, K. D., BARRELL, B. & P. J. MYLER. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**. New York, v. 309, p. 436 – 444, 2005.

KOEHLER, D. R., COURCELLE, J. & P. C. HANAWALT. Kinetics of Pyrimidine (6 - 4) Pyrimidone Photoproduct Repair in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. California, v. 178, n. 5, p. 1347 – 1350, 1996.

LIEDVOGEL, M. & H. MOURITSEN. Cryptochromes – a potential magnetoreceptor: What do we know and What do we want to know. **The Journal of Royal Society Interface**. Oldenburg, v. 7, p. 147 – 162, 2010.

LI, J., UCHIDA, T., TODO, T. & T. KITAGAWA. Similarities and Differences between Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase and (6 - 4) Photolyase as revealed by Resonance Raman Spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**. Okazaki, v. 281, n. 35, p. 25551 – 25559, 2006.

LIMA-BESSA, K. M., ARMELINI, M. G., CHIGANÇAS, V., JACYSYN, J. F., MENDES, G. P. A., SARASIN, A. & C. F. M. MENCK. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. **DNA Repair**. São Paulo, v. 7, n. 2, p. 303 – 312, 2008.

LIU, Z., TAN, C., GUO, X., KAO, Y., LI, J., WANG, L., SANCAR, A. & D. ZHONG. Dynamics and Mechanism of Cyclobutane Pyrimidine Dimer repair by DNA photolyase. **PNAS**. Columbus, v. 108, n. 36, p. 14831 – 14836, 2011.

KLINGBEIL, M. M & P. T. ENGLUND. Closing the Gaps in Kinetoplast DNA network replication. **PNAS**. Baltimore, v. 101, n. 13, p. 4333 – 4334, 2004.

KROPF, S. P. Carlos Chagas e a Descoberta de uma nova Tripanossomíase Humana. **Casa de Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2004.

KNÜSEL, S. & I. RODITI. Insights into the Regulation of GPEET procyclin during Differentiation from Early to Late procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. Bern, v. 191, p. 66 – 74, 2013.

KULMS, D., POPPELMANN, B., YAROSHI, D., LUGER, T. A., KRUTMANN, J. & T. SCHWARZ. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the

induction of apoptosis in human cells exposed to UV-B irradiation. **National Academic of Science**. Washington, v. 96, p. 7974 – 7979, 1999.

LLEDÓ, J. I. L. & M. LINCH. Evolution of Mutation Rates: Phylogenomic Analysis of Photolyase/ Cryptochrome Family. **Molecular Biology and Evolution**. Bloomington, v. 26, n. 5, p. 1143 – 1153, 2009.

LIEDVOGEL, M. & H. MOURISTSEN. Cryptochromes – a potential magnetoreceptor: What do we know and what do we want to know? **Journal Royal Society Interface**. Oldenburg, v. 7, p. 147 – 162, 2009.

MACHADO, C. R., PINTO, A. L., McCULLOCH, R & S. M. R. TEIXEIRA. DNA Metabolism and Genetic Diversity in Trypanosomes. **Mutation Research**, Belo Horizonte, v. 612, p. 40 – 57, 2006.

MACLEOD, A., TAIT, A. & M. R. TURNER. The populations genetics of *Trypanosoma brucei* and the Origen of Human Infectivity. **The Royal Society**. Glasgow, v. 356, p. 1035 – 1044, 2001.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 9, p. 1153 – 64, 2008.

MITCHELL, J. R., HOEIJMAKERS, J. H. & L. J. NIEDERNHOFER. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current Opinion in Cell Biology**. Rotterdam, v. 15, n. 2, April, p. 232 – 240, 2003.

MOURA M. B., B. L. F. SCHAMBER-REIS, & D. G. P. SILVA. Cloning and characterization of DNA polymerase η from *Trypanosoma cruzi*: roles for translesion bypass of oxidative damage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Belo Horizonte, v. 50, n. 5, p. 375 – 386, 2009.

NARE, B., GARRAWAY, L. A., VICKERS, T. J. & S. M., BEVERLEY. PTR1-dependent synthesis of tetrahydrobiopterin contributes to oxidant susceptibility in the

trypanosomatid protozoan parasite *Leishmania major*. **Current Genetics**. Washington, v. 55, n. 3, p. 287 – 299. 2009

NAKABEPPU, Y., KAJITANI, K., SAKAMOTO, K., YAMAGUCHI, H. & D. TSUCHIMOTO. MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, prevents the cytotoxicity and neurotoxicity of oxidized purine nucleotides. **DNA Repair**. Tokyo, v. 5, n. 7, p. 761 – 772. 2006.

NEWMAN, J. C., BAILEY, A. D., FAN, H. Y., PAVELITZ, T. & A. M. WEINER. An Abundant Evolutionarily Conserved CSB-Piggy Bac Fusion Protein Expressed in Cockayne Syndrome. **PLoS Genetics**. Seattle, v. 4, n. 3, p. 1 – 14. 2008.

NOUSPIKEL, T. Nucleotide Excision Repair: Variations on Versatility. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Sheffield, v. 66, n. 6, p. 994 – 1009, 2009.

POKORNY, R., KLAR, T., HENNECKE, U., CARELL, T., BATSCHAUER, A. & L. O. ESSEN. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. **PNAS**. Munich, v. 105, n. 52, p. 21023 – 21027, 2008.

PRAKASH, L. Repair of pyrimidine dimers in nuclear and mitochondrial DNA of yeast irradiated with low doses of ultraviolet light. **Journal of Molecular Biology**. New York, v. 98, n. 4, p. 781 – 795, 1975.

RAJÃO, 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.

RASTOGI, R. P., KUMAR. R. A, TYAGI, M. B., & R. P. SINHA. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids**. Varanasi, p. 1 – 32, 2010.

RASTOGI, R. P., SINGH, P. S., HADER, D. P. & R. P. SINHA. Ultraviolet – B-induced DNA damage and photorepair in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC7937. **Environmental and Experimental Botany**. Varanasi, v. 74, p. 280 – 288, 2011.

SÁ, M. R. The history of tropical medicine in Brazil: the discovery of *Trypanosoma cruzi* by Carlos Chagas and the German School of Protozoology. **Parasitologia**, v. 47, n.3, p. 309 – 317, 2005.

SANCAR, A. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-light Photoreceptors. **American Chemical Society**. North Caroline, v. 103, p. 2203 – 2237, 2003.

SELBY, C. P. & A. SANCAR. The Second Chromophore in Drosophila Photolyase/ Cryptochrome Family Photoreceptors. **American Chemical Society**. North Caroline, v. 51, p. 167 –171, 2011.

SCHMUNIS, G. A. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 94, p. 93 – 101, 1999.

SCHUL, W., JANS, J., RIJKSEN, Y. M. A., KLEMANN, K. H. M., EKER, A. P. M., DE WIT, J., NIKAIDO, O., NAKAJIMA, S., YASUI, A., HOEIJMAKERS, J. H. J. & G. T. J. VAN DER HORST. Enhanced Repair of Cyclobutane Pyrimidine Dimers and improved UV Resistance in Photolyase Transgenic mice. **The EMBO Journal**. Rotterdam, v. 21, n. 17, p. 4719 – 4729, 2002.

SIEGEL, T. N., HEKSTRA, D. R., KEMP, L. E., FIGUEIREDO, L. M., LOWELL, J. E., FENYO, D., WANG, X., DEWELL, S. & G. A. CROSS. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes Dev**. n. 23, p. 1063 – 1076, 2009.

SILVA, D. G. P., RAJÃO, M. A., AGUIAR, P. H. N., ROCHA, J. P. V., MACHADO, C. R., & C. FURTADO. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma*

brucei and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**. Belo Horizonte, v. 1, p 1 – 14, 2010.

SIMO, G., NJITCHOUANG, G. R., NJIOKOU, F., CUNY, G & T. ASONGANYI. Genetic Characterization of *Trypanosoma brucei* Circulating in Domestic Animals of the Fontem Sleeping Sickness of Cameroon. **Microbes and Infection**. Yaoundé, v. 14, p. 651 – 658, 2012.

SIMPSON, A. G. B., STEVENS, J. R. & J. LUKES. The Evolution and Diversity of Kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitology**. Halifax, n. 22, v. 4, p. 168 – 174, 2006.

SINHA, R. P. & D. P. HÄDER. UV-induced DNA damage and repair. **Photochemical & Photobiological Sciences**. Erlangen, v. 1, p. 225–236, 2002.

TANIDA, S., MIZOSHITA, T., OZEKI, K., TSUKAMOTO, H., KAMIYA, T., KATAOKA, H., SAKAMURO, D., & T. JOH. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. **International Journal of Surgical Oncology**. Nagoya, v. 2012, p 1 – 8. 2005.

TAKAHASHI, M., TERANISHI, M., ISHIDA, H., KAWASAKI, J., TAKEUCHI, A., YAMAYA, T., WATANABE, M., MAKINO, A. & J. HIDEWA. Cyclobutane Pyrimidine Dimer (CPD) photolyase Repairs Ultraviolet-B-induced CPDs in rice Chloroplast and Mitochondrial DNA. **The Plant Journal**. Sendai, v. 66, p. 433 – 442, 2011.

TEIXEIRA, S. M., PAIVA, R. M., KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. & W. D. DAROCHA. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetic Molecular and Biological**. v. 35, p.1 - 17, 2012.

THIAGARAJAN, V., BYRDIN, M., EKERE, A. P. M., MÜLLER, P. & K. BRETTEL. Kinetics of Cyclobutane Thymine Dimer splitting by DNA photolyase Directly monitored in the UV. **PNAS**. Pasadena, v. 108, n. 23, p. 9402 – 9407, 2011.

THOMA, F. Repair of UV lesions in nucleosomes-intrinsic properties and remodeling. **DNA Repair**. Amsterdam, v. 4, n. 8, p. 855–869, 2005.

TOMO VIII. Tripanossomiase Americana forma Aguda da molestia pelo Dr Carlos Chagas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 38 – 68, 1916.

VASSELLA, E., ACOSTA-SERRANO, A., STUDER, E., LEE, S. H., ENGLUND, P. T., & I. RODITI. Multiple Procyclin Isoforms are Expressed Differentially during the Development of Insect forms of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Molecular Biology**. Bern, v. 312, p. 597 – 607, 2001.

VROUWE, M. G., PINES, A., OVERMEER, R. M., HANADA, K. & L. H. F. MULLENDERS. UV-induced Photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling Cell through Nucleotide Excision Repair- dependent an independent pathways. **Journal of Cell Science**. Leiden, v. 124, n. 3, p. 435 – 444, 2010.

WEBER, S. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. **Biochimica et Biophysica Acta**. Berlin, v. 1707, n. 1, p. 1 - 23, 2005.

WITKIN, M. E. Ultraviolet – induced Mutation and DNA Repair. **Annual Review of Microbiology**. New York, v. 23, p 525 – 553, 1969.

WHEELER, R. J., SCHEUMANN, N., WICKSTEAD, B., GULL, K., & S. VAUGHAN. Cytokinesis in *Trypanosoma brucei* differs between Bloodstream and Tsetse Trypomastigote forms: Implications for Microtubule-based Morphogenesis and Mutant Analysis. **Molecular Microbiology**. Oxford, p. 1 – 17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease** (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 30 de Setembro de 2013.

YAMAMOTO, J., MARTIN, R., IWAI, S., PLAZA, P. & K. BRETTEL. Repair of the (6–4) Photoproduct by DNA Photolyase Requires Two Photons. **Angewandte Chemie International Edition**. Osaka, v. 52, p. 1 – 6. 2013.

YASUI, A. & P. M. EKER. DNA photolyases . **DNA Damage and Repair**. Totowa, v. 2, p. 9 – 32, 1998

YASUI, A., YAJIMA, H., KOBAYASHI, T., EKER, A. & A. OIKAWA, A. Mitochondrial DNA repair by photolyase. **Mutation Research**. Totowa, v. 273, p. 231 – 236, 1992.

Yi, C. & C. He. DNA Repair by Reversal of DNA Damage. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**. Beijing v. 1, p. 1 – 18, 2013.

ZUMA, A. A., CAVALCANTI, P. D., MAIA, P. C. M., SOUSA, W. & M. C. M. MOTTA. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 449 – 456, 2011.