

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Wesley Roger Rodrigues Ferreira

DESVENDANDO O REPARO DE DNA MITOCONDRIAL EM *Trypanosoma cruzi*

**Belo Horizonte/MG
Julho, 2019**

Wesley Roger Rodrigues Ferreira

DESVENDANDO O REPARO DE DNA MITOCONDRIAL EM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Carlos Renato Machado

**Belo Horizonte/MG
Julho, 2019**

043 Ferreira, Wesley Roger Rodrigues.
 Desvendando o reparo de DNA mitocondrial em Trypanosoma cruzi [manuscrito] /
 Wesley Roger Rodrigues Ferreira. – 2019.
 77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Renato Machado.

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

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Doença de Chagas. 3. Reparo do DNA. 4. Mitocôndrias. 5. Doxorrubicina. 6. Trypanosoma cruzi. I. Machado, Carlos Renato. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



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

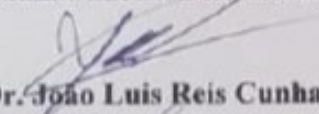


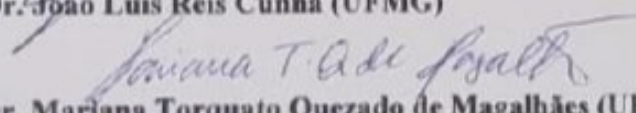
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE WESLEY ROGER RODRIGUES FERREIRA. Aos dezenove dias do mês de julho de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Desvendando o reparo de DNA mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*""", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. João Luis Reis Cunha (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

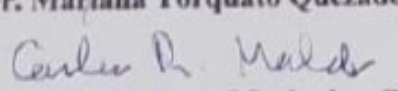
☒ APROVADO

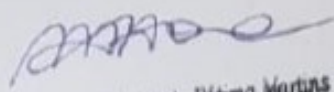
☐ REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de julho de 2019.


Dr. João Luis Reis Cunha (UFMG)


Dr. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)


Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)


Prof. Maria de Pátima Martins Horta
Sub Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB-UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **prof. Dr. Carlos Renato Machado** pelos ensinamentos, pelas discussões e orientações quando necessárias, por incentivar a curiosidade e demonstrar todo o amor pela ciência nesses 2 anos.

Não posso deixar de agradecer em especial a **Bruno Marçal Repolês**, que durante esses 2 anos no laboratório me ajudou e me ensinou e me incentivou a discutir resultados constantemente.

Agradeço aos professores do Laboratório, por todas as sugestões e ajuda no decorrer desse projeto, **prof^a. Dr^a. Glória Regina Franco; Prof^o Dr. Erich Birelli Tahara e Prof^o Andrea Mara Macedo**.

Aos meus amigos do Grupo de Reparo, estes que conviveram comigo todos esses tempos árduos, mas de extrema satisfação **Antônio, Augusto, Bruno Rezende, Clara, Héllida, Lara, Roberto, Veronica e William**.

À **Lorrane**, por colocar ordem no laboratório e nos aguentar no dia a dia.

Agradeço a todos os meus antigos amigos de Divinópolis e aos novos que foram surgindo nessa nova etapa e a todos os alunos do LGB. Agradeço a **Fabiane**, por ter me apoiado e me ajudado em momentos difíceis.

Agradeço a **equipe do GIZ**, os que estiveram no início e os que estão agora, em especial aos funcionários, que tanto nos ensinam. Foi um momento de muita aprendizagem e de grande diferencial, fica o meu muito obrigado!

Agradeço também ao **CNPQ** pela bolsa. Assim como a **FAPEMIG** e a **CAPES**, por suporte e financiamento.

Agradeço a **UFMG** e ao programa de **pós-graduação** por essa oportunidade!

“O conhecimento não seja um rio, reto e perigoso, mas
intricada rede de córregos empapando a terra que povoam.” -
Danilo Gandin

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, pertence à ordem Kinetoplastida, e como tal, possui uma mitocôndria única e alongada, chamada cinetoplasto. Nosso objetivo neste trabalho foi estudar as vias de reparo de DNA que possam estar envolvidas na manutenção do DNA do cinetoplasto de *T. cruzi*. Embora tenhamos evidências da ocorrência dos processos de reparo nas mitocôndrias do *T. cruzi*, ainda não se sabe quais proteínas e vias estão associadas à organela. Formas epimastigotas de *T. cruzi* Cl Brener (WT), heminocautes de TcRad51 (envolvido na recombinação homologa) e TcCSB (envolvido no reparo por excisão de nucleotídeos), além da cepa superexpressora de TcCSB foram utilizadas. Após tratamento com MMS, capaz de gerar quebras de fita dupla no DNA que são reparadas por recombinação homologa, foi visto que a cepa deficiente em TcRad51 foi mais sensível quando comparada com a cepa selvagem. Para verificar se a maior sensibilidade poderia estar relacionada com a deficiência no processo de reparo de DNA mitocondrial nestes mutantes, foi feita a quantificação dos danos do kDNA. Após o tratamento com MMS, observamos uma diferença na cinética de reparo entre as duas cepas. Além da sensibilidade ao MMS, também verificamos que o heminocaute de TcRad51 é mais sensível ao tratamento com drogas direcionadas especificamente para a mitocôndria e que são capazes de causar quebras de fita dupla por outros meios. Ensaio com doxorrubicina direcionada à organela, uma droga capaz de causar problemas de transcrição e replicação, demonstraram que na mitocôndria de *T. cruzi*, existem vias de metabolismo relacionadas com estes danos. Células heminocaute e superexpressora de CSB, após exposição à esta droga, demonstraram claramente um envolvimento dessa enzima no metabolismo de reparo do kDNA. Juntos estes resultados sugerem que TcRad51 e TcCSB estão envolvidas no reparo do DNA mitocondrial de *T. cruzi*, apesar de não ter sido determinado se estes genes estão exercendo as funções canônicas que se esperam deles. A influência de TcRad51 nos dois momentos de reparo do dano gerado por MMS sugere que as vias de reparo mitocondrial podem ser distintas entre núcleo e mitocôndria.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Reparo de DNA; Mitocôndrias; *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease – one of the seventeen neglected tropical diseases –, is a member of the Kinetoplastida order and, as such, has a single, elongated mitochondria named kinetoplast. In this study we investigated the DNA repair pathways that are responsible to maintain the integrity of the kinetoplastid genome (kDNA) from *T. cruzi*. Although we have evidences about the conduction of DNA repair to some extent in the maintenance of the kDNA, this process and proteins involved in this metabolism are not yet described. In this work we used wild-type and mutant epimastigotes of *T. cruzi* clone CL Brener, namely (i) single knockout strain for TcRAD51 (a gene which encodes a protein involved in homologous recombination); (ii) a single knockout strain for TcCSB (a gene which encodes a protein involved in nucleotide excision repair); and (iii) a strain overexpressing TcCSB. After treatment with MMS, an agent capable of generating double strand breaks to the DNA molecule – a damage repaired by homologous recombination –, we verified that the TcRAD51 deficient strain was more sensitive to the treatment. In order to verify whether the difference observed is associated to kDNA repair, we further performed the quantification of DNA damage. After the treatment with MMS, we observed a difference in the kinetics of DNA repair between both strains. In addition, we verified that TcRAD51 single knockout is more sensitive to agents capable of generating double strand breaks by distinct mechanisms. Mitochondria-oriented doxorubicin assays – a drug capable of causing transcription and replication problems – demonstrated that, in *T. cruzi* kinetoplast, there are pathways related to these damages. Single knockout and overexpressing TcCSB cells, following exposure to this compound, demonstrated an involvement of TcCsb with kDNA repair metabolism. These results suggest that TcRad51 and TcCSB are involved in kDNA repair in *T. cruzi*, although the exact mechanisms by which these proteins in *T. cruzi* mitochondria have yet to be determined. The influence of TcRad51 in the two repair moments in the damage generated by MMS also suggests that the mitochondrial repair pathways may be distinct from that one conducted in the nucleus.

Keywords: Chagas disease; DNA repair; Mitochondria; *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS 3 FORMAS DE VIDA DO <i>TRYPANOSSOMA CRUZI</i> ..	14
FIGURA 2 - ESQUEMA DO CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSSOMA CRUZI</i>	15
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DO kDNA.	18
FIGURA 4 - ESQUEMA DO MODELO ATUAL DE REPLICAÇÃO DO kDNA.....	20
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MMS.	22
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORAMBUCIL-ALVO-MITOCÔNDRIA (MT-CBL).....	24
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DOXORRUBICINA-ALVO-MITOCÔNDRIA (MT-DOX).....	25
FIGURA 8 – REPARO POR EXCISÃO DE BASES	28
FIGURA 9 – VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO (NER)	31
FIGURA 10 - RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM EUCARIOTOS	33
FIGURA 11 - CINÉTICA DO APARECIMENTO E DO REPARO DE DANOS NO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL	36
FIGURA 12 - GRÁFICO DE CITOMETRIA DE FLUXO, ...	46
FIGURA 13 - RESPOSTA ÀS LESÕES INDUZIDAS POR MMS.....	47
FIGURA 14 - RESPOSTA ÀS LESÕES INDUZIDAS POR MMS.....	48
FIGURA 15 - CINÉTICA DE REPARO DE LESÕES MITOCONDRIAIS CAUSADAS POR 1,5 mM DE MMS	50
FIGURA 16: CINÉTICA DE REPARO DE LESÕES MITOCONDRIAIS CAUSADAS POR 3MM DE MMS.	51
FIGURA 17 - LÂMINA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>T. CRUZI</i> , ...	53
FIGURA 18 - RESPOSTA À LESÕES CAUSADAS POR MT-CBL EM CÉLULAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	55
FIGURA 19 - RESPOSTA A LESÕES CAUSADAS POR 16 UM DE MT-DOX	57
FIGURE 20 - RESPOSTA A LESÕES CAUSADAS POR 32 UM DE MT-DOX	58
FIGURA 21 - RESPOSTA ÀS LESÕES CAUSADAS POR MT-DOX EM CÉLULAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	60
FIGURA 22 - CINÉTICA DO APARECIMENTO E DO REPARO DE DANOS NO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo por excisão de base
Cbl	Clorambucil
CPD	Dímero de pirimidina ciclobutano
CSA	Síndrome de Cockaine A
CSB	Síndrome de Cockaine B
DAPI	4-6-diamino-2-fenilindol
ddH₂O	Água duplamente destilada
DDR	Resposta ao dano de DNA
DMSO	DimetilSulfóxico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
Dox	Doxorrubicina
DSB	Quebra da dupla fita de DNA
ICL	Ligação Cruzadas entre o DNA
Kb	kilobase
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	liver infusion-tryptose
MMS	Metanossulfonato
MRN	Complexo de proteínas constituído por Mre11, Rad51 e Nbs1
mt-cbl	Clorambucil-alvo-mitocondria
mtDNA	Dna mitocondrial
mt-Dox	Doxorrubicina-alvo-mitocondria
NER	Reparo por excisão de Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
qPCR	PCR quantitativa
T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TLS	Translesão
UV	ultravioleta
WT	Tipo selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Doença de Chagas e o Trypanossoma cruzi	13
1.2	Tratamento para a Doença de Chagas	16
1.3	Características estruturais do kDNA	16
1.4	Replicação do kDNA	19
1.5	Fontes de dano do DNA	20
1.5.1	Compostos alquilantes	22
1.5.1.1	Metanossulfonato de metila (MMS)	22
1.5.1.2	Clorambucil (Cbl)	23
1.5.2	Composto inibidor da Topoisomerase	24
1.5.2.1	Doxorrubicina	24
1.6	Trypanossoma cruzi e a resposta genotóxica	25
1.7	Resposta ao Dano do DNA	26
1.8	Reparo por excisão de base (BER)	26
1.9	Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	29
1.10	Reparo por Recombinação homologa	32
1.11	Síntese Translesão	34
1.12	Vias de reparo do DNA mitocondrial	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Cultivo dos parasitos	38
3.2	Curvas de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos	38
3.2.1	Tratamento com Metanossulfonato de metila (MMS)	38
3.2.2	Tratamento com Clorambucil-alvo-mitocondria (Mt-Cbl)	39
3.2.3	Tratamento com Doxorrubicina-alvo-mitocondria (Mt-DOX)	39
3.3	Utilizando citometria de fluxo para medir integridade da Membrana Mitocondrial	39
3.4	Análise do número de lesões por Long Range qPCR	40
3.4.1	Tratamentos genotóxicos para análise de número de lesões	40
3.4.2	Extração de DNA de alto peso molecular	40
3.4.3	Dosagem das amostras de DNA	41
3.4.4	Amplificação por qPCR	41
3.4.5	Análise dos resultados	43

3.5	Ensaio de microscopia fluorescente	44
3.6	Análises estatísticas.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Resultados com células heminocaute de TcRAD51	45
4.1.1	Detecção da Integridade Mitocondrial de células heminocaute de TcRad51	45
4.1.2	Resposta do <i>T. cruzi</i> com o agente genotóxicos MMS.....	46
4.1.2.1	Resposta de <i>T. cruzi</i> a 1,5 mM de MMS	47
4.1.2.2	Resposta do <i>T. cruzi</i> a 3 mM de MMS.....	47
4.1.2.3	Quantificação do Dano mitocondrial pelo MMS.....	49
4.1.2.4	Quantificação do Dano mitocondrial 1,5 e 3 mM de MMS.....	49
4.1.2.5	Avaliando efeitos genotóxicos apenas no kDNA do <i>T. cruzi</i>	51
4.1.2.6	Ensaio de localização do peptídeo direcionador em <i>T. cruzi</i>	51
4.1.2.6	Resposta do <i>T. cruzi</i> a mt-cbl	53
4.1.2.7	Resposta do <i>T. cruzi</i> a mt-DOX	56
4.2	Resultados com células heminocaute e superexpressoras de TcCSB	59
4.2.1	Resposta do <i>T. cruzi</i> a mt-DOX	59
5	DISCUSSÃO	61
6	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e o *Trypanossoma cruzi*

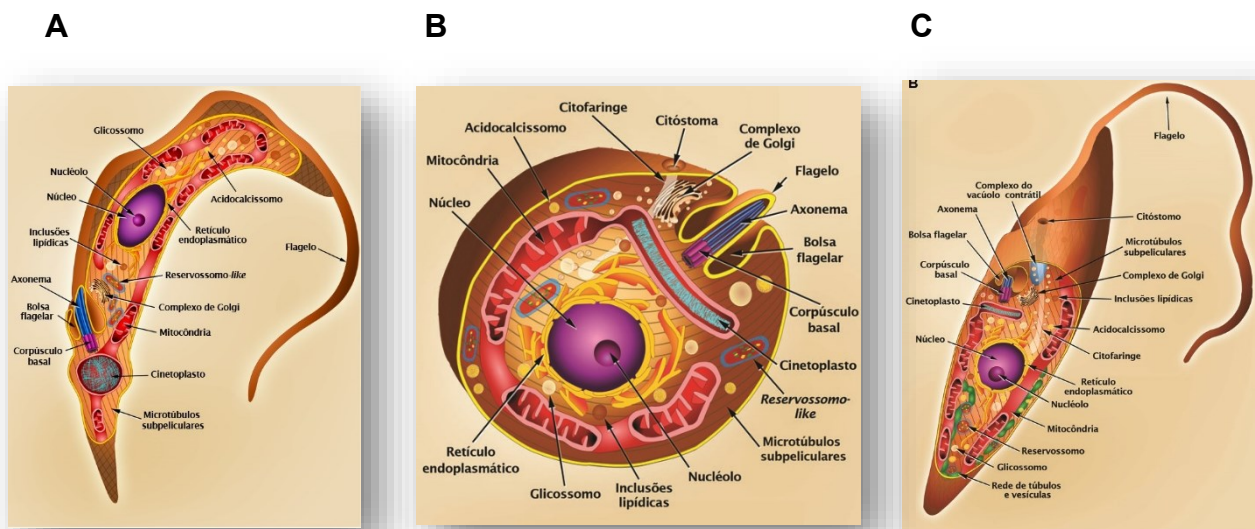
O *Trypanossoma cruzi* foi identificado como o agente causador da doença de chagas em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Chagas, e até hoje continua sendo um grande problema social da saúde pública da América Latina. Ela é considerada pela OMS uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, afetando em sua grande parte as populações de baixa visibilidade e voz política. Estima-se que haja 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, e mais de 10 mil mortes por ano (Pérez-Molina, 2017; WHO, 2019). Essa doença é transmitida quando as fezes infectadas do vetor triatomíneo são inoculadas através de um local que houve o rompimento da barreira do epitélio, comumente relacionada diretamente com o próprio local da picada do vetor, ou até mesmo pelo contato das fezes com uma membrana mucosa intacta, como por exemplo os olhos e boca. A transmissão por vetores é limitada a áreas geográficas indo da América do Sul, América Central e algumas regiões da América do Norte. Porém, outras formas de infecção propagam a doença em regiões endêmicas e não endêmicas. Outros mecanismos de infecção incluem transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e a ingestão de comidas e bebidas contaminadas, mais frequente em regiões que a população selvagem do vetor é mais destacada. (Bern, 2015; Pérez-Molina, 2017; Carvalho, 2012, WHO, 2019).

Nas duas últimas décadas, a doença se espalhou para regiões não endêmicas, efeito esse relacionado diretamente pela globalização crescente, que em conjunto com outras formas de transmissão não vetorial da doença, levou a mesma para uma escala global (Bern, 2015).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, assumindo vários estágios de desenvolvimento e três formas celulares; em insetos vetores e hospedeiros mamíferos. No ser humano, um hospedeiro, como em todos os mamíferos que o parasito infecta ele assume duas formas celulares distintas, sendo o tripomastigota (**Figura 1A**) uma forma infectiva e não replicativa, apresentando em sua morfologia um flagelo que se estende ao longo da borda externa de uma membrana ondulante. Essa forma é responsável por gerar a infecção por todo o corpo do hospedeiro e

retroalimentar o ciclo. O amastigota (**Figura 1B**), que não possui flagelo, tem um formato oval e se multiplica dentro de vários tipos celulares nucleadas, preferindo as células de origem mesenquimal. O epimastigota (**Figura 1C**), apresentando em sua estrutura um flagelo emergindo do corpo basal e um disco de DNA do cinetoplasto (kDNA) próximo ao núcleo, é a forma replicativa que se encontra no intestino do triatomíneo (Martins-Melo, 2012; Souza, 1999; Tyler, 2011).

Figura 1 - Representação estrutural das 3 formas de vida do *Trypanosoma cruzi*.

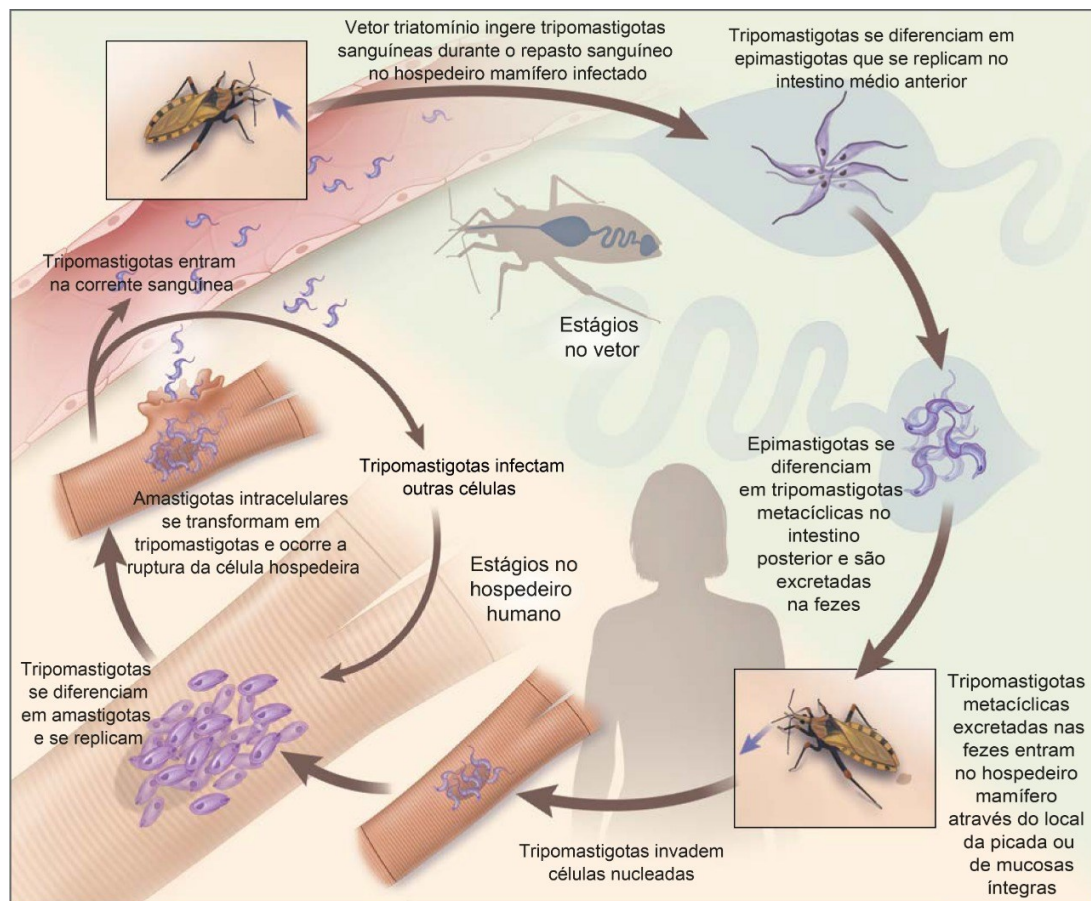


Legenda: **A)** Tripomastigota forma alongada, com cinetoplasto com formato arredondado localizado na região posterior ao núcleo, flagelo emergindo da bolsa flagelar que se localiza lateralmente, na região posterior do parasito. O flagelo emerge e se adere ao longo do corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior. **B)** Amastigota forma arredondada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo, flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) que emerge da bolsa flagelar. **C)** Epimastigota forma alongada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, e percorre aderido à parte do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior. Figura adaptada (Teixeira *et al.*, 2012).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia no vetor triatomíneo, quando o mesmo ingere tripomastigotas circulantes após se alimentar de um hospedeiro infectado. Os tripomastigostas se diferenciam para epimastigotas, e se alojam no intestino médio do vetor, iniciando o processo replicativo, posteriormente esses epimastigotas migram para a região final do intestino e se diferenciam em tripomastigota metacíclicos infecciosos. Os tripomastigotas são liberados pelas fezes do vetor que em contato

com uma ferida, comumente decorrente da picada do mesmo, entram na corrente sanguínea e invadem muitos tipos celulares de células nucleadas. No citoplasma dessas células se diferenciam na forma amastigota intracelular e iniciam o processo de replicação por um período de 4 a 5 dias. No final desse período os amastigotas se diferenciam em tripomastigota, levando as células infectadas a se romperem e liberando os mesmos para a corrente sanguínea, onde esses parasitas circulantes estão susceptíveis a contaminar outros vetores ou reinfectar outras células para manter a infecção (**Figura 2**). (Bern, 2011; Bern, 2015).

Figura 2 - Esquema do Ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*



Legenda: O ciclo mostra as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. O barbeiro pica e deposita as fezes na pele do homem, que se infecta com formas tripomastigotas do *T. cruzi* através da ferida. Ao invadir células, se transformam em amastigotas e se multiplicam. Em seguida, se transformam em tripomastigotas, caindo na corrente sanguínea. Onde podem ser passados novamente para o barbeiro através de uma nova picada. Dentro barbeiro, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigosta. Figura adaptada (Ber 2015).

1.2 Tratamento para a Doença de Chagas

Atualmente o tratamento para a Doença de Chagas é comumente realizado pela utilização dos fármacos Benzonidazol (N-benzyl-2-nitro-imidazole-1-acetamida) e Nifurtimox (4[(5-nitrofurfurylidene)amino]-3-methylthiomophorline-1,1-dioxide). A utilização dos mesmos leva a um tratamento que envolve muitas complicações, tais como: efeitos colaterais severos, e baixo índice de proporção de cura, de apenas 5% a 20%, para pessoas que foram tratadas principalmente na fase aguda da doença (Bellera, 2013). Devido esses problemas, vários estudos buscam possíveis moléculas ativas, baseadas em alvos como proteínas essenciais à sobrevivência do parasito, proteínas específicas da mitocôndria entre outras. Estes alvos, comumente, são selecionados pela utilização de ferramentas de bioinformática, na busca de inibidores específicos para os mesmos. Um grande candidato a alvo terapêutico são as enzimas relacionadas ao metabolismo de DNA, e estes alvos se tornam mais atraentes se eles apresentam peculiaridades únicas no metabolismo de DNA do parasito e sejam essenciais para a vida deste parasito. Além de ser um potencial alvo terapêutico, o estudo do metabolismo de DNA permite compreender um aspecto importante da biologia básica do *T. cruzi*. (Cançado, 2002; Rajão, 2014; Silva Paes, 2011; Zuma, 2011).

1.3 Características estruturais do kDNA

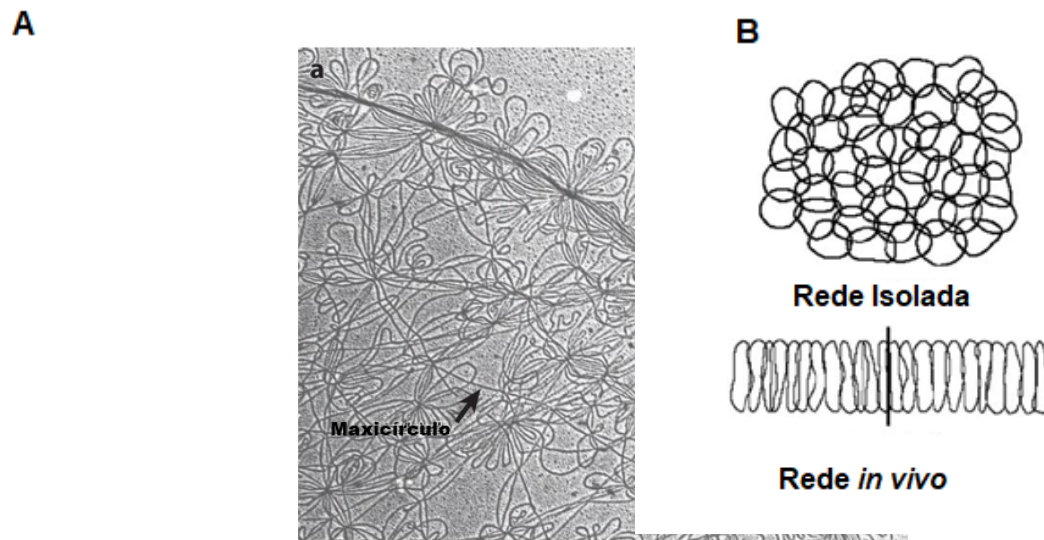
O *Trypanosoma cruzi* pertence a ordem Kinetoplastidae e, assim como os demais membros dessa ordem, apresenta apenas uma única mitocôndria, extremamente grande, percorrendo todo o corpo celular do parasito. Essa mitocôndria, denominada cinetoplasto, apresenta DNA próprio, chamado de DNA do Cinetoplasto (kDNA). Ele é um dos DNAs mitocondriais com organização mais complexa (Jensen, 2012), possui estrutura composta por uma rede de milhares de DNAs circulares que estão interligados entre si concatenados; sendo subdivididos em duas unidades básicas de DNA circulares, os maxicírculos e os minicírculos (**Figura 3**).

A evolução do cinetoplasto ainda necessita de mais estudos, o que já é descrito e aceito é que a estrutura do kDNA de *Cryptobia heliis* (chamada de pan-kDNA,

apresenta minicírculos dispostos em monômeros, de forma semelhante à organização de plasmídeos e maxicírculos superenovelados) seria então a forma ancestral de organização dessa organela. Com a evolução esse organismo seguiu dois caminhos distintos, levando a uma separação entre aqueles que apresentam anéis concatenados (como *T. cruzi* e *T. brucei*) e os que apresentam a estrutura de mega-kDNA (como *T. borreli*). A perda da estrutura de superenovelamento acarretou à compactação dos minicírculos e organização destes em locais onde são necessários para outros processos, como a edição de RNA. Esta compactação levou à formação de uma organização em disco e ao aumento da complexidade desta estrutura com a agregação de mais cópias destas moléculas pequenas de DNA (Lukes, 2002, Krasnow, 1982).

Os maxicírculos variam de 20 a 40 kb, dependendo do organismo. Ele está presente em várias dúzias idênticas e são responsáveis por codificar os produtos génicos mitocondriais, como por exemplo proteínas da cadeia transportadora de elétrons, rRNAs e mRNAs (Westenberger, 2006; Emeson, 2000; Jensen, 2012; Simpson, 1999). Para produzir mRNAs funcionais, os transcritos do maxicírculo sofrem uma regulação ao nível pós transcricional por meio de edição de RNA que envolve a inserção e deleção de resíduos de Uridina, mediado por RNAs guias (gRNAs), codificados em sua maioria pelos minicírculos. Os minicírculos estão presentes em milhares de cópias e apresentam sequência genica diversa, apesar de possuírem tamanho similar que pode variar de 0,5 a 10 kb, dependendo do organismo. A única função relatada do DNA dos minicírculos, até o presente momento, é a codificação dos gRNAs (Westenberger, 2006; Emeson, 2000; Jensen, 2012; Simpson, 1999). Estudos em *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma Brucei* mostraram que todos os maxicírculos semelhante aos minicírculos vão se interligando, ajudando na formação da complexa estrutura em rede. Acredita-se que esse fenomeno aconteça nos kDNA de outras espécies (**Figura 3**) (Jensen, 2012; Shapiro, 1993).

Figura 3 - Organização do kDNA.



Legenda: A) estrutura do kDNA de *Crithidia fasciculata*, apontando em setas maxicirculos e minicirculos (**Adaptado Jensen 2012**). B) Estrutura do kDNA isolado e estrutura do kDNA *in vivo*.

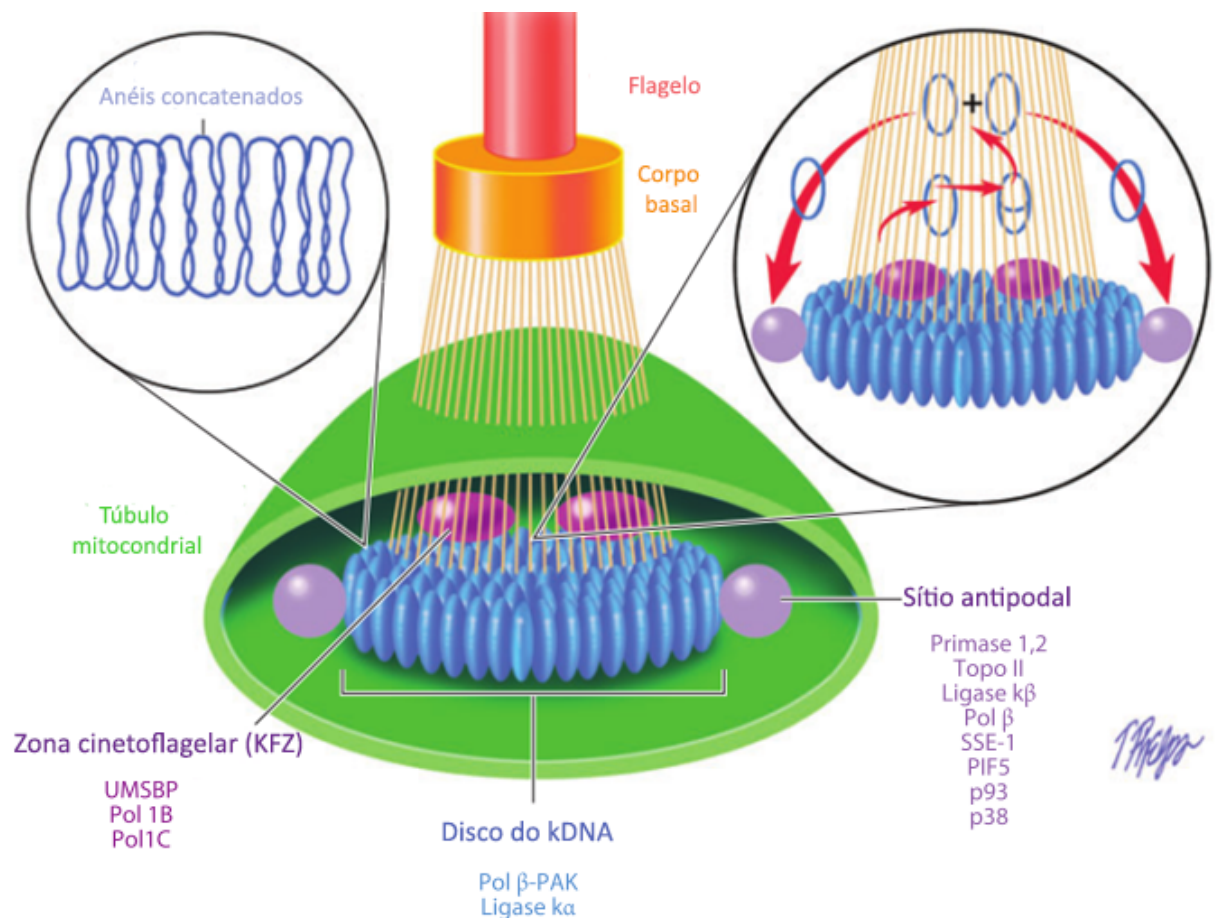
Estudos sobre o metabolismo do kDNA foram o marco inicial da descoberta de vários processos em eucariotos superiores, como por exemplo, a descrição de edição de RNA foi descrita primeiramente em *Trypanosoma brucei*, assim como os estudos sobre o complexo 1 da cadeia respiratória do *Trypanosoma brucei* foi crucial para descrever posteriormente uma variedade de homólogos existente em humanos (White, 2005). Mesmo assim, ainda são poucos os trabalhos que descrevem o metabolismo do DNA do cinetoplasto dos tripanossomatídeos, porém existem trabalhos que relacionam a replicação e edição de RNA à algumas proteínas associadas a essa organela. Recentemente, alguns grupos de pesquisa começaram a relatar algumas proteínas de reparo de DNA associadas ao kDNA. Porém, ainda não temos evidências suficientes de quais vias de reparo de DNA estão presentes na mitocôndria desses organismos. (Alfonzo, Thiemann e Simpson, 1997; Sturm e Simpson, 1990).

1.4 Replicação do kDNA

Quando as redes do kDNA foram descobertas, em 1970, não era entendido como estrutura tão complexa era replicada. Estudos mais atuais ajudam a entender um pouco o processo, mas ainda não completamente (Jensen, 2012). Até o momento, verificou-se que algumas proteínas de replicação do kDNA ficam distribuídas pela extensão do disco de DNA do cinetoplasto, porém existem algumas proteínas específicas localizadas em locais pontuais como a zona cinetoflagelar (KFZ) e os sítios antipodais. Estes sítios são compostos por dois conjuntos proteicos, orientados cerca de 180° em relação ao outro, localizado próximos a periferia do cinetoplasto (Abu-Elneel, 2001; Ferguson, 1992; Melendy, 1988; Ogbadoyi, 2002; Jensen, 2012).

Os minicírculos são replicados depois de serem desligados da rede e direcionados aos sítios KFZ, a replicação acontece de forma unidirecional, formando uma estrutura teta (Θ). Ao contrário dos outros organismos, os fragmentos de Okazaki não são retirados imediatamente, em vez disso, se mantêm até o DNA replicado ser transferido da zona KFZ para os sítios antipodais, em que a maioria dos fragmentos são removidos e as lacunas são reparadas e ligadas. Essa última parte é de extrema importância, pois esses minicírculos são reconhecidos pelas lacunas e são direcionados para a periferia da rede pela Topoisomerase II nos sítios antipodais. Os maxicírculos, diferentemente dos minicírculos, são replicados ainda conectados à rede (Melendy, 1988; Ryan, 1988; Ryan, 2015). É necessário que a maquinaria de replicação faça o reconhecimento dos que foram e não foram replicados e isso é possível justamente pela presença das lacunas deixada na replicação pela remoção tardia dos fragmentos de Okazaki (**Figura 4**) (Jensen, 2012).

Figura 4 - Esquema do modelo atual de replicação do kDNA



Legenda: Mostra o disco de kDNA, que é organizado com minicírculos empilhados paralelamente ao seu eixo. Localizações de proteínas de replicação. (Inserção esquerda) Uma seção aumentada de minicírculos mostram que eles estão esticados, ficam lado a lado e são concatenados para minicírculos vizinhos. Para replicação, minicírculos covalentemente fechados são liberados da rede para o KFZ, onde iniciam a replicação como estruturas teta. Os minicírculos são então anexados a periferia da rede pelo topo II. No final da replicação, minicírculos contendo pelo menos uma lacuna são reparados. Adptado (Jensen; 2012).

1.5 Fontes de dano do DNA

A manutenção da informação genética nos organismos é de extrema importância para perpetuação da vida. Lesões que levam a perda dessa informação são relacionadas com algumas doenças humanas, como o câncer e com o envelhecimento, porém vale salientar que a mutagênese também tem um papel

importante na evolução dos organismos (Friedberg, 2006). O DNA é uma molécula reativa e altamente suscetível a modificações por agentes endógenos e exógenos. Fatores endógenos podem envolver as próprias DNA polimerases envolvidas no processo de replicação e reparo, como também podem ser decorrentes de produtos ou subprodutos do próprio metabolismo, oriundos de reações de oxidação e hidrólise, como a desaminação da citosina que gera uracila, desaminação da 5-metilcitosina e em menor frequência a desaminação da guanina e adenina. Também vale ressaltar que existem modificações mediadas por moléculas circulantes da célula que acabam realizando oxidação e metilação do DNA, sobrecarregando assim as células com lesões, que se não reparadas são potencialmente desvantajosas (Chatterjee, 2017, Friedberg, 2006).

As fontes de danos exógenos são diversas, como a radiação ionizante, composta por raios alfa, beta, gama, nêutrons e raio X, muito abundante em nosso ambiente e sendo produzida de diversas fontes. A radiação ionizante pode danificar o DNA de forma direta ou até mesmo indiretamente, como por exemplo, levar a hidrólise da água, levando a formação de radical hidroxila e este é um agente oxidante altamente reativo (Vignard, 2013; Zhoub, 2015).

Outro tipo de radiação que danifica o DNA é a radiação ultravioleta (UV) que pode ser oriunda do sol e é atualmente a principal causa de câncer de pele. A luz UV é dividida em 3 classes baseada no comprimento de onda: UV-A (320-400 nm), UV-B (290nm-320nm) e UV-C (190nm a 209nm). O DNA absorve radiação no máximo a 290 nm, logo sendo alvo direto apenas da radiação UV-C, porém as outras radiações podem ser absorvidas por moléculas próximas que excitadas acabam lesionando o DNA (Chatterjee, 2017, Davies, 1995).

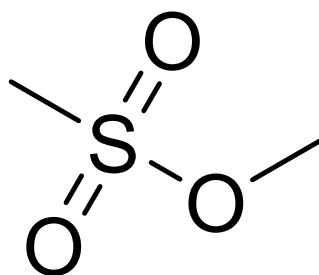
Os agentes alquilantes de fontes exógenas são produzidos principalmente por alimentos industrializados, fumaça de tabaco, queima de biomassa, agentes quimioterápicos, entre outros. Estes agentes, por afinidade química, acabam reagindo com o Nitrogênio das bases, o que leva a um processo de desestabilidade das mesmas (Pegg, 1990; Andreae, 1990; Friedberg, 2006; Lawley, 1966).

1.5.1 Compostos alquilantes

1.5.1.1 Metanossulfonato de metila (MMS)

O Metanossulfonato de metila (MMS do inglês *methyl methanesulfonate*) (**Figura 5**), é um dos agentes alquilantes mais comuns utilizados em laboratórios. O MMS reage com o DNA, levando a formação de lesões mutagênicas e carcinogênicas. As lesões mais comuns são a N3-metiladenina (11%) e N7-metilguanina (67%), formadas pela alquilação do Nitrogênio 3^{posição} da adenina e do nitrogênio 7^{posição} da guanina (Wyatt, 2006). A N3-metiladenina, das lesões geradas, é a única que tem a capacidade de bloquear a transcrição e a replicação, porém as metilações nas posições N3 e N7 das purinas, desestabiliza as ligações N-Glicosídicas, favorecendo o processo de hidrólises dessas bases, gerando assim sítios abásicos altamente mutagênicos e fortes bloqueadores das reações de polimerização (Beranek, 1990; Chatterjee, 2017). Entre suas atividades biológicas descritas, outra característica interessante do MMS é o seu envolvimento como indutor de quebra dupla de DNA (DSB), comprovado por estudos que demonstraram que a histona H2AX torna-se fosforilada (γH2AX, marcador biológico de DSB), em resposta ao dano provocado pelo MMS (Pascucci *et al.*, 2005; Trivedi *et al.*, 2005), porém ainda não foi bem elucidado se esse processo é direto ou se as depurinações e/ou a parada da DNA polimerase levam a essa lesão. (Wyatt, 2006; Chatterjee, 2017).

Figura 5 - Estrutura química do MMS.



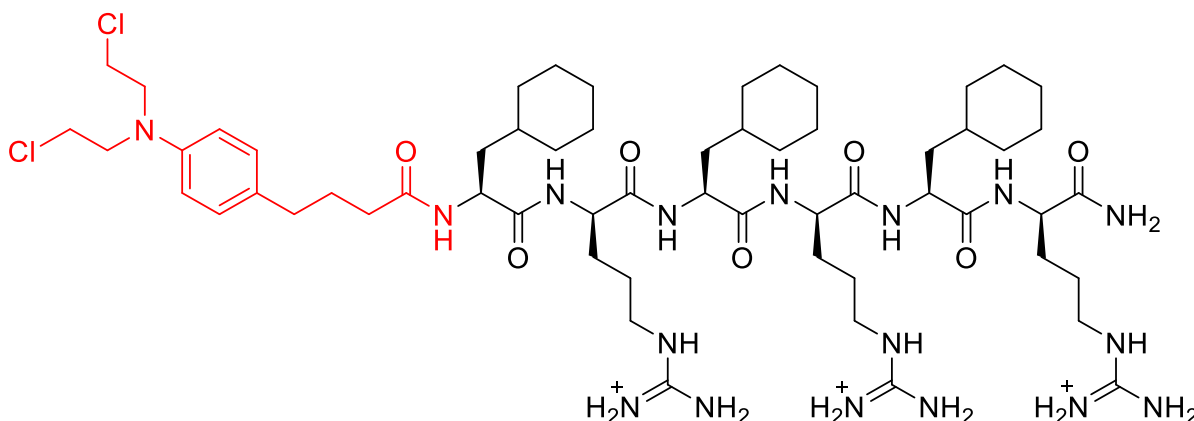
1.5.1.2 Clorambucil (Cbl)

Clorambucil (Cbl) é um poderoso composto alquilante. A sua mutagenicidade está diretamente relacionada com a sua capacidade de transferir um grupo alquila para os nitrogênios 7^{posição} da guanina ou 3^{posição} da adenina formando um mono adulto no DNA (Sanderson, 1996), e entre os Nitrogênio 7^{posição} e 2^{posição} de guaninas adjacentes, formando ligações entre cadeias (ICL do inglês *Interstrand cross-links*), sendo elas na mesma cadeia ou entre duas cadeias opostas (Hartley, 1992; Antonio, 2014; Wisnovsky, 2016). Essas lesões podem levar a complicações mais severas na inibição da replicação do DNA, induzindo fortemente a formação de DSB (Caporali, 2004).

Foi desenvolvido um método para direcionar essa droga apenas para a mitocôndria, pensando em evitar os mecanismos de resistência, como por exemplo, a inativação por enzimas citoplasmáticas e secreção extracelular dessa droga por canais na membrana plasmática. Foi desenvolvendo péptidos penetradores de mitocôndria (MPPs do inglês *mitochondria-penetrating peptides*), e ligados ao clorambucil, formando agora um composto nomeado Clorabucil-alvo-mitocôndria (mt-cbl do inglês *mitochondria targed clorabucil*) (**Figura 6**). A sequência peptídica foi projetada utilizando a sequência **Fx-r-Fx-r-Fx-r** (Fx= ciclohexilalanina, r =d-arginina); onde a ciclohexilalanina, foi pensada para introduzir hidrofobicidade para permitir assim a penetração nas membranas mitocôndrias. A adição da arginina com suas cargas catiônicas ajuda a captação através da barreira energizada da mitocôndria. Esse peptídeo apresenta uma tendência em formar uma α -hélice anfifílica; sendo ele totalmente composto por aminoácidos artificiais, que o tornam resistente a degradação intracelular (Horton, 2008; Fonseca, 2011; Wisnovsky, 2016).

Todas as atividades biológicas do Clorambucil foram confirmadas *in vitro* após o acoplamento ao MPP, além disso, foi mostrado que o mt-cbl acumulou especificamente na mitocôndria e potencializou a sua atividade em 100 vezes em comparação com o cbl (Fonseca, 2011).

Figura 6 - Estrutura química do Clorambucil-alvo-mitocôndria (mt-Cbl)



Legenda: Em vermelho clorambucil, em preto o peptídeo de captação mitocondrial.

1.5.2 Composto inibidor da Topoisomerase

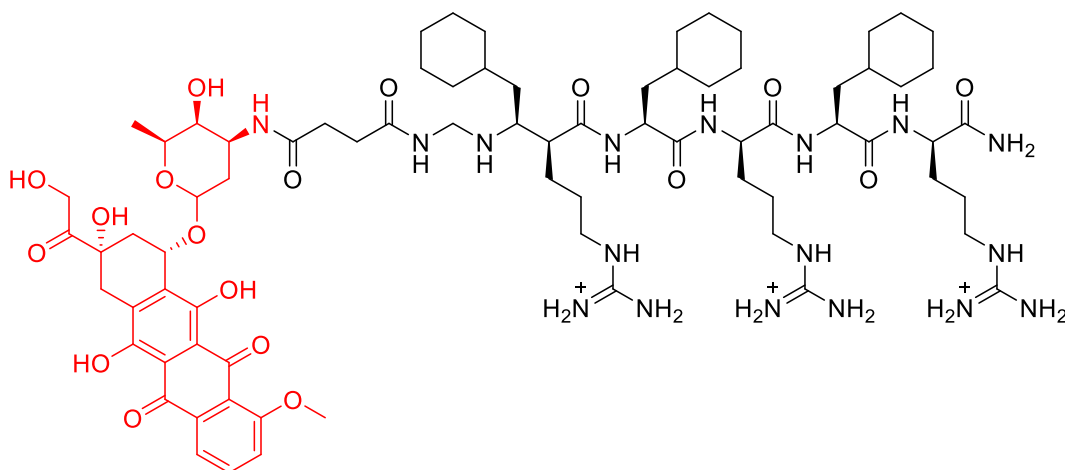
1.5.2.1 Doxorrubicina

A doxorrubicina (Dox), pertencente a classe das antraciclinas, tem uma variedade de mecanismos celulares e uma potente atividade citotóxica, acredita-se que o principal mecanismo seja pela capacidade de inibir Topoisomerase II, se ligando nela e formando um complexo Topo-DNA, interrompendo assim a replicação e a transcrição. Se não for reparado, essa ligação pode levar a formação de quebras da dupla fita de DNA, o que pode levar a indução da apoptose. Além disso, ela tem propriedades redox que levam ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando a peroxidação lipídica e a danos oxidativos no DNA. A Dox se localiza quase inteiramente no núcleo (Weiss, 1992; Pommier; 2013 ; Jean, 2015; Nitiss, 2009).

Assim como o Cbl, essa molécula também foi acoplada ao mesmo peptídeo de captação mitocondrial, descrito acima, sendo nomeada então Doxorrubicina-alvo-mitocôndria (mt-DOX) (**Figura 7**). Em comparação ao composto sem direcionador, o mt-DOX teve uma distribuição apenas na mitocôndria, resultado confirmado pela

ausência de DSB no núcleo dessas células e pela confirmação da localização realizada por ensaios de fluorescência. A presença dessa droga levou as mitocôndrias a um mal funcionamento (Jean, 2015).

Figura 7 - Estrutura química do Doxorrubicina-alvo-mitocôndria (mt-Dox).



Legenda: Em vermelho Doxorrubicina, em preto o peptídeo de captação mitocondrial.

1.6 *Trypanosoma cruzi* e a resposta genotóxica

Quando o *Trypanosoma cruzi* internaliza nos hospedeiros, algumas respostas imunes são apresentadas na fase aguda da infecção, ocorrendo assim à produção de substâncias genotóxicas, como óxido nítrico (NO) produzido pela isoforma induzida da enzima NO sintase, que é um mecanismo comum utilizado pelos macrófagos no combate deste e outros parasitos. Ao mesmo tempo, grandes quantidades de intermediários de espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) são produzidos pela NADPH oxidase, e expostos ao parasito com o objetivo de causar intensos danos nos componentes celulares, como as proteínas, lipídios de membranas, e lesão no DNA. Para se defender desses ataques, o *T. cruzi* apresenta uma série de defesas bioquímicas (Bogdan, 1999). Inicialmente deve lidar com um aumento muito significativo das espécies reativas de oxigênio.

Uma forma importante para responder a esses agentes é um sistema eficiente de reparo de DNA, para conter os danos provocados pelas espécies reativas que não

foram neutralizadas, tanto no seu genoma nuclear, como no mitocondrial. Dessa forma, se mostra importante entender sobre o metabolismo de DNA do *T. cruzi* para compreender os processos bioquímicos envolvidos que rompem essa barreira do sistema imune e elucidar melhor o processo de infectividade e sobrevivência desse parasito.

Contudo, para lidar com esses estresses as células são equipadas com um sistema complexo de reparo de DNA que é responsável por reparar, tolerar e até mesmo de sinalizar para a morte, caso não seja viável para a célula reparar ou continuar com aquela lesão. Esses sistemas atuam em conjunto para manter a homeostase celular (Friedberg 2006; Chatterjee, 2017).

1.7 Resposta ao Dano do DNA

Quando o DNA é danificado sensores específicos são ativados, iniciando a resposta ao dano do DNA (DDR). A DDR é responsável por sinalizar e ativar o sistema de reparo, o seu recrutamento é um processo altamente regulado, no qual seus fatores compostos por diversas proteínas são recrutados e montados em forma de cascata. A própria remodelação da cromatina mostra-se um importante modulador da resposta do DDR, pelos quais mudanças pós-traducionais ocorrem permitindo assim a montagem de fatores específicos do DDR, o que direciona para a via de reparo mais adequado para o referido tipo de lesão. (Ciccia, 2010; Harper, 2007; House, Koch, 2014; Polo, 2011; Chatterjee, 2017).

1.8 Reparo por excisão de base (BER)

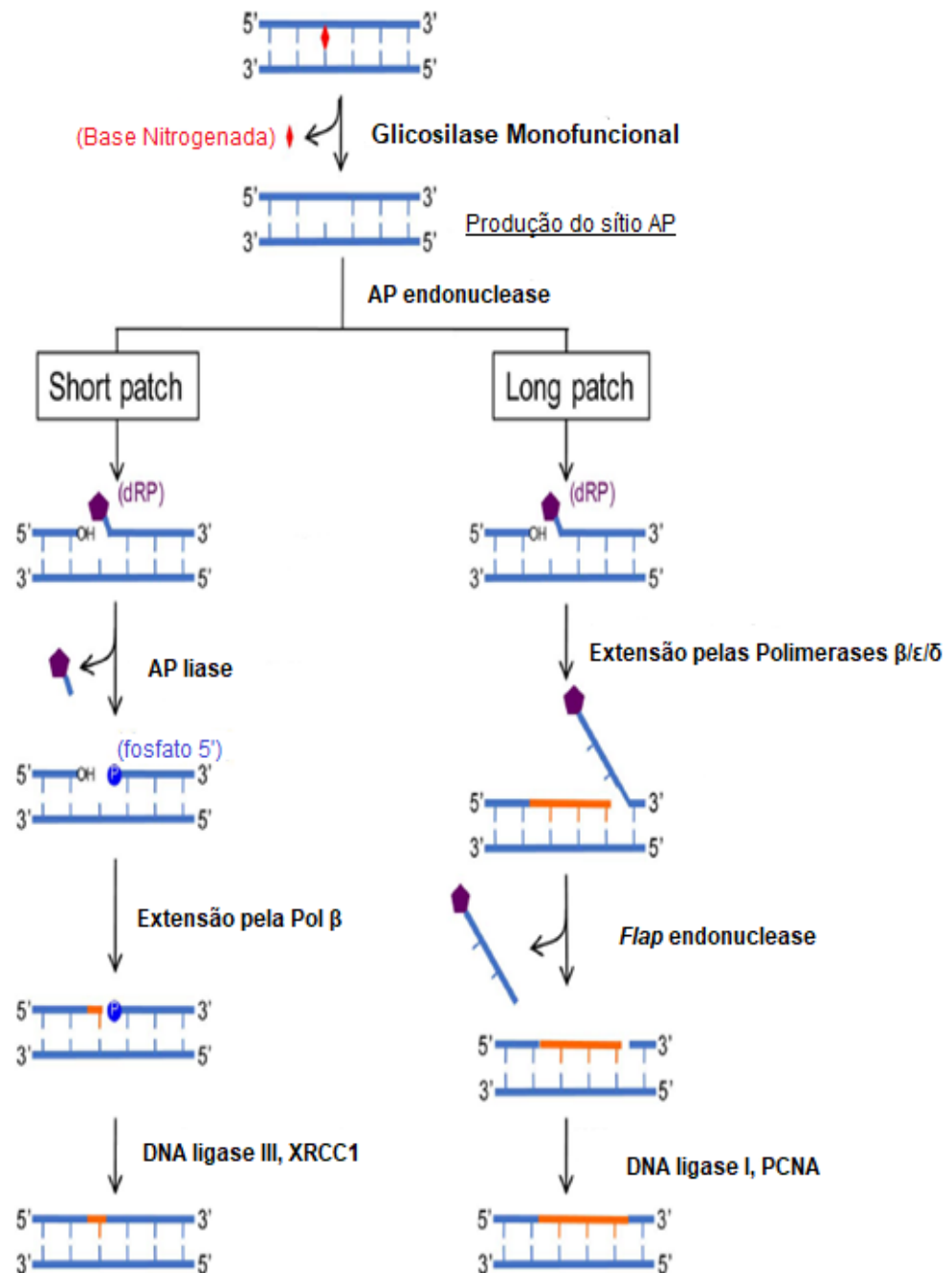
O Reparo por excisão de base (BER do inglês base excision repair) é um reparo que corrige danos de oxidação, desaminação, alquilação. Justamente por ser o reparo que lida com oxidação, que é um processo muito comum nas células (Hoeijmakers 2001, Friedberg , 2006). No núcleo esse processo acontece principalmente na fase G1 do ciclo celular (Dianov, 2013).

O BER se inicia pelo reconhecimento da lesão por uma classe de enzimas chamadas DNA glicosilases. Quando elas atuam são capazes de catalisar a hidrólise da ligação N-glicosil entre as bases nitrogenadas e o esqueleto de ribose fosfato do nucleotídeo, formando um sítio apurínico\apirimidínico. Existem dois tipos de DNA glicosilases, as monofuncionais e as bifuncionais, e dependendo de qual enzima está atuando podem apresentar dois caminhos distintos. Se for uma glicosilase monofuncional você terá a via denominada *short-patch* e se for uma bifuncional acarretará na via denominada *long-patch* (Chatterjee, 2017; Dianov, 2013; Odell, Wallace, 2013; Svilar, 2011).

Na via *short-patch*, o sítio abásico é o substrato para a AP-endonuclease que retira a base nitrogenada danificada, deixando uma ribose com o fosfato na extremidade 5', que é, então, retirado pela enzima AP liase, permitindo assim a exposição de uma extremidade 3'OH livre. Essa extremidade serve de sítio para uma DNA polimerase que irá preencher a lacuna gerada. Posteriormente uma DNA ligase liga a recessão e termina o reparo (**Figure 8 - esquerda**) (Almeida, 2007).

Na via *long-patch*, a glicosilase bifuncional faz duas funções, de retirar a base nitrogenada danificada e o esqueleto de ribose com fosfato, o que deixa a extremidade 3'OH disponível para a DNA polimerase. Porém, dessa vez, a DNA polimerase sintetiza mais nucleotídeos, isso leva a um deslocamento de até treze nucleotídeos que são removidos por uma endonuclease e ligados por uma DNA ligase finalizando o reparo (**Figure 8- direita**) (Akbari, 2009; Chen, 2015).

Figura 8 – Reparo por excisão de bases



Legenda: as sub-vias *short patch* (esquerda) e *Long patch* (direita). A lesão é removida por uma glicosilase. Em seguida, o esqueleto carbono-fosfato é clivado por uma AP endonuclease. Na *short patch*, o processamento da extremidade 5' e o preenchimento da lacuna são feitos pela Pol β, e a quebra é selada pela DNA ligase III acoplada a XRCC1. Na via longa, a incorporação de nucleotídeos é feita por Pol β ou Pol δ/ε, acompanhada por deslocamento de fita. A fita deslocada é removida por FEN1, e a ligação feita pela DNA ligase I. adaptado de (Meas, 2017)

No *Trypanossoma cruzi*, vários genes da via do BER já foram caracterizados (Passos-Silva, 2010). Já foram descritas diversas classes de DNA glicosilases, como as responsáveis pelo sistema GO. (Aguiar, 2013; Furtado, 2012). O sistema GO de reparo é específico para lidar com lesões comumente associadas à 8-oxoguanina (descrito, como o principal dano gerado pelas ROS).

1.9 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês *nucleotide excision repair*) é uma via responsável em remover lesões volumosas que levam a alterações na estrutura tridimensional do DNA, como os dímeros de ciclobutano (CPDs) formados a partir da ligação covalente entre duas pirimidinas, os fotos-produtos 6-4 (também chamados de foto-produtos pirimidinas-pirimidonas 6-4) formados pela ligação do carbono C6^{posição} de uma pirimidina com o carbono C4^{posição} da pirimidina adjacente, ambas lesões causadas pela radiação UV. Outra lesão reparada por essa via são os adutos de benzopirenos ocasionados principalmente pelo contato direto com o benzopireno encontrado principalmente na fumaça de cigarros. Também existem as lesões ocasionadas por agentes quimioterápicos como a cisplatina (Marteijn, 2014; Mitchell, Jen, 1991).

Foi uma das primeiras vias a ser elucidada em células de mamíferos, uma vez que essa via está envolvida com uma doença humana, o Xeroderma pigmentoso (XP) que é uma doença associada a uma predisposição para o câncer de pele. Além do XP, a deficiência do NER resultada em várias síndromes humanas diferentes, como a síndrome de Cockaine, uma rara doença que deixa as pessoas sensíveis a UV (Fousteri, 2006; Friedberg, 2006)

O NER, em comparação as outras vias de reparo, é a via que reconhece o maior tipo de danos distintos (Hoeijmakers, 2001; Marteijn, 2014; Mitchell, 1991). A via de reparo do NER é subdividida em duas vias, sendo uma pro genoma global (GG-NER) e a outra acoplada ao sistema de transcrição (TC-NER).

No GG-NER, o principal sensor de dano ao DNA é a proteína XPC (Xeroderma Pigmentoso, grupo de complementação C), associada com a proteína RAD23B e CETN2, esse complexo é responsável por identificar um DNA de fita simples

transitório (ssDNA) causado por mal pareamento, decorrido por uma lesão no DNA (Masutani, 1994; Nishi, 2005; Scrima, 2008). Depois de ocorrer a ligação da XPC no DNA, o complexo TFIIH é recrutado, esse complexo proteico é composto por 10 proteínas, divididas em dois subcomplexos, sendo um chamado CAK (complexo ativador de cinase) que está envolvido no controle de transcrição e não atua no reparo de DNA. O segundo complexo, chamado de cerne, é onde se encontra as proteínas chaves do reparo, como as DNA helicases XPB e XPD. Em eucariotos superiores é identificado outras cinco proteínas associadas (p62, p52, p44, p34 e p8/TTD). Após o recrutamento de TFIIH pela XPC, é descrito na literatura que o subcomplexo CAK se dissocia. As helicases XPB e XPD abrem a molécula de DNA (Compe, 2012; Marteijn, 2014; Yokoi, 2000). A próxima etapa consiste na retirada da lesão pela atuação de endonucleases específicas, XPF-ERCC1 e XPG (ERCC5), que cortam a fita danificada a uma curta distância nas direções 5' e 3' da lesão (Fagbemi, 2011). Posteriormente, as proteínas de replicação PCNA, RFC e uma DNA polimerase fazem o processo de preenchimento da lacuna gerada, sendo finalizado por uma DNA ligase (**Figura 8**). (Moser, 2007; Ogi, 2010). Este é um processo extremamente coordenado para evitar a formação de um gap e ativar o DDR (Marini, 2006).

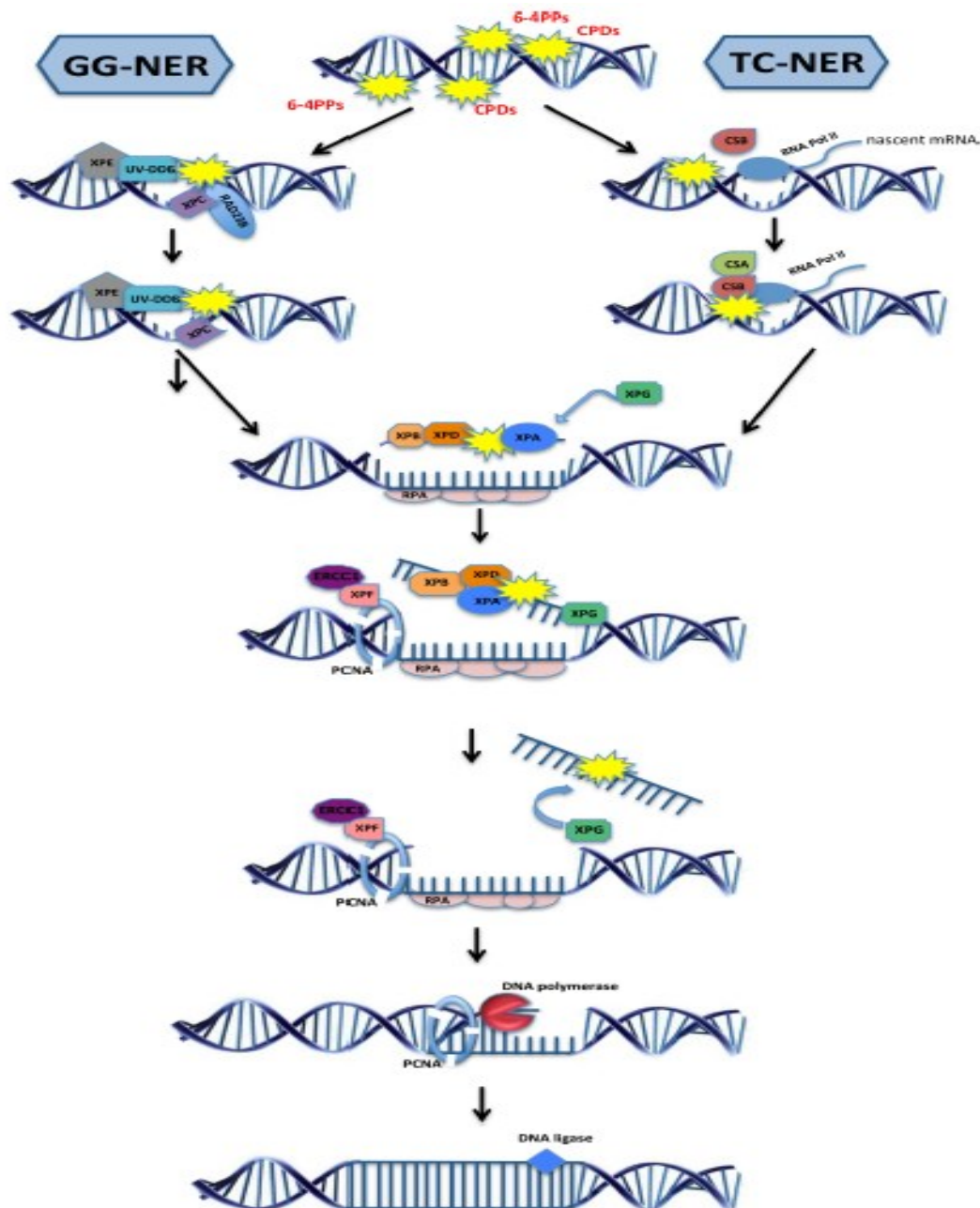
A ativação do TC-NER é dependente do reconhecimento de uma RNA polimerase II retida em frente a um dano. A RNA polimerase parada é reconhecida pelas enzimas CSA (Síndrome de Cockayne WD repeat proteína A) e CSB (Síndrome de Cockayne proteína B), sendo que elas são essenciais para o início da montagem dos outros componentes do TC-NER (Fousteri, 2006).

Uma vez localizada a lesão pelo complexo CSA-CSB, elas deslocam a RNA Polimerase II do local da lesão, recrutando assim a TFIIH com a sequência posterior idêntica ao GG-NER descrito acima (**Figura 9**) (Chatterjee, 2017; Marteijn, 2014).

Em *Trypanossoma cruzi* a via NER é quase completamente conservada, embora o sequenciamento do genoma tenha revelado algumas pequenas diferenças em relação a outros organismos. Onde foi possível observar a ausência de ortólogos para as proteínas RPA3 (componente do heterotrímero RPA), XPA, CSA e DDB2, (Berriman, 2005; El-Sayed, 2005; Ivens, 2005; Passos-Silva, 2010). Além disso, é possível identificar duas proteínas similares a XPB, nomeadas como XPB e XPBz (Badjatia *et al*, 2013). Outra diferença perceptível é a ausência do complexo CAK em TFIIH, que em tripanossomatídeos está associado a duas proteínas exclusivas desse

grupo, denominadas TSP1 e TSP2 (Lee, 2009). Além disso, a ausência da ligase 3 (LIG3) pode indicar que em tripanossomatídeos a via NER funcione dependente da ligase 1 apenas (LIG1).

Figura 9 – Via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)



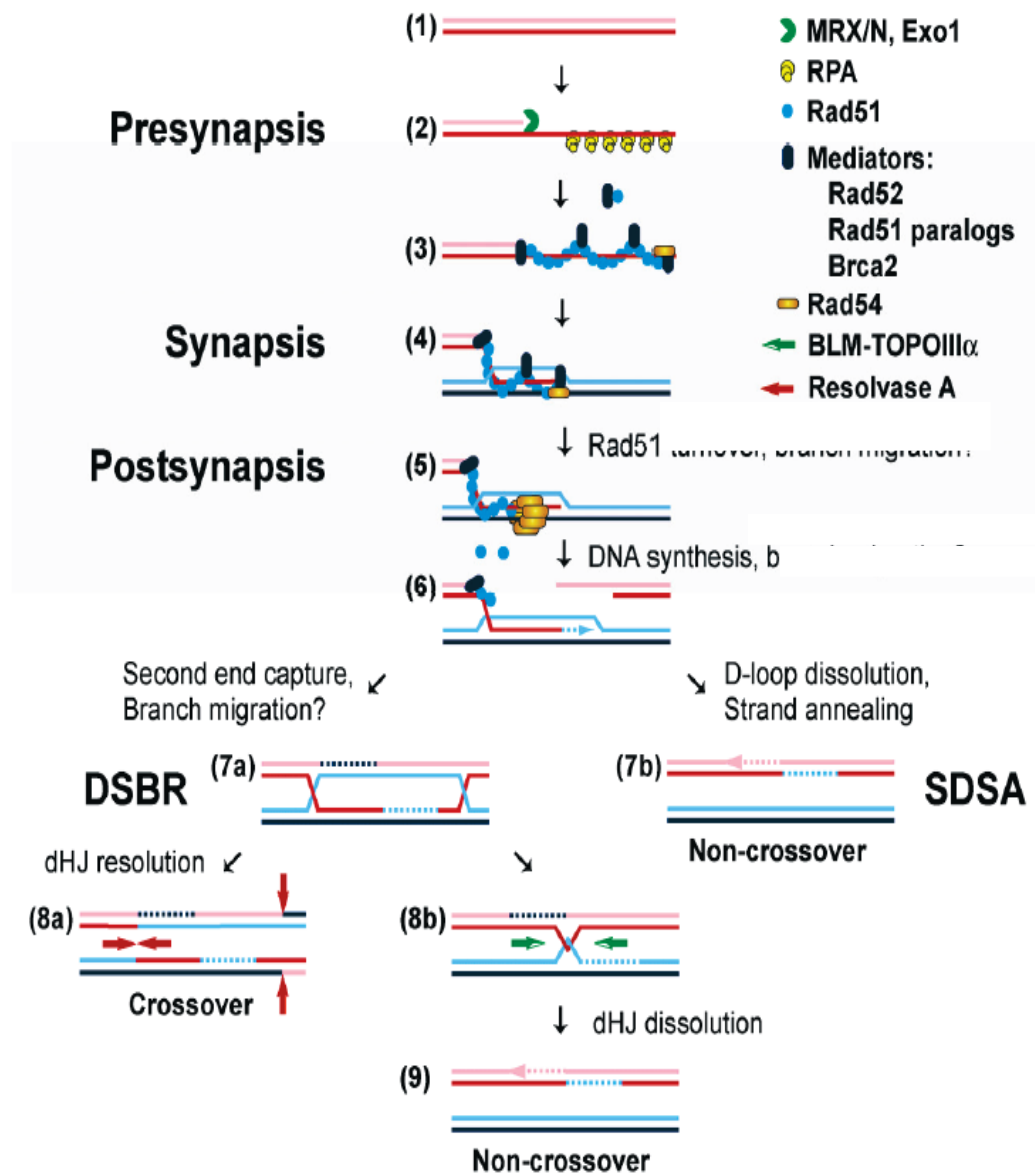
Legenda: As lesões são inicialmente reconhecidas tanto pelo bloqueio da RNA polimerase, no caso do TC-NER; quanto pela ligação da proteína DDB2 (XPE). Essa proteína forma um dímero, com a proteína DDB1, conhecido como complexo DDB. Após a etapa de reconhecimento, as subvias do NER convergem para o recrutamento de TFIIH, catalisa a incisão a 5' da lesão, enquanto que XPG promove a incisão a 3'. RFC auxilia no recrutamento do PCNA, promovendo a acomodação das DNA polimerases que executarão o reparo replicacional. Na etapa final, a ligação do DNA é realizada pela DNA ligase I ou ligase III. (modificado de Edifizi, 2015).

1.10 Reparo por Recombinação homóloga

O reparo por recombinação homóloga repara a quebra da dupla fita de DNA. Essa lesão é considerada altamente tóxica e pode ser induzida por vários produtos químicos e por processos próprios do metabolismo do DNA. Outra forma de lidar com essa lesão é o reparo de Junção de extremidades não homologas (Pfeiffer, 2000). O *T. cruzi* não apresenta no seu genoma duas enzimas dessa via (DNA ligase IV e XRCC4) e todas as evidências experimentais apontam para a ausência dessa via nesse organismo. As DSBs estão relacionadas a uma série de distúrbios humanos, como por exemplo o câncer (Jackson, 2009).

O reparo por recombinação homóloga em humanos se inicia quando o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) reconhece e se liga numa DSB, recrutando as proteínas ATM e TIP60 para o DNA (Stracker, 2011; Sun, 2005). A ATM ativada fosforila a H2Ax que é utilizada como âncora para o MDC1 (Bhatti, 2011). Em seguida, o MDC1 ativado introduz as ligases E3 ubiquitina, formando um complexo Ligase E3 ubiquitinada-H2Ax, formando um sítio de encaixe para 53BP1 e BRCA1 (Altmeyer, 2013). Outros componentes importantes para o reparo são recrutados para o DNA como as proteínas RPA e RAD51 (Chatterjee, 2017). É realizada a ressecção inicial do DNA pela atividade endonuclease do MRN, com a ajuda da CtIP, seguido pela ressecção de longo alcance da EXO1 ou BLM de aproximadamente 30 bases (Chen, 2008; Nimonkar, 2011). Em seguida, a proteína RPA reveste a fita simples formada para estabilizá-la, ao ser substituída pela RAD51 gera um filamento de nucleoproteína. Auxiliado pelas enzimas BRCA2 e PALB2, inicia o processo de invasão da dupla fita de DNA na fita homóloga adjacente, formando um D loop (Holloman, 2011; Zhang, 2009), várias outras proteínas funcionam em cooperação nessa etapa. Quando se encontra a homologia, as enzimas RAD54 e RAD54B removem a RAD51, permitindo então que a extremidade 3' OH livre seja reconhecida pela DNA polimerase, realizando a polimerização utilizando como molde a fita homóloga (Mazin, 2010; Sebesta, 2013). Ao terminar a polimerização, o DNA é ligado pela DNA ligase e é formado uma junção de Holliday, sendo processada coletivamente pelo complexo BLM-TOPOIII-RMI1-RMI2, pela endonuclease GEN1, pelo complexo MUS81-EME1 e SLX1-SLX4 (**Figura 10**) (Chang, 2008; Ciccio, 2008; Fekairi, 2009; Rass, 2010; Xu, 2008).

Figura 10 - Recombinação homóloga em eucariotos



Legenda: (1) Fita de DNA danificada; (2) A fita simples resultante do processamento da quebra de fita dupla é ocupada, inicialmente, pela proteína de ligação à fita simples, RPA. (3) Posteriormente, RPA é substituída pela proteína Rad51, através do auxílio do complexo Rad51/BRCA2. O nucleofilamento (4) invade a fita dupla do cromossomo homólogo e procura por homologia. A proteína Rad54 permite o relaxamento da fita dupla possibilitando o pareamento entre as fitas, propiciando o início da recombinação. B) Pelo menos três vias podem ser sugeridas após o intermediário *D-loop* ser formado. Em DSBR, ambas as extremidades de uma DSB estão envolvidas levando a formação das junções de Holliday. A junção pode ser processada por resolvases. Em SDSA, a fita invasora é deslocada após a síntese de DNA e anelada com a segunda extremidade, levando a uma conversão localizada. Em BIR, o *D-loop* é montado dentro de uma forquilha de replicação, copiando a parte distal inteira de um cromossomo resultando em perda de heterozigidade (Figura adaptada de Heyer, 2006)

O sequenciamento do genoma do *Trypanossoma cruzi*, revelou que esse organismo possui as principais proteínas envolvidas no início do reparo da recombinação homologa, como Mre11, Rad50, Rad51 Nsb1 e Rpa. Semelhante ao *T. brucei*, o *T. cruzi* apresenta cinco parálogos de Rad51 (RAD51-3, RAD51-4, RAD51-5, RAD51-6, DMC1) (Proudfoot, 2005). Além disso, foi mostrado que a enzima RAD51 também desempenha um papel central na recombinação homóloga nesse parasito (Passos-Silva, 2010; Regis-da-Silva, 2006).

1.11 Síntese Translesão

A síntese translesão (TLS) é realizada pelas Polimerases TLS, que são DNAs polimerases específicas que podem replicar lesões de DNA, de forma mais clara, elas podem passar pela lesão de DNA que esteja na fita molde, isso é possível por elas terem uma fidelidade relativamente menor que as DNAs polimerases replicativas (Sale, 2013). Se nucleotídeos forem incorporados errados e passarem pelo próximo ciclo celular, isso pode acabar levando para uma instabilidade genica, ou até mesmo impulsionar doenças, mas em contrapartida podem contribuir para evolução dos organismos. Apesar das polimerases TLS serem menos precisas, algumas classes de TLS são capazes de replicar com fidelidade em frente a determinados tipo de lesão, por exemplo, os CPDs de timina-timina de ciclobutano são lesões que são replicadas corretamente pela DNA polimerase h (Chatterjee, 2017; McCulloch, 2004; Waters, 2006).

1.12 Vias de reparo do DNA mitocondrial

Ao contrário do núcleo que já tem as principais vias de reparo bem elucidadas e descritas, ainda não é claro a presença dessas vias para manutenção do genoma mitocondrial. Devido, principalmente, à presença constante de radicais livres (ROS) presentes na mitocôndria, sabe-se que existe uma taxa de mutação do genoma mitocondrial que é de aproximadamente 10 vezes maior que a do Núcleo (Howell, 1998).

O genoma mitocondrial está sujeito aos mesmos danos que afetam o DNA nuclear. Na maioria dos eucariotos está presente várias mitocôndrias em uma única célula e isso torna possível que quando exista uma mitocôndria com mal funcionamento, esta não seja percebida. Falhas nas mitocôndrias que resultem em um mal funcionamento é inviável para a maioria dos organismos (Copeland, 2014; Friedberg, 2006).

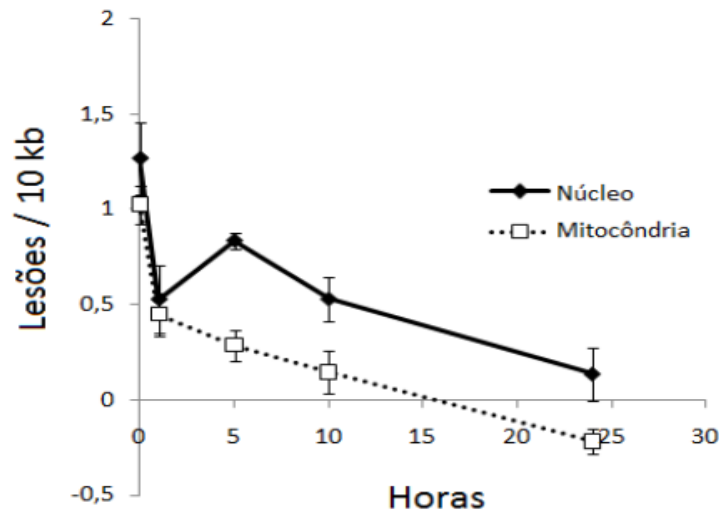
Devido à alta produção de ROS, assim como uma própria limitação da localização estrutural do mtDNA, faz com que esse agente seja o principal foco de dano ao mtDNA, e como consequência a maioria dos estudos focam no BER, justamente por ser o reparo mais tradicional para lidar com essas lesões (Alexeyev, 2013; Friedberg, 2006).

Porém, outra fonte de dano ao mtDNA, bem conhecida são os agentes alquilantes, oriundos da própria célula ou até mesmo de fontes exógenas. Essas lesões levam a formação de produtos que de forma direta ou indireta impedem a progressão da DNA polimerases no processo de replicação, levando a formação de DSBs, quebras de fita simples, entre outros danos (Alexeyev, M. *et al.*, 2013)

É relatado em vários trabalhos a ausência da via clássica de reparo, o NER (Clayton, 1974; Pascucci, 1997). Apesar da ausência clara da função do NER na mitocôndria, já foram descritas proteínas desta via, assim como de outras vias, atuando em funções não-canônicas no reparo por erros de pareamento, reparo por recombinação homóloga e junção não homóloga, e, principalmente, atuando no BER (Alexeyev, 2013; Holt, 2009).

Em *Trypanosoma cruzi*, o nosso grupo já descreveu algumas proteínas e fenótipos relacionados com o reparo do DNA mitocondrial. A partir da técnica de qPCR que quantifica lesões no núcleo e na mitocôndria, foi demonstrado que, para danos provenientes da exposição ao peróxido de hidrogênio, o número de lesões no núcleo e na mitocôndria, quando expostas à cisplatina, as células apresentam uma cinética similar entre o núcleo e a mitocôndria (uma diminuição rápida de lesões após 1 hora). Um fenótipo de reparo inicial rápido foi visto também quando as células foram tratadas com MMS: uma queda acentuada no número de lesões no núcleo e na mitocôndria após uma hora. Porém, após essa primeira hora, as lesões na mitocôndria continuam a ser reparadas em uma cinética mais lenta, enquanto no núcleo ocorre um aumento no número de lesões após a primeira hora que são reparadas após 10 horas (**figura 11**) (Rajão, 2011).

Figura 11 - Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial



Legenda: após tratamento com 1,5 mM de MMS. As células foram tratadas por 60 minutos e deixadas recuperando por até 24 horas. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Foram também localizadas no DNA mitocondrial do parasito proteínas importantes para a resposta ao estresse oxidativo, como homólogos de MutY e OGG1 (Kunrath-Lima, 2017).

O Nosso grupo mostrou também a existência de diversas polimerases presentes no cinetoplasto de *T. cruzi*, inclusive uma DNA polimerase κ localizada nos sítios antipodais do cinetoplasto. Experimentos posteriores demonstraram o papel desta polimerase como atuante em intermediários de replicação e um possível papel no reparo de quebras de fitas duplas de DNA (Rajão, 2009).

Além da polimerase κ já é descrita duas polimerases localizadas na mitocôndria, sendo as DNA polimerases β e β -PAK associadas com a replicação da organela e a resposta a lesões oxidativas. A DNA Pol β -PAK é capaz de fazer a síntese translesão frente à 8oxoG presente no kDNA e a superexpressão das duas, independentemente, levaram a redução da quantidade de 8oxoG no kDNA (Lopes, 2008; Schamber-Reis, 2012).

Desta forma, visando compreender melhor o reparo de DNA no kDNA de *T. cruzi*, neste trabalho pretendemos verificar, utilizando diferentes agentes genotóxicos e diferentes técnicas, quais as vias e genes atuam no reparo de DNA mitocondrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Buscar compreender quais vias e genes de reparo podem estar envolvidas na integridade do DNA mitocondrial do *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar em parasitos heminocaute de TcRad51, se essa depleção altera a integridade da mitocôndria de *Trypanosoma cruzi*.
- Realizar a localização dos agentes genotóxicos acoplados ao peptídeo de captação mitocondrial.
- Caracterizar a resposta dos parasitos heminocaute de TcRAD51 em frente a quebra da dupla fita do DNA da mitocôndria, utilizando agentes genotóxicos.
- Quantificar o número de lesões no DNA mitocondrial nos parasitos heminocaute de TcRad51 após o tratamento com MMS e determinar alterações na cinética de reparo.
- Investigar o envolvimento do TC-NER na mitocôndria pela utilização de células heminocaute de TcCSB e super expressoras de TcCSB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo dos parasitos

As linhagens utilizadas neste projeto foram cultivadas na forma epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* e mantidas a 28°C em meio LIT (liver infusion-tryptose: 5g.L⁻¹, NaCl 4g.L⁻¹, bactotriptose 5g.L⁻¹, KCl 0,4g.L⁻¹, NaH₂PO₄ 8g.L⁻¹, dextrose 2g.L⁻¹, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M) pH 7.3, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino, 500.000 u/L de penicilina e 0,2g/L de sulfato de estreptomicina, com os antibióticos específicos para cada linhagem, em que a concentração final é sempre 200 µg/mL de G418 (Geneticin – Gibco) e 200 µg/ml de higromicina (Sigma-Aldrich). As linhagens utilizadas foram a cepa CI Brener, heminocaites do gene TcRad51 (Regis-da-Silva, 2006), super expressoras e heminocaites de TcCSB (mendes, 2015)

3.2 Curvas de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com diferentes doses de agentes genotóxicos. Em seguida, a sobrevivência das culturas foi determinada através da contagem de células vivas em câmara citométrica em diferentes tempos na presença do corante vital eritrosina. A porcentagem de sobrevivência foi calculada comparando a densidade celular das culturas tratadas com a densidade das culturas controle não tratadas, crescidas sob as mesmas condições.

3.2.1 Tratamento com Metanossulfonato de metila (MMS)

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, em triplicatas. 1×10^8 células de cada cultura foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos. Cada cultura foi ressuspensa em 10 mL de PBS 1X estéril (PBS 10X - 0.15M KCl, pH 7,2, 0,003M KH₂PO₄, 0,092M Na₂HPO₄, 0,15M NaCl), que foram distribuídos em tubos do tipo Falcon, 4 mL por tubo. Em cada tubo foi adicionada a quantidade apropriada de MMS, solubilizado em PBS, e no controle foi adicionado PBS. As amostras foram

homogeneizadas e incubadas a 28°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, e o pellet foi ressuspensionado em 4 mL de meio LIT completo. Essa ressuspensão foi distribuída na placa de cultura, 1 mL em cada poço. As placas foram vedadas e incubadas a 28°C. As células vivas foram contadas imediatamente após o tratamento e em diferentes tempos posteriores. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

3.2.2 Tratamento com Clorambucil-alvo-mitocondria (Mt-Cbl)

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, em triplicatas. 1×10^7 células/mL de cada cultura foram coletadas e distribuídas na placa, 1 mL por poço. Em cada poço foi adicionada a quantidade apropriada de Mt-Cbl, solubilizado em DMSO, no controle foi adicionado apenas DMSO. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28°C. As células vivas foram contadas a cada 24 horas. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

3.2.3 Tratamento com Doxorrubicina-alvo-mitocondria (Mt-DOX)

Os ensaios foram preparados em placas de 24 poços, em triplicatas. 1×10^7 células/mL de cada cultura foram coletadas e distribuídas nas placas de cultura, 1 mL em cada poço. Em cada poço foi adicionada a quantidade apropriada de Mt-DOX, solubilizado em DMSO, e no controle foi adicionado apenas DMSO. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28°C. As células vivas foram contadas imediatamente após o tratamento e a cada 24 horas. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

3.3 Utilizando citometria de fluxo para medir integridade da Membrana Mitocondrial

Culturas de *T. cruzi* selvagem (Cl-Brener) e hemi-nocautes de Tcrad51, foram cultivadas em fase exponencial de crescimento e submetidas ao ensaio de avaliação

da integridade mitocondrial DiOC₆. O experimento foi realizado em triplicatas. Ambas as células foram retiradas na concentração de 1×10^7 células/mL e adicionadas em tubos de 1 mL, onde foi adicionado à solução de DiOC₆ a $0,1 \mu\text{M}$ previamente diluído em PBS, as amostras foram protegidas da luz, nas células controle foi adicionado PBS. Ao passar de 5 minutos as amostras foram lavadas e centrifugadas a 130 g por 5 minutos, onde foi realizada a remoção do sobrenadante. Posteriormente ressuspenso em PBS, essa lavagem foi repetida 3 a 4 vezes. As amostras depois de lavadas foram submetidas a citometria de fluxo para a medição do potencial da membrana mitocondrial. A análise dos resultados foi efetuada no software FlowJo X Versão: 10.0.7r2.

3.4 Análise do número de lesões por Long Range qPCR

3.4.1 Tratamentos genotóxicos para análise de número de lesões

Os tratamentos com o agente químico MMS foram realizados seguindo o mesmo procedimento, descrito no item **3.2**. As células foram então coletadas imediatamente após o tratamento e para cada ponto do experimento (1Hr, 6Hrs, 10Hrs e 24Hrs), 5 mL foram recolhidos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Todas as células coletadas (pellets) através de centrifugação foram guardadas a -80°C para posterior extração do DNA.

3.4.2 Extração de DNA de alto peso molecular

Os procedimentos de extração, quantificação, amplificação por qPCR e análise dos resultados foram realizados como descrito por Santos e colaboradores (Santos, 2006). O DNA genômico foi isolado usando o kit QIAGEN Genomic Tip Kit. Este kit permite a purificação de longos fragmentos de DNA (de até 150 kb) sem o uso de fenol ou clorofórmio (que danificam o DNA), possibilitando uma posterior amplificação de longos trechos de DNA. O protocolo utilizado neste trabalho é baseado no protocolo

de extração de tecido, sugerido pelo fabricante, com algumas adaptações. Após as etapas de lavagem com etanol 70%, as amostras de DNA ficaram dissolvendo em 100 μ L de TE por pelo menos 2 dias a 4 °C

3.4.3 Dosagem das amostras de DNA

Após a extração de DNA foram realizadas a correção das concentrações das amostras para 3 ng/ μ L. Para tal, foi feita uma dosagem aproximada de cada amostra extraída, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop. De posse da concentração aproximada de cada amostra, foi feita uma diluição das mesmas para a concentração de 3 ng/ μ L. Posteriormente, foi realizada uma dosagem precisa dessas amostras diluídas fazendo uma curva padrão, usando o corante específico para dupla fita de DNA, PicoGreen (Invitrogen). A leitura da curva padrão foi obtida no fluorímetro de placa Synergy 2 (Biotek), através da leitura dos picos de fluorescência na região do espectro entre 505 e 525 nm. Realizou-se a correção das amostras diluídas, diluindo ou concentrando, de forma que a diferença de concentração entre a amostra mais concentrada e a menos concentrada deve ser menor que 5%.

3.4.4 Amplificação por qPCR

Os ensaios de quantificações de lesões foram realizados comparando a amplificação de um fragmento de DNA longo, presente em uma amostra tratada com a amplificação de um controle não tratado. Uma reação “branco”, sem DNA molde, também é amplificada visando descontar a presença de iniciadores e dNTP das outras reações. Iniciadores específicos foram utilizados para amplificar fragmentos longos (de aproximadamente 10 kb) e curtos (de aproximadamente 250 pb) do genoma da mitocôndria do *T. cruzi*, e estão listados no quadro abaixo.

Tabela 1: Iniciadores usados no ensaio de qPCR

INICIADORES	SEQUÊNCIA
QPCRMitF	5' TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG 3'
QPCRMitR	5' TTGAAACTGCTTTCCCCAAACGCC 3'
QPCRMitInt	5' CGCTCTGCCCCCATAAAAAACCTT 3'

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

Todas as reações de amplificação foram feitas utilizando o Kit de DNA polimerase de alta fidelidade PrimerSTAR® GLX DNA Polymerase (TAKARA), utilizando as seguintes quantidades de reagentes para cada reação de 25 µL, 10,3 µL de ddH₂O, 5 µL de 5x Buffer, 5 µL de BSA (1 mg/mL), 2,5µL de dNTP (2,5 mM cada nucleotídeo), 1 µL de iniciador *forward* (10mM), 1 µL de iniciador *reverse* (10 mM), 0,2µL de DNA polimerase foi utilizado. As amplificações dos fragmentos de DNA foram feitas em termocicladores, usando um número de ciclos no qual a reação termina ainda na fase exponencial da amplificação. Dessa forma, para cada experimento é feito um controle de 50%, constituído de uma reação de qPCR contendo 50% do DNA não-tratado. A amplificação é considerada válida, quando a amplificação deste DNA controle, gera um produto de amplificação com 40 á 60% do valor da amplificação da reação contendo 100% do DNA não-tratado. As reações de qPCR foram realizadas utilizando os programas descritos a seguir.

Tabela 2: Programas utilizados para amplificação dos fragmentos longos e curtos para a qPCR

Etapas	Fragmentos longos (10 kb)	Fragmentos curtos (250 pb)
Passo 1	94°C por 1 minuto e 30 segundos	94°C por 1 minuto e 30 segundos
Passo 2	94°C por 1 minuto	94°C por 1 minuto
Passo 3	60°C por 15 segundos	60°C por 15 segundos
Passo 4	68°C por 12 minutos	68°C por 45 segundos
Passo 5	24 ciclos entre os Passos 2-4	19 ciclos entre os passos 3 e 5
Passo 6	72°C por 10 minutos	72°C por 10 minutos
Passo 7	6°C indefinidamente	6°C indefinidamente

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

3.4.5 Análise dos resultados

A análise do número de lesões foi realizada comparando a amplificação dos fragmentos longos das amostras tratadas em relação à amplificação do controle não tratado. Para tal, além de descontar o valor de amplificação da reação “branco” dos valores obtidos em todas outras amplificações foi feita a normalização usando os fragmentos curtos. Dessa forma, foi obtido o valor de amplificação relativa (amplificação tratado/amplificação não tratado). O número de lesões por 10 kb foi

obtido aplicando a fórmula
$$-Ln \left[\frac{\left(\frac{\text{Amplificação longa}}{\text{Média das amplificações longas}} \right)}{\left(\frac{\text{Amplificação Curta}}{\text{Média das amplificações curtas}} \right)} \right],$$
 uma vez que o

aparecimento de lesões no DNA segue uma distribuição de Poisson. Os valores apresentados para cada amostra são a média dos valores obtidos através de duas reações de qPCR de dois experimentos biológicos diferentes.

3.5 Ensaio de microscopia fluorescente

Para detecção da localização das drogas mitocondrias, cultivamos parasitas epimastigotas em crescimento exponencial CL Brener WT, que foi tratada conforme metodologia com mt-Dox, **III.2.3**. Depois de 30 minutos as amostras foram colhidas por centrifugação (2000 g, 5 min), lavadas utilizando 3x PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 2 mM) e fixadas usando paraformaldeído a 4% diluído em 1x PBS durante 10 minutos, à temperatura ambiente. As células de parasitas foram então depositadas e espalhadas em lâminas pré-tratadas com 0,1% de poli-L-lisina, e repousadas durante 10 min à temperatura ambiente. Depois disso, as células contendo as lâminas foram lavadas repetidamente (dez vezes) usando 1x PBS. O meio de montagem ProLong® Diamond foi utilizado para ser uma solução de montagem anti-desbotamento e para corar organelas contendo ADN (isto é, núcleo e cinetoplasto). Para estes experimentos, as imagens foram capturadas usando o microscópio de fluorescência Apotome acoplado a uma câmera digital (Axiocam 503 mono), e analisadas usando o software Zen software 2.6 (blue edition).

3.6 Análises estatísticas

Para as curvas de crescimento e de sobrevivência de *T. cruzi*, bem como para os experimentos de qPCR, utilizou-se teste t não-pareado. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Os dados foram apresentados como a média +/- desvio padrão (SD).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados com células heminocaute de TcRAD51

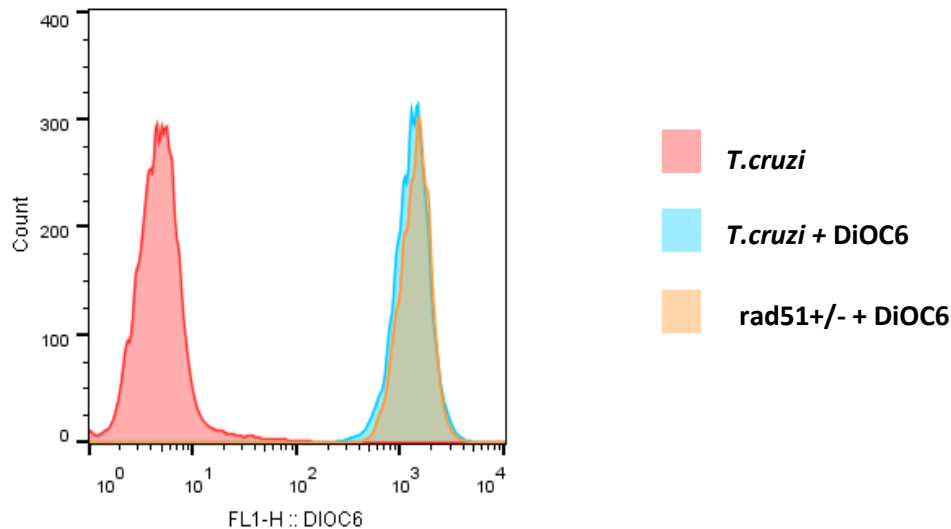
4.1.1 Detecção da Integridade Mitocondrial de células heminocaute de TcRad51

A mitocôndria é responsável pelo metabolismo energético da célula e logo o potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) é um indicador da condição dessa organela. A perda do potencial de membrana sugere fortemente uma possibilidade de perda da integridade da membrana mitocondrial.

Foram desenvolvidos corantes lipofílicos que se acumula na matriz mitocondrial, até que a distribuição de equilíbrio de Nernstian de cátions seja alcançada (Chang; 2013). Nesse contexto foi utilizado o corante 3,3'-dihexiloxicarbocianina (DiOC₆) e a sua utilização como um sensor do potencial de membrana da mitocôndria (Chang; 2013), é devida ao seu acúmulo nessa organela. O corante pode ser detectado por citometria de fluxo. Logo, se houver perda da integridade mitocondrial, isto será refletido diretamente na diminuição da fluorescência do DiOC₆ (Liu, 2009).

Foram utilizadas células de *T. cruzi* selvagem como controle e células heminocaute de TcRad51. Assim foi possível verificar se existe uma diferença entre a integridade mitocondrial dessas células. Após a análise, o resultado mostrou que não há diferença significativa entre os picos de fluorescência do DiOC₆ nas células selvagens com as células heminocaute de TcRad51 (**Figura 12**).

Figura 12 - Gráfico de citometria de fluxo,



Legenda: células de *T. cruzi*, marcadas e não marcadas com DiOC₆. Em vermelho células selvagens sem marcação com DiOC₆. Em azul células selvagens marcadas com DiOC₆. Em laranja células heminocaute de TcRad51 marcadas com DiOC₆.

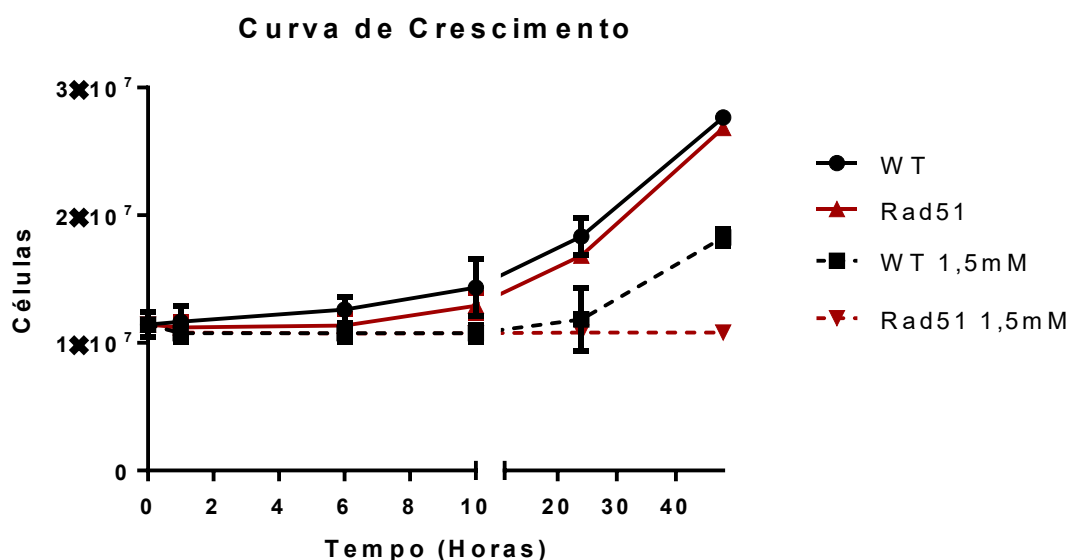
4.1.2 Resposta do *T. cruzi* com o agente genotóxicos MMS

Como já descrito anteriormente, uma das características do MMS é o seu envolvimento como indutor de DSB, comprovado por estudos que demonstraram que a histona H2AX se torna fosforilada (γ H2AX) em resposta ao dano ao MMS. No *T. cruzi* foi observado que as células heminocaute de TcRad51 tratadas com MMS tiveram um aumento do marcador de DSB γ H2A (Silva, 2018), validando assim esse efeito biológico do MMS está presente nesse organismo. Com o intuito de avaliar um possível envolvimento de TcRad51 na resposta ao MMS na mitocôndria, as linhagens selvagens e heminocaute foram submetidas a diferentes tratamentos.

4.1.2.1 Resposta de *T. cruzi* a 1,5 mM de MMS

As linhagens selvagens e heminocaute do gene TcRad51 foram tratadas com 1,5 mM de MMS por 60 minutos. O resultado mostra que as culturas heminocaute de TcRad51 (TcRad51+/-) foram mais sensíveis ao tratamento com MMS, o que sugere o envolvimento de TcRad51 na resposta contra danos causados por MMS (**Figura 13**).

Figura 13 - Resposta às lesões induzidas por MMS



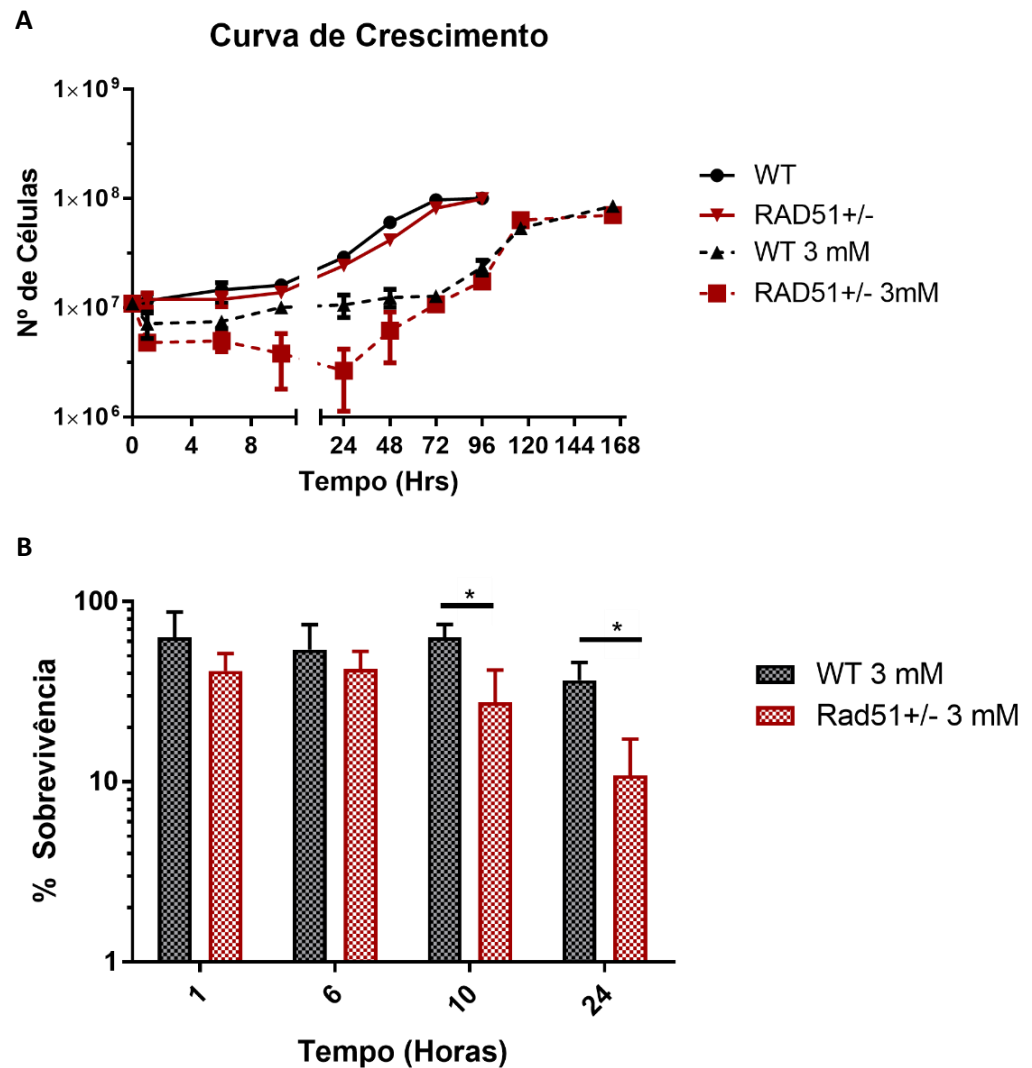
Legenda; Curva de crescimento das culturas WT, e células heminocaute de TcRad51 após exposição á 1,5mM de MMS, nos tempos 0h, 1h, 6h, 10h, 24 e 48h após o tratamento. Foi utilizado de três experimentos independentes.

4.1.2.2 Resposta do *T. cruzi* a 3 mM de MMS

A fim de maximizar os efeitos genotóxicos do MMS, as linhagens selvagens e heminocaute do gene TcRad51 foram tratadas com 3 mM de MMS por 60 minutos. O resultado mostrou que as culturas heminocaute de TcRad51 apresentaram a mesma sensibilidade nas primeiras horas de tratamento (após 1 hora e 6 horas), mas foram mais sensíveis ao tratamento com MMS no tempo de 10 e 24 Horas, sugerindo que

TcRad51 está envolvido em um segundo momento na resposta contra danos causados por MMS (**Figura 14**).

Figura 14 - Resposta as lesões induzidas por MMS



Legenda: A) Curva de crescimento das culturas WT, TcRad51+/- após exposição á 3 mM de MMS nos tempos, 1h, 6h, 10h ,24h ,48h ,72h ,96h ,12h ,144h ,168h. B) Taxa de sobrevivência das culturas WT, TcRad51+/- após exposição á 3mM de MMS, nos tempos 1h, 6h, 10h e 24h após o tratamento. O percentual de sobrevivência foi calculado de três experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão. (* $P < 0.05$, teste *t* student).

4.1.2.3 Quantificação do Dano mitocondrial pelo MMS

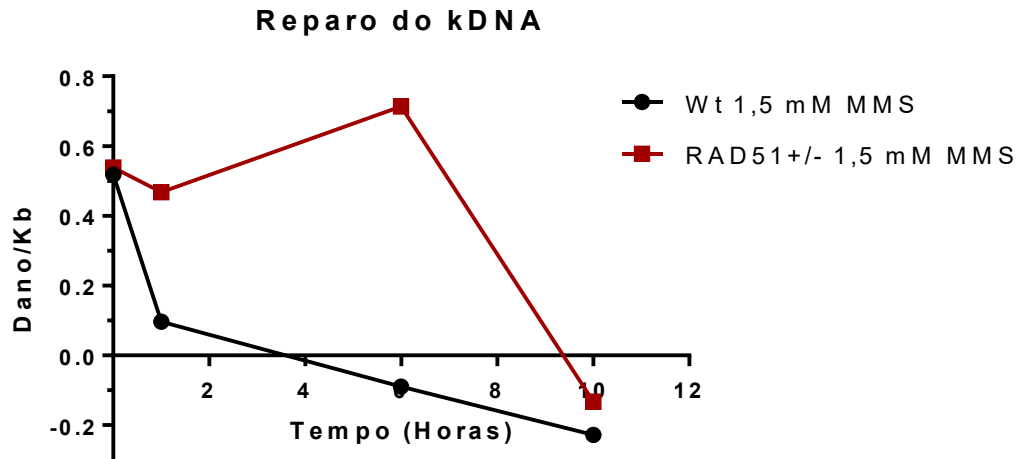
O MMS é um agente genotóxico que leva a lesões em todo o genoma do *T. cruzi*. Como o foco desse trabalho é estudar apenas as lesões e o reparo do kDNA, foi utilizado o ensaio de quantificações de lesões por qPCR que permite realizar especificamente a quantificação de lesão no kDNA, pela utilização de iniciadores específicos para o mesmo.

4.1.2.4 Quantificação do Dano mitocondrial 1,5 e 3 mM de MMS

Com o objetivo de investigar as lesões no kDNA das cepas selvagem e heminocaute de TcRad51, causadas por 1,5 mM e 3 mM de MMS, foi realizada a técnica de qPCR, como já descrito anteriormente.

Após o tratamento com 1,5 mM de MMS, as análises do gráfico referente a este experimento (**Figura 15**) demonstra que a cepa selvagem tem dois momentos de reparo no kDNA, sendo um reparo rápido e um reparo lento. Aproximadamente 6 horas após o o aparecimento da lesão, o kDNA está totalmente reparado. As cepas heminocaute de TcRad51 tiveram uma cinética de reparo diferente em relação as cepas selvagens, observando alterações nos dois momentos de reparo. A primeira etapa do reparo de DNA está presente, mas a inclinação da curva sugere que o processo não ocorre na mesma velocidade verificada na célula selvagem. Entretanto, a diferença na segunda fase de reparo é mais marcante, pois ocorre um aumento significativo no número de lesões e o reparo dessas lesões é mais lento.

Figura 15 - Cinética de reparo de lesões mitocondriais causadas por 1,5 mM de MMS

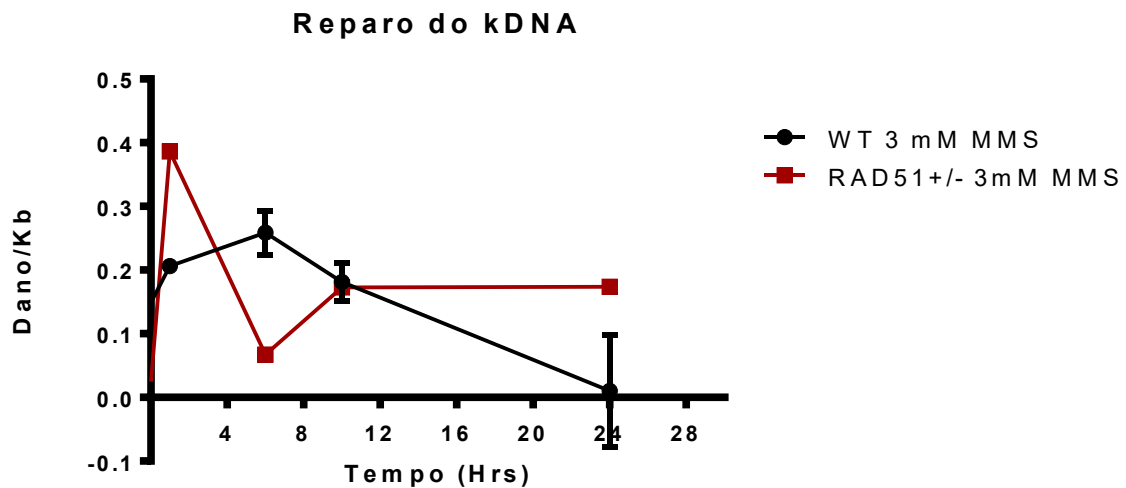


Legenda: Formas selvagens epimastigotas de *T. cruzi* em preto e células heminocaute de TcRad51 em vermelho, submetidas ao tratamento com 1,5 mM de MMS durante 60 minutos. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes

No intuito de verificarmos se seríamos capazes de aumentar o número de lesões no kDNA após o tratamento com MMS, foi realizado o estudo com o tratamento com 3 mM de MMS. A análise do gráfico referente a este experimento nós mostrou que tanto a cepa selvagem quanto a cepa heminocaute de TcRad51 alteraram a sua cinética de reparo nessa concentração de droga, em comparação com a cinética que utiliza 1,5 mM de MMS. Nesse tratamento não foi evidenciado os dois momentos de reparo nas cepas selvagens. Não se verifica nenhum reparo de DNA na primeira hora de tratamento, pelo contrário, nessa primeira hora ocorre uma elevação no número de lesões de DNA nas duas células, sendo que este aumento é mais pronunciado na célula deficiente em Rad51. Após a primeira hora de tratamento, a célula selvagem ainda não é capaz de realizar o reparo de DNA e o número de lesões continuam a progredir e apenas após 6 horas do tratamento que é possível visualizar uma diminuição do número de lesões que retorna ao nível das células não tratadas após 24 horas. O perfil cinético de reparo de DNA na célula deficiente em Rad51 é completamente diferente do que é verificado na célula selvagem. Após a primeira hora em que ocorre um acúmulo de lesões, existe um reparo acentuado dessas lesões até

6 horas após o tratamento. Curiosamente, após 6 horas, ocorre um novo incremento no número de lesões e estas não são reparadas até 24 horas.

Figura 16: Cinética de reparo de lesões mitocondriais causadas por 3mM de MMS.



Legenda: Formas selvagens epimastigotas de *T. cruzi* em preto e células heminocaute de TcRad51 em azul, submetidas ao tratamento com 3 mM de MMS durante 60 minutos. Os resultados são a média de dois experimentos biológicos diferentes

4.1.2.5 Avaliando efeitos genotóxicos apenas no kDNA do *T. cruzi*

Para avaliar lesões apenas no kDNA do *T. cruzi* foi utilizado agentes genotóxicos direcionados para a mitocôndria. Essa estratégia foi possível graças aos estudos do grupo de Jean e Kelley em 2016 que descreveu o desenvolvimento de um peptídeo de captação mitocondrial (Wisnovsky, 2016). Desses agentes genotóxicos, dois foram cedidos para esse projeto, sendo eles o mt-CBL e mt-DOX.

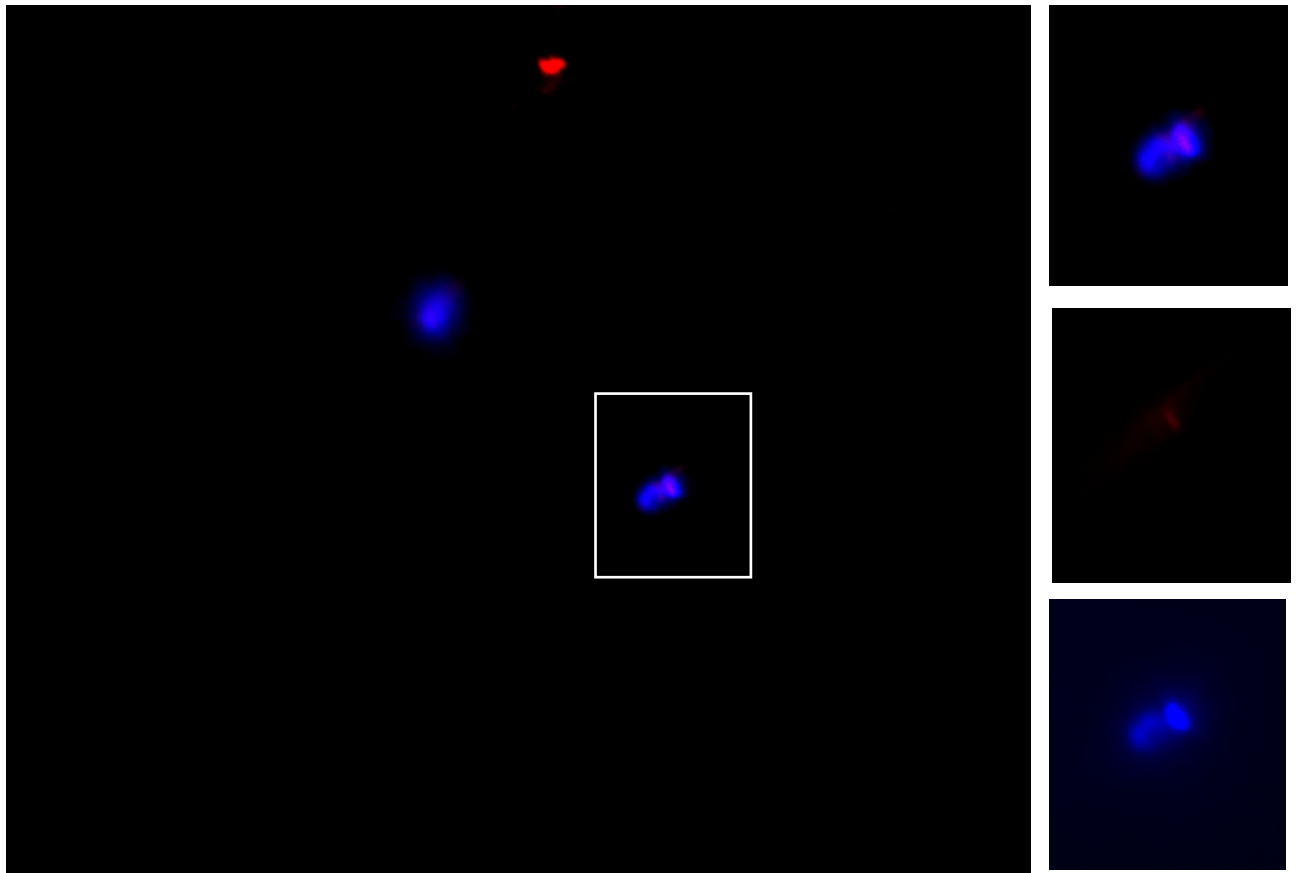
4.1.2.6 Ensaio de localização do peptídeo direcionador em *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um organismo que apresenta diferenças importantes para outros eucariotos, como por exemplo as células humanas, o que nos levou a verificar se o peptídeo de captação mitocondrial estava sendo direcionado também para a mitocôndria do *T. cruzi*.

Um dos compostos que foram fornecidos, o mt-DOX, devido a Doxorubicina ser um composto com fluorescência, podendo ser excitado a 490 nM e levar a uma emissão a 590 nM, nos permite verificar a sua localização por microscópios de fluorescência. Além disso, esse agente genotóxico tem como particularidade a capacidade de intercalar no DNA, se tornando possível identificar se esse composto se encontra apenas no kDNA ou no DNA global do *T. cruzi*.

Foi realizado o um tratamento com 16µM de mt-DOX e esses parasitos foram fixados em lâminas e corados com DAPI (**Figura 17**). A fluorescência do mt-DOX se mostrou presente em quase todos parasitos apenas no kDNA, comprovando assim que esse peptídeo de captação mitocondrial está direcionando corretamente esses agentes genotóxicos para a mitocôndria do *T. cruzi*

Figura 17 - Lâmina de Fluorescência de *T. cruzi*,



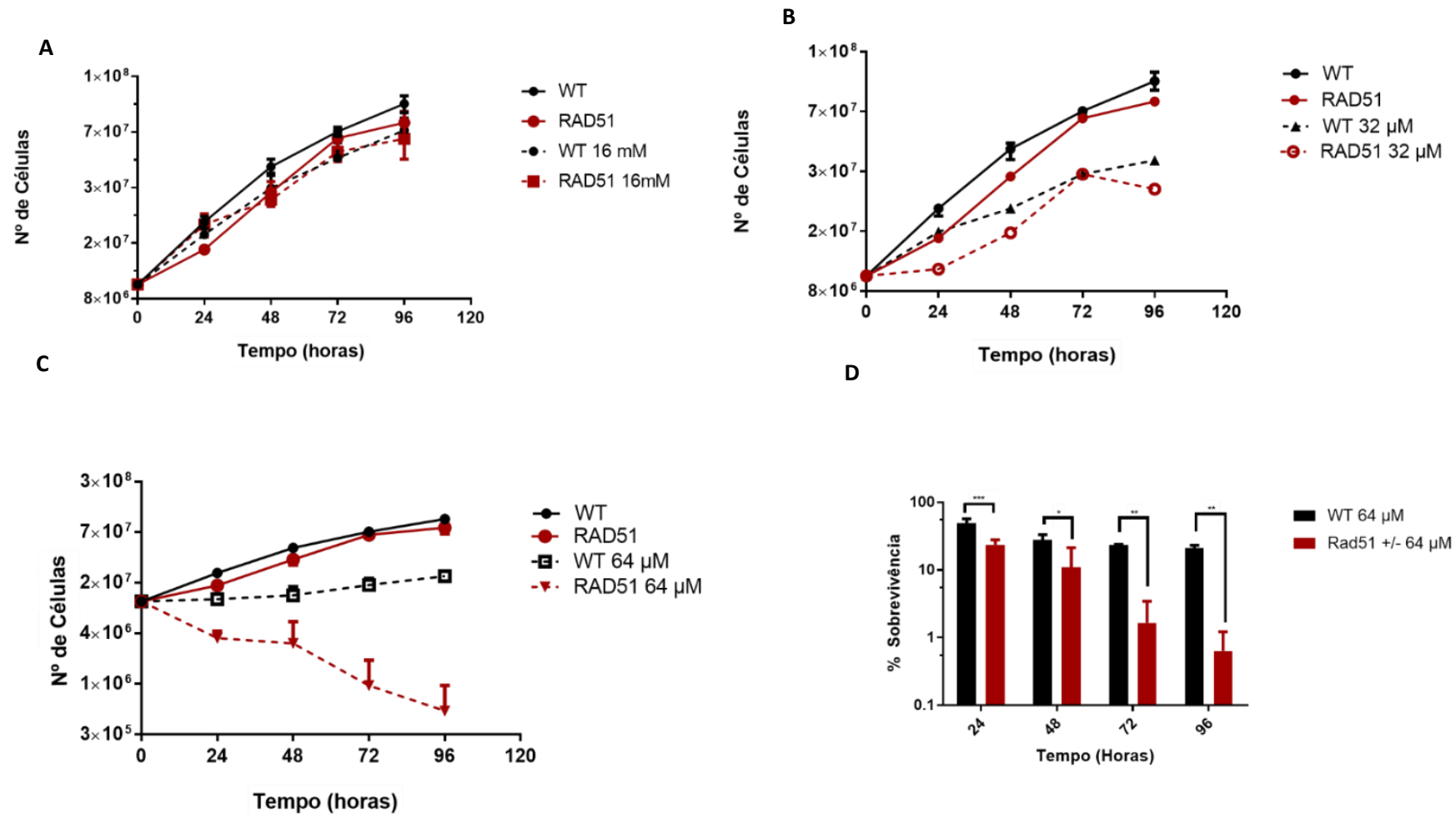
Legenda: DNA marcados com DAPI em azul, DOX marcado em vermelho. Imagem direita seleção do parasito da imagem esquerda.

4.1.2.6 Resposta do *T. cruzi* a mt-cbl

Como já descrito anteriormente, o mt-cbl é um composto alquilante que alquila os nitrogênios 7^{posição} da guanina ou 3^{posição} da adenina que consequentemente leva a formação de DSB e ICL (envolvendo guaninas da mesma fita ou entre fitas), porém, especificamente no kDNA devido ao peptídeo de captação mitocondrial. Para avaliar um possível envolvimento de TcRad51 na resposta ao mt-cbl na mitocôndria de *T. cruzi*, as linhagens selvagens e heminocaute de TcRad51 foram submetidas a diferentes tratamentos (16, 32 e 64 μ M), a afim de se obter uma dose resposta nesse organismo.

Os resultados obtidos mostram que a dose mais baixa de 16 μ M (**Figura 18.A**) não afetou o crescimento do *T. cruzi* nas células selvagens e nas células heminocaute de TcRad51. Na dosagem de 32 μ M (**Figura 18.B**) foi observado que as células heminocaute de TcRad51 apresentaram uma parada no seu crescimento por 24hrs, enquanto o crescimento das células selvagem foi um pouco retardado em comparação com as células não tratadas. Na dosagem mais alta de 32 μ M (**Figura 18.C**) foi possível observar que as células selvagens pararam o seu crescimento, enquanto as células heminocaute de TcRad51 foram mais sensíveis e essa sensibilidade foi progressiva com o tempo (**Figura 18.D**).

Figura 18 - Resposta á lesões causadas por mt-Cbl em células epimastigotas de *T.cruzi*.

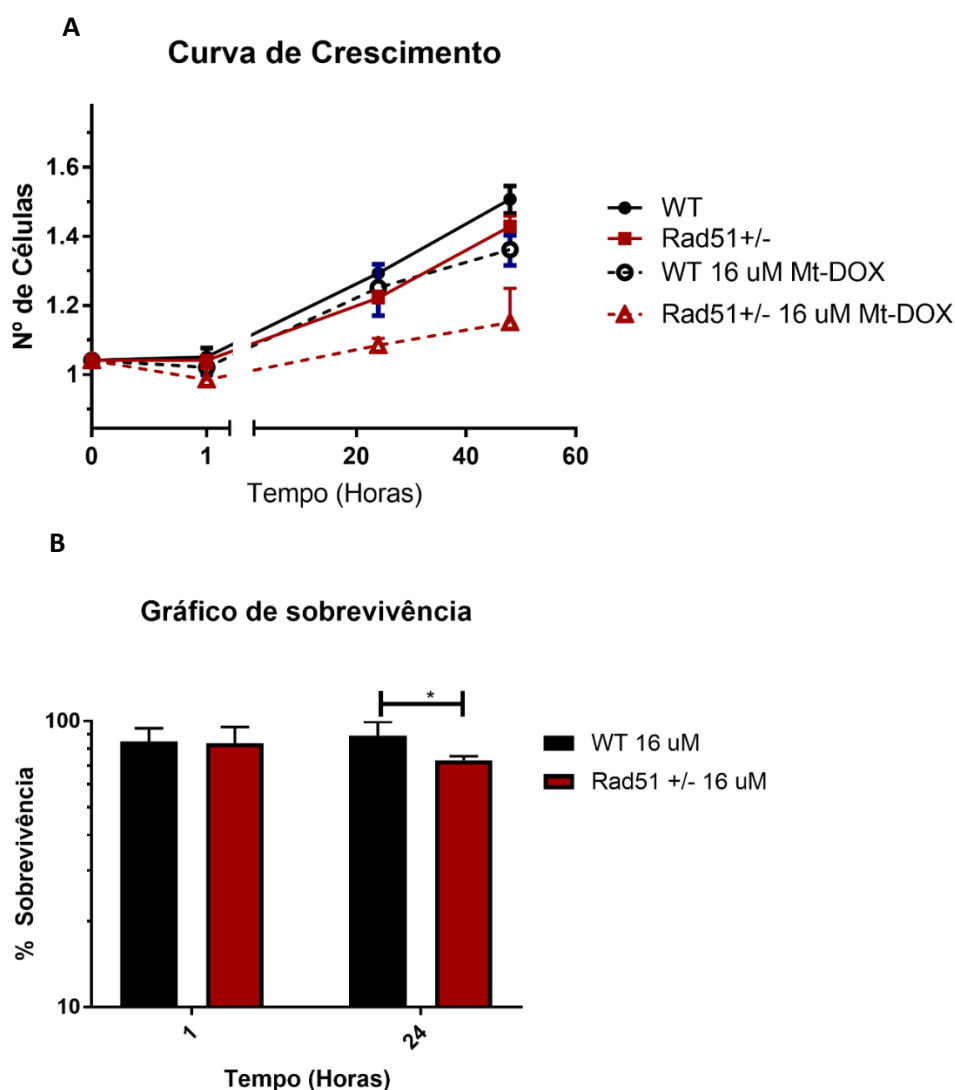


Legenda: Selvagens (wt) e Heminocautes de TcRad51 (Rad51). A). Curva de crescimento após exposição á 16 µM de mt-Cbl nos tempos, 24h, 48h, 72h e 96h. B) Curva de crescimento após exposição á 32 µM de mt-Cbl nos tempos, 24h, 48h, 72h e 96h. C) Curva de crescimento após exposição á 64 µM de mt-Cbl nos tempos, 24h, 48h, 72h e 96h. D) Gráfico de sobrevivência após exposição á 64 µM de mt-Cbl nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ teste *t* student).

1.2.7 Resposta do *T. cruzi* a mt-DOX

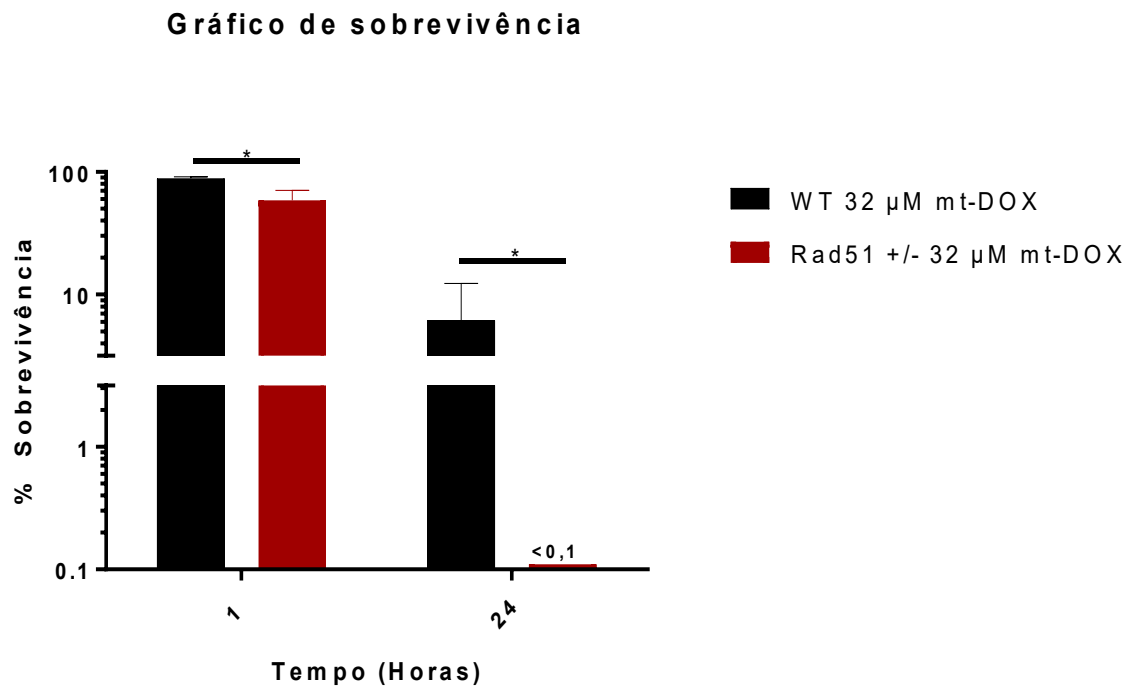
Como já mencionado, a Doxorrubicina (Dox) pertence à classe das antraciclinas e um dos seus efeitos biológicos é a inibição da Topoisomerase II. Essa inibição leva a uma falha nos mecanismos de replicação e transcrição e, caso não seja reparado, pode levar a formação de quebras da dupla fita de DNA. Para avaliar se TcRad51 está atuando em frente a essa lesão na mitocôndria, foi realizado tratamentos com esse agente genotóxico em células selvagens e células heminocaute de TcRad51, nas dosagens de 16, 32 μ M.

Os resultados obtidos com o tratamento de 16 μ M, (**Figura 19.A**) mostraram uma sensibilidade nas células heminocaute de TcRad51, uma vez que apesar das células (selvagem e deficiente para TcRad51) apresentarem uma pequena quantidade de morte na primeira hora após o tratamento, a célula heminocaute para TcRad51 não foi capaz de retornar o crescimento na mesma intensidade apresentada pela célula selvagem (**Figura 19.B**).

Figura 19 - Resposta a lesões causadas por 16 μ M de mt-Dox

Legenda: Células epimastigotas de *T.cruzi*, Selvagens (wt) e Heminocautes de TcRad51 (Rad51 +/-). A). Curva de crescimento após exposição a 16 μ M de mt-Dox nos tempos, 1hr, 24hrs, 48hrs. B) Gráfico de sobrevivência após exposição a 16 μ M de mt-Dox nos tempos 1h, 24hrs. (* $P < 0.05$, teste *t* student).

Também foi realizado um tratamento utilizando uma dosagem de 32 μ M de mt-Dox (**Figura 20**). Nessa dose, as células heminocaute de TcRad51 se mostraram mais sensíveis 1 hr após o tratamento, em comparação com as células selvagens. Entretanto, com 24 hrs, as células heminocaute foram extremamente sensíveis ao tratamento e não foi possível contar nenhuma célula viva na cultura. A célula selvagem também foi sensível e apresentou um nível de morte de aproximadamente 90% das células.

Figure 20 - Resposta a lesões causadas por 32 μ M de mt-Dox

Legendas: células epimastigotas de *T. cruzi*, Selvagens (wt) e Heminocautes de TcRad51 (Rad51 +/-). Gráfico de sobrevivência após exposição á 32 μ M de mt-Dox nos tempos 1h, 24hrs. (* $P < 0.05$, teste *t* student).

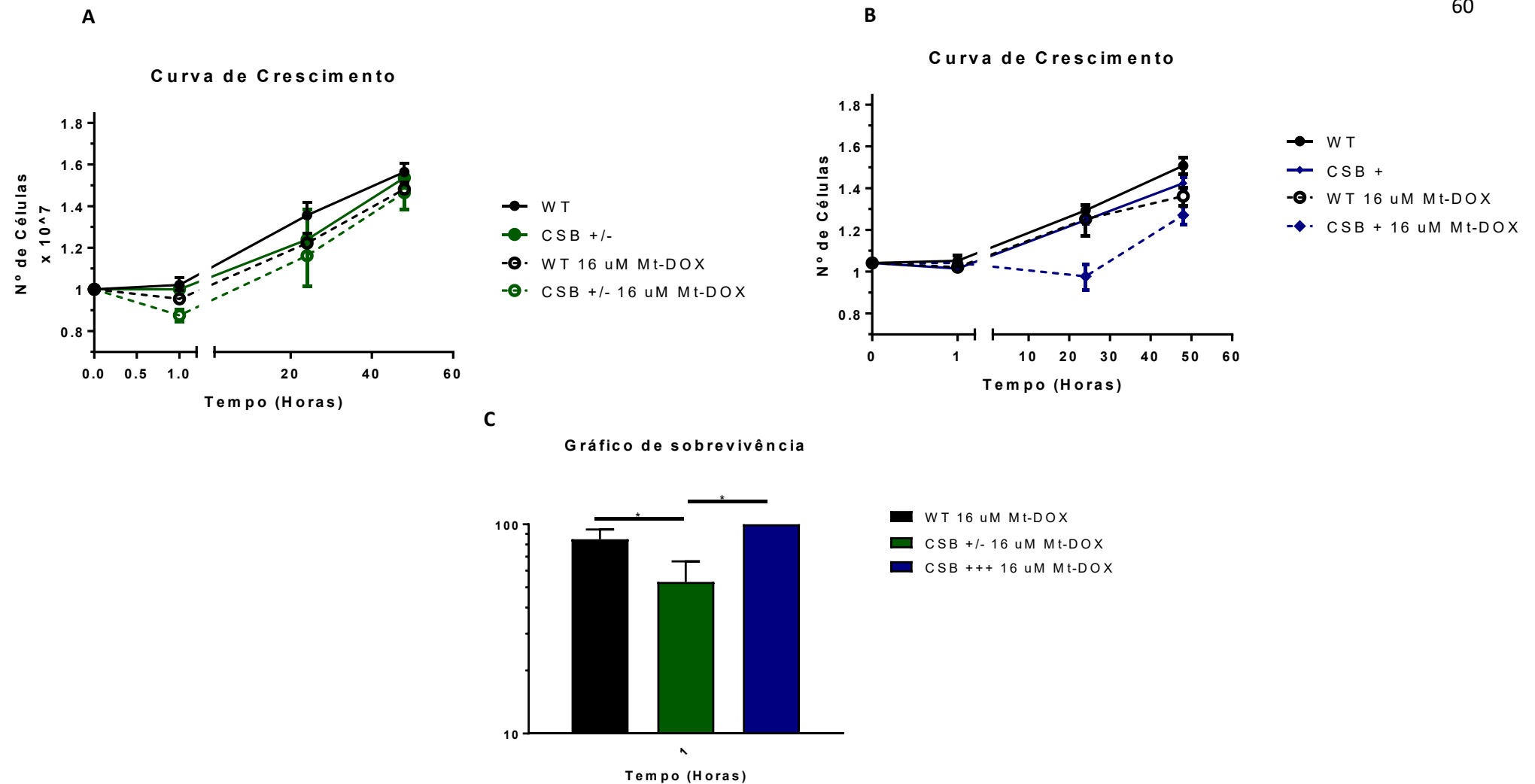
4.2 Resultados com células heminocaute e superexpressoras de TcCSB

4.2.1 Resposta do *T. cruzi* a mt-DOX

Para estudar um possível envolvimento do TC-NER na mitocôndria do *T. cruzi* foi realizado experimentos com células heminocaute e super-expressora de TcCSB, o qual está envolvido no reconhecimento da RNA polimerase parada em frente à lesão. Essas células foram expostas ao agente genotóxico Doxorubicina (Dox), uma vez que seu efeito biológico poder levar a inibição Topoisomerase II e, conseqüentemente, colapsar a maquinaria de transcrição, levando a parada da RNA polimerase

As células selvagens, heminicaute e super-expressora de TcCSB, foram submetidas a 16µM de mt-Dox (**Figura 21A**). Os resultados obtidos mostraram que as células heminocaute de CSB tiveram uma tendência de serem mais sensíveis na primeira hora após o tratamento. Porém, após esse momento, as células foram capazes de crescer em nível similar às células selvagens. Por outro lado, as células super-expressoras foram mais resistentes 1 hora após o tratamento, entretanto, elas não foram capazes de crescer após 24 horas de tratamento e só é possível ver o crescimento após 48 horas do tratamento (**Figura 21.B**).

Portanto, quando focamos em 1 hora após o tratamento, é possível verificar que as células heminocaute de TcCSB são mais sensíveis enquanto as células superexpressoras de TcCSB são mais resistentes. (**Figura 21.C**).



Legenda: Selvagens (wt), Heminocautes de TcCSB (CSB +/-) e superexpressora de TcCSB (CSB+). **A)** Curva de crescimento de Wt e Heminocaute de TcCSB após exposição á 16 μ M de mt-DoX nos tempos, 1 Hr, 24h, 48h, 72h. **B)** Curva de crescimento após exposição á 16 μ M de mt-Cbl nos tempos, 1hr, 24hrs, 48hrs. **C)** Gráfico de sobrevivência após exposição á 16 μ M de mt-Dox ,nas células Selvagens, Heminocaute e superexpressora de TcCSB no tempo 1 Hr pós tratamento. (***P**<0.05, teste **t** student).

5 DISCUSSÃO

Ultimamente tem se feito uma busca por novos alvos terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento à doença de Chagas. Os efeitos colaterais levam a uma baixa adesão ao tratamento em vigor. Para agravar ainda mais, é relatado a resistência em algumas cepas na utilização das drogas atuais. Esses fatos aumentaram a busca por novos quimioterápicos que auxiliem profissionais e pacientes no combate à doença de Chagas.

Nesse contexto, as enzimas envolvidas no sistema de reparo se mostram grandes candidatos como possíveis alvos de agentes genotóxicos. Uma peculiaridade do *T. cruzi* é a presença de uma única mitocôndria, com uma estrutura de DNA extremamente complexa. Acreditamos que é de suma importância para o parasito preservar a integridade gênica dessa mitocôndria. Identificar vias de reparo características dessa mitocôndria se mostra muito promissor, sendo possível apresentar candidatos para serem alvo de novos quimioterápicos que minimizem os efeitos colaterais em pacientes.

Anteriormente acreditava-se que não existia reparo de DNA mitocondrial, devido à ausência da remoção de dímeros de pirimidina que é realizado pela via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) (Clayton, 1974). Nos últimos anos foi comprovado que essa afirmação baseada apenas na ausência do NER estava incorreta. (Bohr, 1999; Gredilla, 2010).

Inicialmente, como as enzimas envolvidas na replicação do DNA mitocondrial eram específicas dessa organela, acreditava-se que o mesmo ocorria para o reparo de DNA. Porém, atualmente, já é descrito que as proteínas de reparo podem atuar no DNA nuclear assim como no DNA mitocondrial. Elas podem ser codificadas pelo mesmo gene podem frequentemente ser distinguidas devido à presença ou ausência de um sinal de direcionamento mitocondrial. As sequências de sinal podem ser geradas através de *splicing* alternativo, iniciação de transcrição alternativa ou iniciação de tradução alternativa (Kazak, 2012), mas nem sempre é possível detectar esse sinal. Também existe exemplo de genes que possuem dois cópias, uma que expressa uma proteína direcionada ao núcleo e outro que expressa uma proteína que é direcionada para a mitocôndria.

Tem sido relatado que as mitocôndrias não têm um sistema eficiente de reparo de DNA e que mitocôndrias, tendo múltiplas cópias de DNA, simplesmente descartam

o DNA danificado. Este processo não é viável para os Trypanossomatídeos, devido à presença de sua única mitocôndria.

Estudos mostraram que muitos tipos de lesão de DNA são reparados através do BER ou reversão de dano na mitocôndria (Croteau, 1999; Sawyer, 1999). A única via de reparo descrita agindo canonicamente na mitocôndria é o BER (Larsen, 2005). Já foram relatadas a presença de algumas enzimas de outras vias de reparo de DNA, levando a acreditar que a presença dessas vias ocorra de uma forma reduzida nas mitocôndrias (Larsen, 2005), ou estas proteínas estão agindo de formas não canônicas.

Em vários organismos, variando de vírus para o homem, é bem conhecido que o reparo por recombinação é eficiente para a remoção de lesões de DNA e genes relacionados à recombinação são importantes para o reparo do DNA (Cox, 1999; M. Taylor, 1998; Thacker, 1999). No entanto, ainda não é claro se as mitocôndrias têm reparo por recombinação homóloga. Esse reparo ocorre em mitocôndrias de leveduras, mas em células de mamífero a recombinação não foi claramente demonstrada *in vivo* (Ling, 2000). Em *T. cruzi*, já foi demonstrado evidências do reparo por recombinação homóloga na mitocôndria *in vivo* e *in vitro*, através da descoberta de uma cópia de TcPol k que é restrita ao kDNA e o seu super expressor acelerou a recuperação dos parasitas expostos a radiação ionizante, além disso foi verificado *in vitro* que essa enzima tem a capacidade de polimerizar intermediários da junção de Holliday (Rajão, 2009). Mas ainda não se sabe ao certo quais enzimas estão envolvidas nessa via de reparo na mitocôndria desse organismo.

Os métodos clássicos de estudo de reparo de DNA mitocondrial consistem em estudar os genes, quantificar as lesões ou pela realização de experimentos com extratos mitocondriais. Nesse trabalho foi utilizado duas dessas metodologias, estudando os genes e quantificando as lesões. A fim de verificar a presença da via de recombinação homóloga foi utilizado células heminocáute para o gene TcRad51, caracterizado como sendo importante para o reparo por recombinação homóloga no núcleo do *T. cruzi*. Os resultados obtidos mostraram que as células com depleção de TcRad51 são mais sensíveis frente a tratamentos que levam a formação da quebra da dupla fita de DNA, de agentes genotóxicos que danificam o DNA total, MMS, assim como os que danificam apenas o kDNA, mt-cbl e mt-dox.

Os resultados com o agente genotóxico MMS mostraram que as células com depleção de TcRad51 são mais sensíveis em ambas as dosagens. Observamos uma parada maior no seu crescimento após tratamento com 1,5 mM de MMS e uma sensibilidade progressiva com 3 mM, que é mais clara nos tempos de 10hrs e 24hrs. Pela quantificação das lesões do kDNA do *T.cruzi* foi possível identificar especificamente as lesões ocasionadas por MMS na mitocôndria e os resultados obtidos com as células tratadas com 1,5 mM de MMS mostraram dois momentos de reparos nas células selvagens, um momento de reparo rápido e um momento lento. Quando essa técnica foi efetuada com as células heminocaute de TcRad51 foi mostrado claramente que a cinética de reparo do segundo momento foi alterada, mostrando uma dificuldade dessas células em lidar com essa lesão. Este resultado mostrou que o segundo momento tem o envolvimento massivo de TcRad51 e como já mencionado o MMS leva a formação de DSBs, o que sugere que TcRad51 está envolvido no processo de reparo de quebra dupla na mitocôndria.

Os agentes genotóxicos mt-dox e mt-clb (Wisnovsky, 2016), são direcionados corretamente para a mitocôndria do *T. cruzi*, como verificado pelo ensaio de microscopia com o mt-Dox, ensaio este possível de ser realizado pela característica química da Dox de ser um composto fluorescente que quando excitado a 490 nm é detectando em um microscópio de fluorescência (Jean, 2015). Como os dois compostos são acoplados ao mesmo peptídeo de captação mitocondrial, supomos que os dois sejam direcionados de forma similar, peptídeos esses que foram construídos de forma que atravessem e vençam as barreiras energéticas das membranas mitocondriais de células de mamíferos vivos (Wisnovsky, 2016).

O tratamento dos parasitas com o mt-cbl mostraram claramente uma sensibilidade dos parasitas heminocaute de TcRad51. Como já descrito anteriormente, o mt-cbl é um composto alquilante, causando lesões semelhante ao MMS, mas diferentemente do MMS ele leva a formação de monoadultos que podem levar a complicações mais severas na inibição da replicação do DNA, induzindo fortemente a formação de DSB (Caporali, 2004). Além disso, por causa de sua justaposição com outras bases no sulco maior do DNA, ele pode reagir com uma base de DNA para formar uma ligação cruzada entre o DNA (ICLs). Esse complexo de ligação cruzada de DNA é bastante estável (Jiang, 1997; Loeber, 2008) e seu reparo requer fatores de várias vias de reparo, como por exemplo excisão de nucleotídeos e reparo por recombinação homologa, atraindo várias proteínas de ligação,

provavelmente as proteínas BRCA1 e BRCA2, (Alexeyev, 2013). Em células HeLa cultivadas a adição de clorambucil prolongou a fase S e induziu um atraso mitótico correspondente. A magnitude desses efeitos se correlaciona com o nível de ligações cruzadas de DNA, o que sugere que pelo menos algumas lesões induzidas por clorambucil são duradouras (Roberts, 1975). O atraso mitótico poderia ser uma das formas de explicar os resultados observados no *T. cruzi* quando as células selvagens foram tratadas com 64 μ M. Essas células não estão se replicando corretamente, pois o seu crescimento fica completamente parado devido ao excesso de lesões. Essa parada é prolongada mostrando assim que também nesse organismo as lesões são duradoras. Quando vamos analisar as células heminocaute de TcRad51 é possível verificar que esse gene está relacionado diretamente com essas lesões e que a permanência do dano e a depleção de TcRad51 nessas células levam a morte celular.

Os resultados obtidos com mt-Dox também evidenciaram uma sensibilidade das células heminocaute de TcRad51, parando o seu crescimento celular por 24hrs na dosagem de 16 μ M. Quando foi realizado os ensaios com 32 μ M, verificou-se um efeito de genotóxico no *T. cruzi* já na primeira hora e um efeito mais pronunciado após 24hrs. O mt-dox tem como principal atividade a inibição da DNA Topoisomerase II (topo II), o que forma complexos de clivagem covalentes que resultam na geração de quebras da dupla fita de DNA, além de conter uma atividade oxidante (Jean, 2015). O que justificaria a maior sensibilidade nas células heminocaute de TcRad51 diminui a eficiência do reparo por recombinação homologa. A Topo II é uma enzima presente no *T. cruzi*, onde foi mostrado que desempenha um papel muito importante na replicação e organização do kDNA (Fragoso, 1992), o que justificaria a morte acentuada em ambas as cepas tratadas no tempo de 24hrs. Porém já foi mostrado em células humanas que a Topoisomerase II é necessária em complexos de transcrição envolvendo RNA polimerases II (Mondal, 2001), o que nos leva a acreditar que a morte evidenciada na primeira hora no tratamento na dosagem mais alta de mt-Dox seja decorrida da parada da transcrição, sendo assim uma morte rápida e de alguma forma com envolvimento de TcRad51.

Esses resultados ajudam evidenciar a presença de TcRad51 no reparo por recombinação homologa na mitocôndria de *T. cruzi*. Mas vale salientar que nunca foi possível detectar a presença da TcRad51 na mitocôndria de *T. cruzi*, assim como de *T. brucei* (Vieira-da-Rocha, 2019), ao contrário de células de humanos que já é

demonstrado o seu recrutamento em momentos de estresse (Sage e Knight, 2013). Acreditamos que a sua detecção não tenha sido possível devido a seu alto recrutamento no núcleo e pela sensibilidade da técnica de imunofluorescência. A utilização dos agentes genotóxicos mitocondriais específicos pode aumentar a presença dessa enzima na mitocôndria e, assim, poderia ser possível detectar essa enzima na mitocôndria por técnicas de imunofluorescência. Os dados obtidos por nosso grupo mostram já a presença de duas enzimas envolvidas com recombinação homologa na mitocôndria, TcRad51 e TcPol κ . Será importante verificar se outras enzimas que atuam na recombinação homologa no núcleo também atuam na mitocôndria, ou se o processo mitocondrial é característico dessa organela. Para tanto, pretendemos estudar outros genes dessa via e ver se os mesmos atuam na mitocôndria.

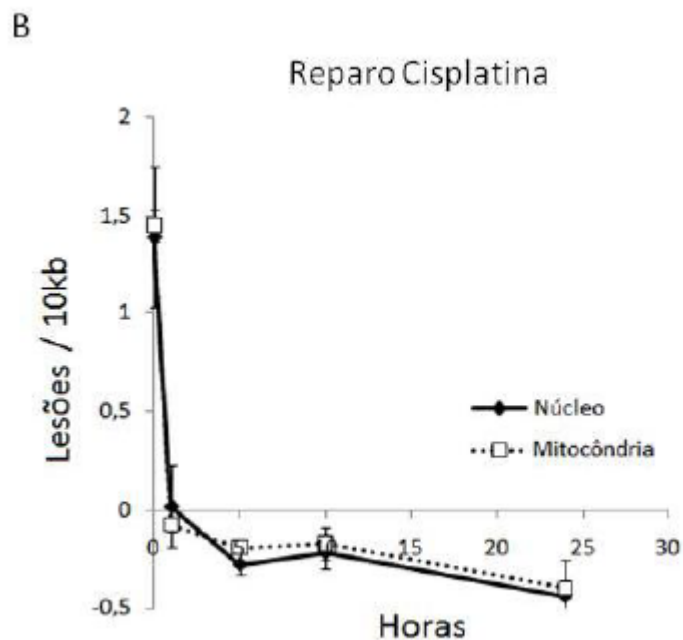
Uma pequena alteração foi observada na cinética de reparo no primeiro momento de reparo pelas lesões ocasionadas por MMS na mitocôndria. Resultados semelhantes foram obtidos no kDNA de *T. brucei*, deficientes de Rad51, tratados com MMS (Vieira-da-Rocha, 2019). Esse reparo em outros organismos é realizado pelo BER pelo fato do MMS ser um agente alquilante e as lesões geradas serem reconhecidas pela enzima AAG DNA glicosilase (Dragony Fu *et al.*, 2012; Wyatt e Pittman, 2006). Porém, o *T. cruzi* não apresenta em seu genoma a enzima AAG DNA glicosilase, impossibilitando a via de reparo ser feito pela via do BER. Como alternativa poderia então haver o envolvimento de outra via, no caso o NER, em que sua participação está sendo descrita como uma forma de reparar lesões causadas por MMS no núcleo (Dragony Fu *et al.*, 2012; Kanamitsu & Ikeda, 2011). Outro dado que corrobora para essa possibilidade foi um estudo em células de *T. brucei* nocautes para AP-endonuclease 1, enzima importante no BER, que não apresentaram sensibilidade ao MMS (Charret *et al.*, 2012), considerando que os sítios abásicos (AP) são mais citotóxicos que a lesão original era de se esperar que a ausência de APE-1 induziria uma sensibilidade nesses parasitas. Com esses dados, temos a hipótese que em tripanossomatídeos o reparo das lesões geradas por esse agente genotóxico seja realizado pelo NER e não pelo BER no núcleo. Como as cinéticas de reparo do núcleo e mitocôndria são semelhantes, especulamos que a mesma via esteja envolvida nas duas organelas. A alteração inicial (uma menor inclinação na curva de cinética) no reparo de lesões geradas pelo MMS em ambos os organismos (*T. cruzi* e *T. brucei*),

sugerem que a proteína rad51 pode interferir nessa via de reparo e essa seria uma atividade não canônica.

Um dado interessante na quantificação de dano pela qPCR *long range* de 3 mM de MMS, diferentemente da qPCR de 1,5mM de MMS, é que não foi possível detectar o reparo rápido nas células selvagens. Esse fato pode ser ocasionado pelo excesso de lesão que levou a uma morte rápida das células que impediu visualizar o processo de reparo. Esse fato estaria de acordo com o fato de acreditarmos que o reparo inicial seja devido a via de reparo por excisão de nucleotídeos. Dados do nosso laboratório mostram que lesões que bloqueiam a transcrição sinalizam para a morte e estas lesões são reparadas pela via de reparo por excisão de nucleotídeos. As células que sobrevivem neste primeiro momento podem fazer o reparo das lesões que ocorrem em um segundo momento e é feito pela recombinação homóloga.

Outra qPCR *long range* foi realizada no grupo com tratamento de Cisplatina (Mendes, 2015). O reparo do DNA nuclear e mitocondrial tem uma cinética semelhante para cisplatina, efeito similar ao observado com MMS, consistindo em um reparo rápido em 1 hora (**Figura 22**). Como a cisplatina é reparada principalmente pelo NER e esta via está ausente na mitocôndria de outros organismos, alguns estudos relatam que o seu efeito na mitocôndria e mostram que ela bloqueia a transcrição e replicação do mtDNA e marca para degradação seletiva essas mitocôndrias (Larsen, Rasmussen e Rasmussen, 2005), Como os Trypassomatídeos não podem realizar esse processo devido ter uma única mitocôndria, pode sugerir possível envolvimento dessa via de reparo na mitocôndria desse organismo.

Figura 22 - Cinética do aparecimento e do reparo de danos no DNA nuclear e mitocondrial



Legenda: Após tratamento com 300mM de cisplatina por uma hora. A frequência de lesões foi analisada em um intervalo de tempo de 24 horas. As barras verticais representam o erro padrão da média (Mendes, 2015).

Afim de investigar o TC-NER na mitocôndria do *T. cruzi* foi realizado experimentos com o mt-Dox com células heminocaute e superexpressora de TcCSB, pois esta é uma enzima de reparo essencial na via TC-NER. Ela reconhece a RNA polimerase parada e retirar a mesma do local da lesão.

Os resultados com as células heminocaute e superexpressora de TcCSB obtidos após o tratamento com mt-Dox mostraram uma sensibilidade das células heminocaute de TcCSB na primeira uma hora após tratamento, uma morte menor nas células selvagens e nenhuma morte nas células superexpressora de TcCSB. No decorrer da curva de crescimento, as células heminocaute e selvagens voltaram o crescimento, porém as células superexpressora não retornam o crescimento nas primeiras 24hrs. Acreditamos que as células superexpressora de TcCSB, não morreram por acabar reconhecendo mais RNA polimerases paradas, logo sinalizando para o sistema de reparo iniciar o processo. O seu retorno no crescimento acaba sendo tardio, justamente pelo seu excesso de sinalização. Experimentos realizados com essa droga mostrou que existe uma sinalização mitocondrial (Assis, 2019, no prelo) diferente das sinalizações nucleares. Para verificar se essa sinalização é

dependente de ATM e ATR pode ser realizado experimentos com inibidores para os mesmos, além disso, realizar *western blot*, para γ H2A, afim de verificar se essa sinalização se propaga para o núcleo desses parasitos. As células heminocaute de TcCSB, teve uma morte maior em comparação as células selvagens, logo, acreditamos que a depleção desse gene acarretou em uma diminuição das lesões que são reconhecidas pelo sistema de reparo, o que acabou levando a uma morte celular. Esses resultados corroboram com os indícios do possível envolvimento do NER presente na mitocôndria do *T. cruzi*. Vale salientar que o NER nunca foi mencionado em nenhuma mitocôndria de eucariotos, acreditamos que a preservação dessa via, assim como outras se mostram importantes em *Trypanossomatídeos* devido a presença de sua única mitocôndria, e da complexa organização do seu genoma. Para confirmarmos se o NER ocorre na mitocôndria como ocorre no núcleo, pretendemos estudar os outros genes dessa via e ver se a ausência deles interfere no reparo do DNA mitocondrial.

Portanto, os dados apresentados nessa dissertação sugerem a atuação de dois genes, TcRad51 e TcCSB, no reparo de DNA mitocondrial, O gene TcRad51 está envolvido com a recombinação homologa e está via parece estar presente na organela de *T. cruzi* como em outros organismos (Ling, 2000, Chen, 2013; Shedge, 2007). O gene CSB também já foi descrito na mitocôndria de outros organismos, mas nessas células ele está envolvido com a resposta ao estresse oxidativo (D'Errico, 2013; Kamenisch, 2013). Entretanto, em *T. cruzi*, temos evidências que o gene TcCSB estaria atuando no reparo por excisão de nucleotídeos e esta seria a primeira vez que esta via é descrita na mitocôndria.

6 REFERÊNCIAS

- A. E. PEGG. **DNA Repair and Carcinogenesis by Alkylating Agents**. Chemical C ed. Berlin: Springer: [s.n.].
- ABU-ELNEEL, K. *et al.* Intramitochondrial localization of universal minicircle sequence-binding protein, a trypanosomatid protein that binds kinetoplast minicircle replication origins. **Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 4, p. 725–733, 2001.
- AGUIAR, P. H. N. *et al.* Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2279, 13 jun. 2013.
- AKBARI, M. *et al.* Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. **DNA Repair**, v. 8, n. 7, p. 834–843, jul. 2009.
- ALEXEYEV, MIKHAIL *et al.* The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 5, p. a012641–a012641, 2013.
- ALEXEYEV, M. *et al.* The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity--Critical Analysis and Update. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 5, p. a012641–a012641, 1 maio 2013.
- ALFONZO, J. D.; THIEMANN, O.; SIMPSON, L. The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 19, p. 3751–3759, 1997.
- ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair**, v. 6, n. 6, p. 695–711, jun. 2007.
- ALTMAYER, M.; LUKAS, J. To spread or not to spread—chromatin modifications in response to DNA damage. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 23, n. 2, p. 156–165, abr. 2013.
- ANTONIO, M. DI; MCLUCKIE, K. I. E.; BALASUBRAMANIAN, S. Reprogramming the mechanism of action of chlorambucil by coupling to a G-quadruplex ligand. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 16, p. 5860–5863, 2014.
- ASSIS, A. V. DE; MACHADO, C. R. Lesões no DNA nuclear e mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sinalizam para diferentes tipos de morte. [s.d.].
- BELLERA, C. L. *et al.* Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: Discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 2402–2408, 2013.
- BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n. 1, p. 11–30, 1990.
- BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011.
- BERRIMAN, M. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*.

Science, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 15 jul. 2005.

BHATTI, S. *et al.* ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 18, p. 2977–3006, 2 set. 2011.

BMC *et al.* Trypanosoma cruzi mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**, v. 7, n. 7, p. 1–18, 2006.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages? **Parasitology Today**, v. 15, n. 1, p. 22–28, 1 jan. 1999.

BOHR, V. A.; ANSON, R. M. Mitochondrial DNA repair pathways. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, n. 4, p. 391–398, 1999.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CAPORALI, S. *et al.* DNA Damage Induced by Temozolomide Signals to both ATM and ATR: Role of the Mismatch Repair System. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 478 LP – 491, 1 set. 2004.

CARYN BERN, M.D., M. P. . Chagas disease. **The new engl and journal of medicine**, v. 31, n. 12, p. 30–33, 2015.

CHANG, J. H. *et al.* Crystal structure of the Mus81-Eme1 complex. **Genes & Development**, v. 22, n. 8, p. 1093–1106, 26 mar. 2008.

CHATTERJEE, N. Mechanisms of DNADamage, Repair, andMutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 1, p. 229–235, 2017.

CHEN, J.; FURANO, A. V. Breaking bad: The mutagenic effect of DNA repair. **DNA Repair**, v. 32, p. 43–51, ago. 2015.

CHEN, L. *et al.* Cell Cycle-dependent Complex Formation of BRCA1·CtIP·MRN Is Important for DNA Double-strand Break Repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7713–7720, 21 mar. 2008.

CHEN, X. J. Mechanism of Homologous Recombination and Implications for Aging-Related Deletions in Mitochondrial DNA. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 476–496, 2013.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 22 out. 2010.

CICCIA, A.; MCDONALD, N.; WEST, S. C. Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 259–287, jun. 2008.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 7, p. 2777–2781, 1 jul. 1974.

COMPE, E.; EGLY, J.-M. TFIIH: when transcription met DNA repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 343–354, 10 jun. 2012.

COPELAND, W. C.; LONGLEY, M. J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. **DNA Repair**, v. 19, p. 190–198, jul. 2014.

- COX, M. M. Recombinational DNA Repair in Bacteria and the RecA Protein. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 311–366.
- CROTEAU, D. L.; STIERUM, R. .; BOHR, V. A. Mitochondrial DNA repair pathways. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 434, n. 3, p. 137–148, jul. 1999.
- CRUTZEN, P. J.; ANDREAE, M. O. Biomass Burning in the Tropics: Impact on Atmospheric Chemistry and Biogeochemical Cycles. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1669 LP – 1678, 21 dez. 1990.
- D'ERRICO, M. *et al.* The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5–6, p. 261–269, maio 2013.
- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, abr. 2013.
- EDIFIZI, D.; SCHUMACHER, B. Genome instability in development and aging: Insights from nucleotide excision repair in humans, mice, and worms. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1855–1869, 2015.
- EL-SAYED, N. M. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 15 jul. 2005.
- FAGBEMI, A. F.; ORELLI, B.; SCHÄRER, O. D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. **DNA Repair**, v. 10, n. 7, p. 722–729, jul. 2011.
- FEKAIRI, S. *et al.* Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 78–89, jul. 2009.
- FERGUSON, M. *et al.* In situ hybridization to the crithidia fasciculata kinetoplast reveals two antipodal sites involved in kinetoplast DNA replication. **Cell**, v. 70, n. 4, p. 621–629, 21 ago. 1992.
- FONSECA, S. B. *et al.* Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. **Chemistry and Biology**, v. 18, n. 4, p. 445–453, 2011.
- FOUSTERI, M. *et al.* Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. **Molecular Cell**, v. 23, n. 4, p. 471–482, ago. 2006.
- FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1–2, p. 127–134, 1992.
- FRIEDBERG, E. C. **DNA Repair and Mutagenesis**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- FURTADO, C. *et al.* Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42484, 2 ago. 2012.
- GOMES PASSOS SILVA, D. *et al.* The in vivo and in vitro roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–25, 2018.
- GOTT, J. M.; EMESON, R. B. FUNCTIONS AND MECHANISMS OF RNA EDITING. p. 499–531, 2000.
- GREDILLA, R.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. Mitochondrial DNA repair and

association with aging – An update. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 7–8, p. 478–488, ago. 2010.

HARBAUER, A. B. *et al.* The protein import machinery of mitochondria - A regulatory hub in metabolism, stress, and disease. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 357–372, 2014.

HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Ten Years After. **Molecular Cell**, v. 28, n. 5, p. 739–745, 14 dez. 2007.

HEYER, W. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. **Current Genetics**, n. November, 2006.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, maio 2001.

HOLLOMAN, W. K. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 7, p. 748–754, 6 jul. 2011.

HOLT, I. J. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 358–365, jul. 2009.

HOUSE, N. C. M.; KOCH, M. R.; FREUDENREICH, C. H. Chromatin modifications and DNA repair: Beyond double-strand breaks. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. SEP, p. 1–18, 2014.

HOWELL, N. Human Mitochondrial Diseases: Answering Questions and Questioning Answers. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 49–116.

ISABELA CECÍLIA MENDES. **O papel dos genes TcCSB e TcXPC no metabolismo de DNA em Trypanosoma cruzi**. [s.l.] UFMG, 2015.

IVENS, A. C. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 15 jul. 2005.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, out. 2009.

JEAN, S. R. *et al.* Mitochondrial Targeting of Doxorubicin Eliminates Nuclear Effects Associated with Cardiotoxicity. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 9, p. 2007–2015, 2015.

JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 473–491, 2012.

JIANG, C.-Z. *et al.* UV- and Gamma-Radiation Sensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 147, n. 3, p. 1401 LP – 1409, 1 nov. 1997.

JOSÉ A PÉREZ-MOLINA, I. M. Chagas disease. **Seminar**, v. 31, n. 12, p. 30–33, 2017.

KAMENISCH, Y.; BERNEBURG, M. Mitochondrial CSA and CSB: Protein interactions and protection from ageing associated DNA mutations. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5–6, p. 270–274, maio 2013.

KAZAK, L.; REYES, A.; HOLT, I. J. Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p.

659–671, 2012.

KRASNOW, M. A.; COZZARELLI, N. R. Catenation of DNA Rings by Topoisomerases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2687–2693, 1982.

KUNRATH-LIMA, M. *et al.* Characterization of Trypanosoma cruzi MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017.

LARSEN, N. B.; RASMUSSEN, M.; RASMUSSEN, L. J. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? **Mitochondrion**, v. 5, n. 2, p. 89–108, abr. 2005.

LAWLEY, P. D. Effects of Some Chemical Mutagens and Carcinogens on Nucleic Acids. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 5, n. C, p. 89–131, 1966.

LEE, J. H.; JUNG, H. S.; GÜNZL, A. Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote Trypanosoma brucei harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 11, p. 3811–3820, jun. 2009.

LING, F. A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 24, p. 4956–4963, 15 dez. 2000.

LIU, X. *et al.* Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. **Brain Research**, v. 1254, p. 18–27, 2009.

LOPES, D. DE O. *et al.* Biochemical studies with DNA polymerase β and DNA polymerase β -PAK of Trypanosoma cruzi suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA Repair**, v. 7, n. 11, p. 1882–1892, nov. 2008.

LUKES, J. *et al.* MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. **Society**, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.

M. TAYLOR A. R. LEHMANN, E. Review: Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms. **International Journal of Radiation Biology**, v. 74, n. 3, p. 277–286, 3 jan. 1998.

MARINI, F. *et al.* DNA nucleotide excision repair-dependent signaling to checkpoint activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17325–17330, 14 nov. 2006.

MARTEIJN, J. A. *et al.* Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 465–481, 23 jul. 2014.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

MASUTANI, C. *et al.* Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 8, p. 1831–1843, 1994.

MAZIN, A. V. *et al.* Rad54, the motor of homologous recombination. **DNA Repair**, v. 9, n. 3, p. 286–302, mar. 2010.

MCCULLOCH, S. D.; KOKOSKA, R. J.; KUNKEL, T. A. Efficiency, Fidelity and

Enzymatic Switching During Translesion DNA Synthesis. **Cell Cycle**, v. 3, n. 5, p. 578–581, 28 maio 2004.

MEAS, R.; WYRICK, J. J.; SMERDON, M. J. Nucleosomes regulate base excision repair in chromatin. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, n. June, p. 0–1, 2017.

MELENDY, T.; SHELINE, C.; RAY, D. S. Localization of a type II DNA topoisomerase to two sites at the periphery of the kinetoplast DNA of *Crithidia fasciculata*. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 1083–1088, 23 dez. 1988.

MITCHELL, D. L.; JEN, J.; CLEAVER, J. E. RELATIVE INDUCTION OF CYCLOBUTANE DIMERS and CYTOSINE PHOTOHYDRATES IN DNA IRRADIATED in vitro and in vivo WITH ULTRAVIOLET-C and ULTRAVIOLET-B LIGHT. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 741–746, nov. 1991.

MONDAL, N.; PARVIN, J. D. DNA topoisomerase II α is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. v. 2960, n. 1999, p. 1999–2002, 2001.

MOSER, J. *et al.* Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III α in a Cell-Cycle-Specific Manner. **Molecular Cell**, v. 27, n. 2, p. 311–323, jul. 2007.

NIMONKAR, A. V. *et al.* BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. **Genes & Development**, v. 25, n. 4, p. 350–362, 15 fev. 2011.

NISHI, R. *et al.* Centrin 2 Stimulates Nucleotide Excision Repair by Interacting with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 13, p. 5664–5674, 1 jul. 2005.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338–350, 20 maio 2009.

ODELL, I. D.; WALLACE, S. S.; PEDERSON, D. S. Rules of engagement for base excision repair in chromatin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 258–266, fev. 2013.

OGBADOYI, E. O.; DERRICK R. ROBINSON, AND K. G. A High-Order Trans-Membrane Structural Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and Segregation by Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. November, p. 3915–3929, 2002.

OGI, T. *et al.* Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells. **Molecular Cell**, v. 37, n. 5, p. 714–727, mar. 2010.

PASCUCCI, B. *et al.* DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, n. 2, p. 417–427, out. 1997.

PASCUCCI, B. *et al.* The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G 1 phase is recombinogenic in DNA polymerase β defective mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 1, p. 280–288, 2005.

PASSOS-SILVA, D. G. *et al.* Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 1–14, 2010.

PFEIFFER, P. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289–302, 1 jul. 2000.

POLO, S. E.; JACKSON, S. P. POLO, JACKSON - 2011 - prot reparo. p. 409–433, 2011.

PROUDFOOT, C. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 21, p. 6906–6919, 27 nov. 2005.

RAJÃO, M. A. *et al.* DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 185–197, 2009.

RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, maio 2014.

RASS, U. *et al.* Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. **Genes & Development**, v. 24, n. 14, p. 1559–1569, 15 jul. 2010.

REGIS-DA-SILVA, C. G. *et al.* Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 191–200, 2006.

ROBERTS, J. J. Inactivation of the dna template in HeLa cells treated with chlorambucil. **International Journal of Cancer**, v. 16, n. 1, p. 91–102, 15 jul. 1975.

RYAN, K. A. *et al.* Replication of Kinetoplast DNA in Trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 339–358, out. 1988.

RYAN, K. A.; ENGLUND, P. T. Synthesis and processing of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma equiperdum*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 8, p. 3212–3217, 2015.

SAGE, J. M.; KNIGHT, K. L. Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 350–356, jul. 2013.

SALE, J. E. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. a012708–a012708, 1 mar. 2013.

SANTOS, J. H. *et al.* Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. **DNA Repair**, n. 1, 2006.

SAWYER, D. E.; HOUTEN, B. VAN. Repair of DNA damage in mitochondria. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 434, n. 3, p. 161–176, jul. 1999.

SCHAMBER-REIS, B. L. F. *et al.* DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 2, p. 122–131, jun. 2012.

SCRIMA, A. *et al.* Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1–DDB2 Complex. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1213–1223, dez. 2008.

SEBESTA, M. *et al.* Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. **DNA Repair**, v. 12, n. 9, p. 691–698, 2013.

SHAPIRO, T. A. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 16, p. 7809–13, 1993.

SHEDGE, V. *et al.* Plant Mitochondrial Recombination Surveillance Requires Unusual RecA and MutS Homologs. **The Plant Cell**, v. 19, n. 4, p. 1251–1264, abr. 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA PAES, L. *et al.* The Uniqueness of the Trypanosoma cruzi Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 20, p. 2074–2099, 2011.

SIMPSON, L.; ESTE, A. M. Uridine insertion / deletion RNA editing in trypanosome mitochondria — a review. **Gene**, v. 240, p. 247–260, 1999.

SOUZA, W. DE. A Short Review on the Morphology of Trypanosoma cruzi: From 1909 to 1999. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 17–36, 1999.

STRACKER, T. H.; PETRINI, J. H. J. The MRE11 complex: starting from the ends. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 90–103, 21 fev. 2011.

STURM, N. R.; SIMPSON, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 879–884, 1 jun. 1990.

SUN, Y. *et al.* A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 37, p. 13182–13187, 13 set. 2005.

SVILAR, D. *et al.* Base Excision Repair and Lesion-Dependent Subpathways for Repair of Oxidative DNA Damage. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2491–2507, 15 jun. 2011.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.

THACKER, J. The role of homologous recombination processes in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. **Biochimie**, v. 81, n. 1–2, p. 77–85, jan. 1999.

TRIVEDI, R. N. *et al.* The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. **Cancer Research**, v. 65, n. 14, p. 6394–6400, 2005.

TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. The Life Cycle Of Trypanosoma Cruzi. v. 31, p. 1–11, 2011.

VERNER, Z. *et al.* Malleable Mitochondrion of Trypanosoma brucei. *In: International Review of Cell and Molecular Biology*. [s.l: s.n.]. v. 315p. 73–151.

VIEIRA-DA-ROCHA, J. P. *et al.* The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. **DNA Repair**, v. 73, n. June 2018, p. 78–90, 2019.

WATERS, L. S.; WALKER, G. C. The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G2/M phase rather than S phase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 24, p. 8971–8976, 13 jun. 2006.

WISNOVSKY, S.; JEAN, S. R.; KELLEY, S. O. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 567–573, 2016a.

_____. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 567–573, 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 1 jul. 2019.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1580–1594, 2006.

XU, D. *et al.* RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. **Genes & Development**, v. 22, n. 20, p. 2843–2855, 15 out. 2008.

YOKOI, M. *et al.* The Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex XPC-HR23B Plays an Important Role in the Recruitment of Transcription Factor IIH to Damaged DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9870–9875, 31 mar. 2000.

ZHANG, F. *et al.* PALB2 Functionally Connects the Breast Cancer Susceptibility Proteins BRCA1 and BRCA2. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1110–1118, 1 jul. 2009.

ZUMA, A. A. *et al.* Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 5, p. 449–456, 2011.