

**Héllida Marina Costa Silva**

**Estudo dos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA  
durante o estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi***

**Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil  
Maio de 2019**

**Héllida Marina Costa Silva**

**Estudo dos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA  
durante o estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi***

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato  
Machado**

Tese de Doutorado submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
Maio de 2019**



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



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE HÉLLIDA MARINA COSTA SILVA.**  
 Aos vinte e dois dias do mês de maio de 2019 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" Estudo dos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA durante o estresse replicativo em Trypanosoma cruzi"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Maria Carolina Elias (Instituto Butantan - SP), aprovada; Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi (Universidade de São Paulo - RP), aprovada; Dr. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luciana de Oliveira Andrade (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 22 de maio de 2019.

Dr. Maria Carolina Elias (Instituto Butantan - SP) *Carolina Elias*

Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi (Universidade de São Paulo - RP) *Luiz Orsini*

Dr. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG) *Mariana T. Q. de Magalhães*

Dr. Luciana de Oliveira Andrade (UFMG) *Luciana de Oliveira Andrade*

Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG) *Carlos R. Machado*

*Adela Queiroz Vianna*  
 Prof.ª Adela Queiroz Vianna  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

Dedico esta tese a todos que me apoiaram  
e incentivaram ao longo desta trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Carlos Renato pela orientação ao longo desses seis anos de pós-graduação. Muito obrigada por todo ensinamento transmitido, pela disponibilidade em discutir o projeto, pela presença curiosa durante a execução dos experimentos e pelo entusiasmo com o qual conduz o nosso trabalho.

Agradeço aos demais professores do Laboratório de Genética Bioquímica pelas críticas e sugestões apresentadas ao projeto. Em especial, agradeço ao professor Erich, que está sempre presente nas bancadas do laboratório, tirando nossas dúvidas sobre a realização dos experimentos e os resultados gerados. Também agradeço às técnicas do laboratório, Neuza e Lorrane, por coordenarem as atividades de manutenção do LGB.

Agradeço a todos os alunos e ex-alunos do LGB, especialmente ao grupo de reparo, pela rotina de trabalho harmoniosa, pelas ideias e sugestões ao projeto, pela ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Agradeço aos demais laboratórios do ICB por compartilhar protocolos, reagentes e equipamentos, que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Stenio Fragoso e sua aluna Adriana Umaki, que construíram e, gentilmente, nos mandaram os parasitos nocautes para as topoisomerasas. A utilização destas células contribuiu de forma valiosa para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço ao professor Richard McCulloch pelo fornecimento do anticorpo anti- $\gamma$ H2A, que permitiu a realização do Western blot. Agradeço à professora Maria Carolina Elias e aos demais integrantes do Laboratório Especial de Ciclo Celular, pela recepção e pela ajuda na realização dos experimentos. Agradeço às agências de fomento, CNPq, Capes e Fapemig, pelo financiamento que tornou possível a execução deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, aos que estão sempre por perto e aos que vejo ocasionalmente, pelo companheirismo e parceria que tornam a minha vida mais feliz e divertida.

Agradeço ao Víctor, meu namorado e melhor amigo, por todo apoio, carinho e compreensão. Por sempre estar comigo, apesar da distância, tornando a minha vida mais simples e melhor. Ao meu pai por incentivar os meus estudos, contribuindo para que eu chegasse até aqui. Sei que o senhor estaria muito orgulhoso de mim por concluir esta etapa. À minha mãe pelo amor incondicional, por sempre torcer por mim e acreditar na minha capacidade. Por ser um exemplo de força e superação, me mostrando que nunca é tarde para recomeçar e buscar os nossos sonhos. À minha irmã, que é uma parte fundamental da minha vida, agradeço pela amizade e pelo amor. Por entender o meu jeito diferente, por estar sempre comigo e por torcer pela minha felicidade. Ao Ringo e ao Hart, por estarem ao meu lado (literalmente) durante a escrita da tese e encherem a minha vida com amor.

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho, colocando tantas pessoas especiais em minha vida. “A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode” (Isaac Newton).

A todos vocês que fizeram parte desta jornada, meu muito obrigada!

“The success is not final, failure is not fatal. It is the courage to continue that counts.”

Winston Churchill

# SUMÁRIO

Resumo .....	i
Abstract .....	ii
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	vii
1. Introdução .....	1
1.1. A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2. A replicação do DNA e o estresse replicativo .....	9
1.3. As vias de sinalização e reparo dos danos de DNA .....	14
1.4. Controle do estado topológico do DNA da célula: as DNA topoisomerasas .....	25
2. Objetivos .....	35
2.1. Objetivo Geral .....	35
2.2. Objetivos Específicos .....	35
3. Material e Métodos .....	36
3.1. Células utilizadas e condições de cultivo .....	36
3.2. Curva de crescimento na presença de agentes genotóxicos .....	37
3.3. Análise da progressão do ciclo celular por FACS .....	38
3.4. Preparo do extrato total de proteínas e quantificação pelo método de Bradford .....	38
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot para mensurar o dano no DNA .....	39
3.6. Iniciadores .....	41
3.7. Reação em cadeia da polimerase .....	44
3.8. Clonagem das regiões intergênicas dos genes TcATM e TcATR .....	46
3.9. Montagem dos cassetes de deleção .....	48
3.10. Sequenciamento de DNA plasmidial .....	50
3.11. Transfecção de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
3.12. Reação de PCR com os parasitos selecionados .....	52
3.13. Extração de RNA total e confirmação dos heminocautes por RT-qPCR .....	52

4. Resultados .....	55
4.1. ATM e ATR em <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener .....	55
4.2. Montagem dos cassetes de deleção no vetor pGEM T- <i>Easy</i> .....	56
4.3. Montagem dos cassetes de deleção total no vetor pTc2KO .....	60
4.4. Reação de PCR com os parasitos selecionados para detectar e localizar o cassete de deleção total .....	64
4.5. Análise do número de cópias e nível de expressão por RT-qPCR .....	66
4.6. Montagem dos cassetes de deleção parcial no vetor pTc2KO .....	69
4.7. Análise por RT-qPCR do número de cópias e do nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos selecionados .....	75
4.8. Reação de PCR com a cultura selecionada para localizar o cassete de deleção parcial do gene TcATM .....	78
4.9. Curva de crescimento após a exposição à radiação gama .....	78
4.10. Resposta ao estresse replicativo causado pelo MMS .....	80
4.11. Resposta ao estresse replicativo causado pela hidroxureia .....	86
4.12. Resposta ao estresse replicativo causado pela cisplatina .....	91
4.13. Resposta ao estresse replicativo causado pela camptotecina .....	97
4.14. Resposta ao estresse replicativo causado pela luz UV .....	97
5. Discussão .....	100
6. Conclusão .....	117
7. Referências Bibliográficas .....	118
8. Anexos .....	132
8.1. Anexo 1: Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega) .....	132
8.2. Anexo 2: Mapas dos vetores pTc2KO-Higro e pTc2KO-Neo .....	133
8.3. Anexo 3: Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com 10 mM ou 30 mM de HU.....	134
8.4. Anexo 4: Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com 50 µM de cisplatina .....	137
8.5. Anexo 5: Manuscrito do artigo da tese .....	139

## RESUMO

Lesões não reparadas no DNA, quantidades limitadas de dNTPs ou estresse topológico causado pela transcrição do DNA podem diminuir ou parar a progressão da forquilha de replicação, o que é conhecido como estresse replicativo. A DNA topoisomerase 3 $\alpha$  atua na dissolução das junções de Holliday durante a recombinação homóloga e a DNA topoisomerase 3 $\beta$  suprime o acúmulo dos *R-loops* formados durante a transcrição. Logo, estas enzimas podem prevenir o estresse replicativo. Uma vez que as forquilhas de replicação tenham parado o seu movimento, as células eucarióticas contam com as cinases ATM e ATR para coordenar as transições do ciclo celular, recrutar proteínas de reparo e regular a apoptose. Tanto os genes das topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  quanto das cinases ATM e ATR estão presentes no genoma dos tripanossomatídeos, contudo, as funções destas proteínas não estão claras no *Trypanosoma cruzi*, o parasito causador da doença de Chagas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel destas enzimas durante o estresse replicativo em *T. cruzi*. Para analisar o envolvimento da topoisomerase 3 $\alpha$  no reparo por recombinação homóloga, parasitos selvagens (WT) e nocautes (Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO) foram expostos à radiação gama. Apenas as células Topo3 $\alpha$  KO não foram capazes de retomar o crescimento após o tratamento, indicando a importância desta enzima durante essa via de reparo. Estas células também foram tratadas com drogas capazes de parar a forquilha de replicação. Em comparação aos parasitos WT e Topo3 $\beta$  KO, os parasitos Topo3 $\alpha$  KO foram mais sensíveis ao tratamento com cisplatina, hidroxíureia e metil metano sulfonato (MMS). Entretanto, foi observado uma variação na sensibilidade das células Topo3 $\alpha$  KO durante os tratamentos testados, o que indica o envolvimento de mais de uma via de reparo na resolução do estresse replicativo mediada pela topoisomerase 3 $\alpha$ . Uma diferença similar também foi observada na célula deficiente em Rad51, a recombinase que atua na recombinação homóloga, o que corrobora a participação da topoisomerase 3 $\alpha$  nesta via de reparo. Para estudar a função das cinases ATM e ATR, epimastigotas selvagens da cepa CL Brener foram transfectados com um cassete de deleção, o que permite a geração de parasitos heminocautes para os genes alvos. Após a transfecção foram corretamente selecionados parasitos com níveis reduzidos de ATM. O estudo destas células permitirá uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta à quebra de fita dupla em *T. cruzi*.

## ABSTRACT

Unrepaired DNA damage, limited concentration of free dNTPs, or topological stress caused by DNA transcription may slow or stall the replication fork progression, which is known as replicative stress. DNA topoisomerase 3 $\alpha$  dissolutes the Holliday junctions during homologous recombination and DNA topoisomerase 3 $\beta$  suppresses the accumulation of R-loops formed during transcription. Therefore, these enzymes can prevent replicative stress. Once replication forks have stopped their movement, eukaryotic cells rely on ATM and ATR kinases to coordinate cell cycle transitions, recruit repair proteins, and regulate apoptosis. Both topoisomerase 3 $\alpha$  and 3 $\beta$  genes as well as ATM and ATR kinases are present in the trypanosomatid genome, but the functions of these proteins are unclear in *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes Chagas disease. Thus, the present work aimed to evaluate the role of these enzymes during the replicative stress in *T. cruzi*. To analyze the involvement of topoisomerase 3 $\alpha$  in the homologous recombination repair, wild type parasite (WT) and knockout parasites (Topo3 $\alpha$  KO and Topo3 $\beta$  KO) were exposed to gamma radiation. Only Topo3 $\alpha$  KO cells were unable to resume growth after treatment, indicating the importance of this enzyme during this repair pathway. These cells were also treated with drugs that halt the replication fork. Topo3 $\alpha$  KO parasites were more sensitive to treatment with cisplatin, hydroxyurea and methyl methane sulfonate (MMS) than WT and Topo3 $\beta$  KO parasites. However, it was observed a variation in the sensitivity of Topo3 $\alpha$  KO cells during the treatments tested, which indicates the involvement of more than one repair pathway in topoisomerase 3 $\alpha$ -mediated replicative stress resolution. A similar difference was also observed in the Rad51 deficient cells, the recombinase that acts on homologous recombination, which corroborates the participation of topoisomerase 3 $\alpha$  in this repair pathway. To study the function of ATM and ATR kinases, wild type epimastigotes of CL Brener strain were transfected with a deletion cassette, which allows the generation of single knockout parasites for the target genes. After transfection, parasites with reduced ATM levels were correctly selected. The study of these cells will allow a better understanding of the mechanisms involved in the DNA double strand break response in *T. cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das alterações morfológicas do <i>Trypanosoma cruzi</i> ao longo do seu ciclo de vida .....	3
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
<b>Figura 3:</b> Licenciamento e ativação da origem de replicação .....	11
<b>Figura 4:</b> Modelo do mecanismo de ativação da cinase ATM .....	17
<b>Figura 5:</b> Modelo do mecanismo de ativação da cinase ATR .....	19
<b>Figura 6:</b> Vias de reparo associadas aos diversos tipos de lesões encontradas no DNA .....	22
<b>Figura 7:</b> Geração de parasitos nocautes para as topoisomerasas 3 $\alpha$ e 3 $\beta$ .....	32
<b>Figura 8:</b> Caracterização dos parasitos nocautes para as topoisomerasas 3 $\alpha$ e 3 $\beta$ .....	33
<b>Figura 9:</b> Domínios proteicos presentes nas cinases ATM e ATR .....	56
<b>Figura 10:</b> Amplificação dos fragmentos de interesse para a montagem do cassete de deleção .....	57
<b>Figura 11:</b> PCR de colônia .....	58
<b>Figura 12:</b> Digestão dos plasmídeos contendo os genes de resistência .....	59
<b>Figura 13:</b> Verificação da ligação entre o fragmento 3'DW e o gene de resistência à neomicina .....	59
<b>Figura 14:</b> Amplificação das regiões intergênicas dos genes ATM e ATR .....	60
<b>Figura 15:</b> PCR de colônia .....	61
<b>Figura 16:</b> Digestão com as enzimas <i>KpnI</i> e <i>SalI</i> .....	61
<b>Figura 17:</b> PCR de colônia .....	62
<b>Figura 18:</b> Digestão com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>XbaI</i> .....	63
<b>Figura 19:</b> PCR de colônia .....	63
<b>Figura 20:</b> PCR com os plasmídeos para confirmar a construção dos cassetes de deleção total .....	64
<b>Figura 21:</b> Digestão com as enzimas <i>KpnI</i> e <i>XbaI</i> para liberação do cassete de deleção total .....	65
<b>Figura 22:</b> PCR com os DNAs genômicos das culturas selecionadas após a transfecção para confirmar a presença dos cassetes de deleção total .....	66
<b>Figura 23:</b> PCR para localização dos cassetes de deleção total nas culturas selecionadas após a transfecção .....	67

<b>Figura 24:</b> Análise do número de cópias dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes .....	68
<b>Figura 25:</b> Análise do nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes .....	68
<b>Figura 26:</b> Amplificação dos fragmentos de interesse para a montagem do cassete de deleção parcial .....	69
<b>Figura 27:</b> PCR de colônia .....	70
<b>Figura 28:</b> Digestão com as enzimas <i>KpnI</i> e <i>SalI</i> .....	70
<b>Figura 29:</b> PCR de colônia. ....	71
<b>Figura 30:</b> Digestão com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>XbaI</i> .....	72
<b>Figura 31:</b> PCR de colônia .....	72
<b>Figura 32:</b> PCR com os plasmídeos para confirmar a construção do cassete de deleção parcial .....	73
<b>Figura 33:</b> Alinhamento entre as sequências de TcATM e TcATR obtidas por sequenciamento e depositadas no banco de dados.....	74
<b>Figura 34:</b> Digestão com as enzimas <i>KpnI</i> e <i>XbaI</i> para a liberação do cassete de deleção parcial .....	76
<b>Figura 35:</b> Análise do número de cópias dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes .....	77
<b>Figura 36:</b> Análise do nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes .....	77
<b>Figura 37:</b> PCR para localização do cassete de deleção parcial na cultura selecionada após a transfecção .....	79
<b>Figura 38:</b> Curva de crescimento após radiação gama .....	80
<b>Figura 39:</b> Curva de crescimento dos parasitos selvagens após o tratamento com MMS .....	81
<b>Figura 40:</b> Curva de crescimento após o tratamento com MMS .....	83
<b>Figura 41:</b> Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com MMS .....	84
<b>Figura 42:</b> Nível de dano no DNA após o tratamento com MMS .....	85
<b>Figura 43:</b> Curva de crescimento de Rad51+/- após o tratamento com MMS .....	86
<b>Figura 44:</b> Curva de crescimento com hidroxíureia .....	88
<b>Figura 45:</b> Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com HU .....	89
<b>Figura 46:</b> Nível de dano no DNA após o tratamento com HU .....	91

<b>Figura 47:</b> Curva de crescimento de Rad51 +/- com HU .....	92
<b>Figura 48:</b> Curva de crescimento com cisplatina .....	94
<b>Figura 49:</b> Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com cisplatina .....	95
<b>Figura 50:</b> Nível de dano no DNA após o tratamento com cisplatina .....	96
<b>Figura 51:</b> Curva de crescimento com camptotecina .....	98
<b>Figura 52:</b> Curva de crescimento após irradiação com luz UV .....	99
<b>Figura 53:</b> Quantificação do dano de DNA após o tratamento com MMS .....	101

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Número de acesso das sequências dos genes ATM e ATR .....	41
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados neste trabalho .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAD</b>	Domínio de ativação de ATR
<b>AP</b>	Apurínico/Apirimidínico
<b>ATM</b>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR</b>	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
<b>ATRIP</b>	Proteína de Interação com ATR
<b>BER</b>	Reparo por Excisão de Base
<b>BIR</b>	Replicação Induzida por Quebra ( <i>Break-Induced Replication</i> )
<b>BLM</b>	<i>Bloom syndrome protein</i>
<b>BRCA1</b>	<i>Breast Cancer 1</i>
<b>BRCA2</b>	<i>Breast Cancer 2</i>
<b>BRCT</b>	Domínio BRCA1 C-terminal
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>BZ</b>	Benzonidazol
<b>Cdc25</b>	Proteína de controle da divisão celular 25
<b>CDC45</b>	Proteína de controle da divisão celular 45
<b>CDC6</b>	Proteína de controle da divisão celular 6
<b>CDK</b>	Cinase dependente de ciclina
<b>cDNA</b>	DNA Complementar
<b>CDT1</b>	<i>Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1</i>
<b>CEN2</b>	Centrin 2
<b>Chk1</b>	Cinase de <i>Checkpoint 1</i>
<b>Chk2</b>	Cinase de <i>Checkpoint 2</i>
<b>Cis</b>	Cisplatina
<b>CMG</b>	Complexo formado pelas proteínas CDC45, MCM2-7 e GINS
<b>CPD</b>	Dímero de Ciclobutano Pirimidina
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>CSA</b>	<i>Cockayne Syndrome group A</i>
<b>CSB</b>	<i>Cockayne Syndrome group B</i>
<b>CtIP</b>	Proteína de interação a CtBP

<b>DDK</b>	Cinase dependente de Dbf4
<b>DDR</b>	Resposta ao dano de DNA ( <i>DNA damage response</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNA2</b>	<i>DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2</i>
<b>DNA-PKc</b>	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo
<b>DSB</b>	Quebra de Fita Dupla no DNA
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DTU</b>	Unidade Discreta de Tipagem
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ERCC1</b>	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
<b>ETAA1</b>	<i>Ewing tumor associated antigen 1</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Assisted Cell Sorting</i>
<b>FMRP</b>	<i>Fragile-X mental retardation protein</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>GG-NER</b>	Reparo Global do Genoma
<b>HR</b>	Recombinação Homóloga
<b>HU</b>	Hidroxiuréia
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria Bertani
<b>LIT</b>	Meio de Cultura <i>Liver Infusion Tryptose</i>
<b>MCM2-7</b>	<i>Mini Chromosome Maintenance protein complex subunits 2-7</i>
<b>MDC1</b>	Proteína mediadora do <i>checkpoint</i> de dano de DNA 1
<b>MLH/PMS</b>	Homólogos de MutL
<b>MMR</b>	Reparo por Mau Pareamento
<b>MMS</b>	Metil Metano Sulfonato
<b>MRN</b>	Complexo Mre11-Rad50-Nbs1
<b>MSH</b>	Homólogo de MutS
<b>NER</b>	Reparo por Excisão de Nucleotídeo
<b>NFX</b>	Nifurtimox
<b>NHEJ</b>	Junção das Extremidades Não Homólogas
<b>OD</b>	Densidade Óptica
<b>ORC</b>	Complexo de reconhecimento da origem
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>

<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PCNA</b>	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PIKK</b>	Cinase relacionada a cinase 3- fosfatidilinositol
<b>PVDF</b>	Membrana de fluoreto de polivinilideno
<b>RBP</b>	Proteína ligante de mRNA
<b>RFC</b>	Fator de Replicação C
<b>RHINO</b>	<i>Rad9-Rad1-Hus1-interacting nuclear orphan</i>
<b>RMI1</b>	<i>RecQ-mediated genome instability protein 1</i>
<b>RMI2</b>	<i>RecQ-mediated genome instability protein 2</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>rNTP</b>	Ribonucleotídeos
<b>RPA</b>	Proteína de Replicação A
<b>RT-qPCR</b>	PCR Quantitativo em Tempo Real
<b>SDS</b>	Docecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>ssDNA</b>	DNA de Fita Simples
<b>TAE</b>	Tampão Tris Acetato EDTA
<b>TBST</b>	Tampão Tris Salino com Tween 20
<b>TC-NER</b>	Reparo Acoplado a Transcrição
<b>TDRD3</b>	<i>Tudor domain-containing protein 3</i>
<b>TLS</b>	Síntese translesão
<b>TopBP1</b>	Proteína de Ligação a TopoisomeraseII 1
<b>UTR</b>	Região Não Traduzida
<b>UV</b>	Luz Ultravioleta
<b>WT</b>	Tipo selvagem ( <i>Wild Type</i> )
<b>XPC</b>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group C</i>
<b>XPF</b>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F</i>
<b>XPG</b>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group G</i>
<b>9-1-1</b>	Complexo Rad9-Rad1-Hus1
<b>6-4 PP</b>	Fotoprodutos 6-4

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

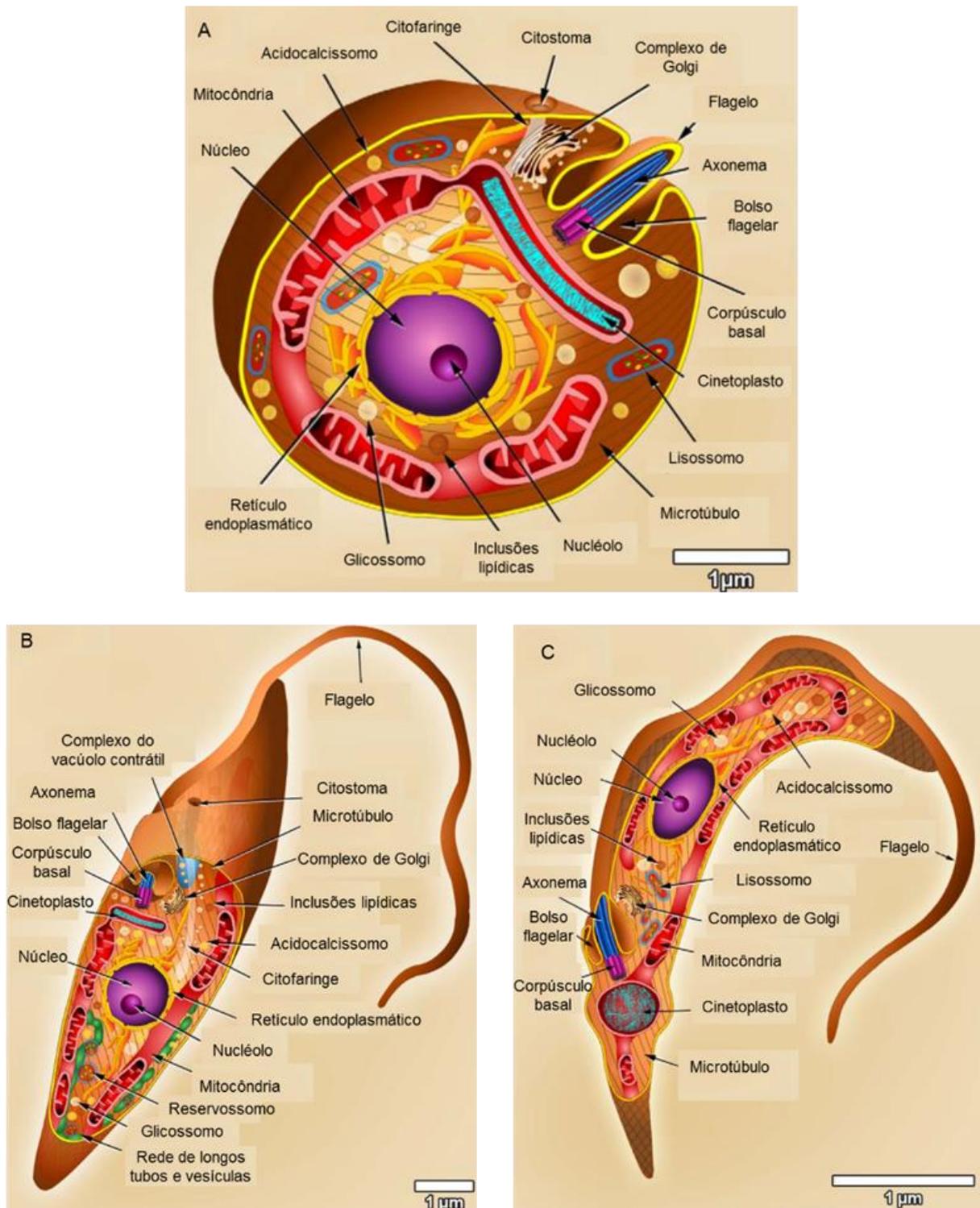
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo parasito flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é endêmica de 21 países da América Latina, incluindo o Brasil, mas tem se espalhado para outras regiões devido ao fluxo migratório. Cerca de 6 milhões de pessoas em todo mundo estão acometidas por essa enfermidade (WHO, 2018).

Uma campanha contra a malária, em 1907, levou o médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas ao município de Lassance, no interior de Minas Gerais. Os moradores da cidade mostraram ao médico um inseto hematófago, conhecido localmente como barbeiro, comum nas moradias da região. Estudando a biologia deste inseto, Chagas identificou em seu intestino posterior um protozoário flagelado anteriormente desconhecido, o qual nomeou de *Trypanosoma cruzi*. Para determinar se este novo parasito poderia infectar hospedeiros vertebrados, Chagas examinou o sangue periférico de animais domésticos, onde também observou a presença do parasito flagelado (revisado em Lewinsohn, 2003). Em abril de 1909, Carlos Chagas foi chamado para examinar Berenice, uma menina de quase 2 anos de idade, febril e com sinais de infecção aguda. Ao analisar o sangue da criança, o médico encontrou pela primeira vez *T. cruzi* em humanos (Chagas, 1909). Dessa forma, Carlos Chagas descobriu um novo parasito, seu vetor e uma nova doença humana. Nos anos seguintes, ele definiu o ciclo de vida do *T. cruzi*, as fases da doença e a sua patogenicidade (revisado em Coura e Borges-Pereira, 2010).

Os principais vetores da doença de Chagas (*Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus*

*megistus*) estão amplamente distribuídos na América Latina, habitando tanto áreas florestais quanto secas (Rassi Jr *et al*, 2012; Pérez-Molina e Molina, 2018). Assim, a transmissão vetorial, que ocorre pelo contato com as fezes contaminadas durante o repasto sanguíneo dos insetos vetores, é a principal forma de infecção com *T. cruzi* nas regiões endêmicas da doença. Além da via vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida de mãe para filho (transmissão congênita), por transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos infectados, pela ingestão de alimentos contaminados (transmissão oral) e por acidentes laboratoriais (Altclas *et al*, 2010).

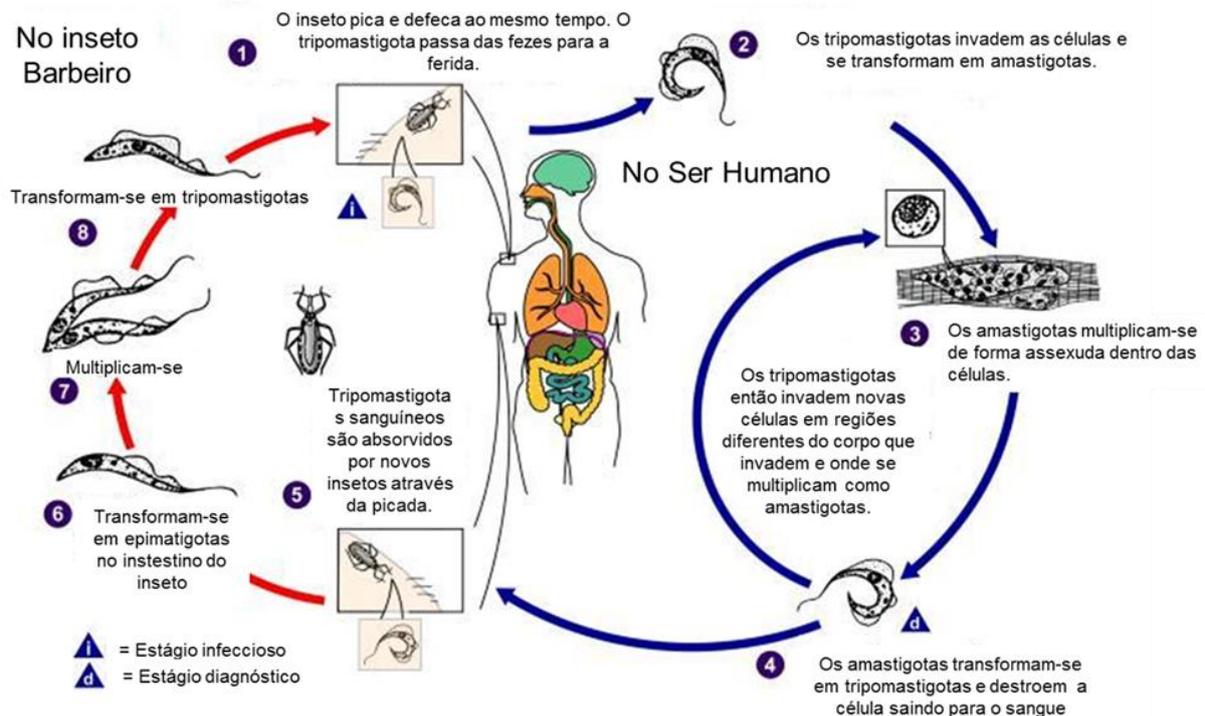
O protozoário *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, que inclui os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Uma característica marcante dos organismos desta família é a alteração da morfologia celular durante os estágios do ciclo de vida (Docampo *et al*, 2005). Em *T. cruzi* existem quatro formas de desenvolvimento: epimastigota, amastigota, tripomastigota metacíclica e tripomastigota sanguínea (Figura 1). A forma replicativa epimastigota, alongada e com flagelo visível, está presente no intestino médio do hospedeiro invertebrado e não é infectante. Outra forma replicativa e não infectante é a amastigota, que é redonda, sem flagelo visível e está presente no interior das células do hospedeiro vertebrado. A forma infectante tripomastigota metacíclica não é capaz de se dividir e é encontrada na porção final do intestino do inseto. Já a forma tripomastigota sanguínea, com flagelo evidente e membrana ondulante, representa a forma infectiva e não replicativa encontrada em mamíferos (Durante *et al*, 2015). Apesar de possuir várias organelas típicas dos eucariotos, os tripanossomatídeos apresentam algumas características celulares específicas deste grupo, como o glicossomo e o cinetoplasto. O glicossomo é um peroxissomo especializado que, além das enzimas de proteção contra espécies reativas de oxigênio, contém várias enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose. O cinetoplasto,



**Figura 1:** Representação esquemática das alterações morfológicas do *Trypanosoma cruzi* ao longo do seu ciclo de vida. A) Forma replicativa e não infectiva amastigota presente no hospedeiro vertebrado B) Forma replicativa e não infectiva epimastigota presente no inseto vetor C) Forma infectiva e não replicativa tripomastigota. Figura adaptada de Teixeira *et al*, 2012.

contido dentro da mitocôndria única dos tripanossomatídeos, é uma estrutura adjacente ao corpo basal do flagelo que contém cerca de 5 a 20% do DNA celular total. O DNA do cinetoplasto, chamado de kDNA, é formado por uma rede de milhares de minicírculos concatenados, que variam em tamanho de 1 a 2,5 kb, e de algumas dezenas de maxicírculos, que variam de 20 a 40 kb. De maneira semelhante ao DNA mitocondrial de outros eucariotos, o kDNA do maxicírculo codifica RNAs ribossomais e algumas proteínas mitocondriais envolvidas no complexo respiratório. Já o DNA do minicírculo é responsável por codificar pequenos RNAs-guia que editam os transcritos do maxicírculo, inserindo ou deletando uridilato em sua sequência (Docampo *et al*, 2005; Maslov *et al*, 2018).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é considerado complexo, pois diferentes formas morfológicas com funções biológicas distintas se alternam entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero (Figura 2). Um triatomíneo infectado contém *T. cruzi* tripomastigota metacíclico na porção final de seu intestino. Enquanto se alimenta de sangue humano (ciclo doméstico) ou de outros animais (ciclo silvestre) o inseto defeca, liberando os parasitos, que penetram no local da picada ou em mucosa íntegra. No ponto de entrada, os parasitos tripomastigotas metacíclicos infectam principalmente macrófagos e células epiteliais. Outros alvos do *T. cruzi* são fibras musculares cardíacas e lisas. Dentro das células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que se dividem várias vezes por fissão binária no citoplasma celular, em seguida se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula infectada. Os parasitos tripomastigotas liberados podem infectar células vizinhas ou ir para a corrente sanguínea e infectar outros tecidos do corpo. Quando um triatomíneo se alimenta de sangue novamente, ingere os parasitos tripomastigotas sanguíneos. No intestino médio, estes parasitos se diferenciam



**Figura 2:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Esquema mostrando as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro deposita as fezes na pele do homem que se infecta com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após invadir as 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 por meio de uma nova picada. No triatomíneo, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigotas. Figura adaptada de CDC – Center for Disease Control and Prevention.

em epimastigotas, que se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo (Chatelain, 2014; Vanrell *et al*, 2017).

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas possui duas fases em humanos, a aguda e a crônica. A fase aguda inicia-se após a infecção e prolonga-se por dois a quatro meses. É possível observar uma intensa reação inflamatória no ponto de entrada do parasito, originando o chagoma de infecção ou o sinal de Romana. Contudo, a maioria dos pacientes apresentam sintomas leves, muito semelhantes aos de viroses comuns, como febre, mal-estar e linfadenopatia, o que dificulta a identificação dos indivíduos

infectados. A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por alta parasitemia, o que permite o seu diagnóstico por métodos diretos, como a microscopia do sangue, ou parasitológicos, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Malik *et al*, 2015; Pérez-Molina *et al*, 2015). Nesta fase, há uma intensa resposta inflamatória com ativação da resposta imune inata (células *natural killer* e macrófagos) por citocinas pró-inflamatórias Th1, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interferon  $\gamma$ , e produção de anticorpos contra o *T. cruzi* (Pérez-Molina e Molina, 2018). Os tratamentos atualmente disponíveis são efetivos apenas durante esta fase da doença. Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença de Chagas. Em muitos pacientes infectados não existem sinais físicos ou evidências clínicas de lesão a qualquer órgão, o que constitui a fase crônica indeterminada. Estes pacientes podem permanecer assintomáticos durante toda a vida, com taxas de sobrevivência semelhantes às de indivíduos não infectados (Malik *et al*, 2015). Depois de 20 a 30 anos sem sintomas, cerca de 40% dos pacientes desenvolvem a forma crônica sintomática, caracterizada pelo comprometimento de alguns órgãos, principalmente o coração (forma cardíaca) e o sistema digestivo (forma digestiva). Esporadicamente, ambos os sistemas podem ser afetados (forma mista), assim como o sistema nervoso (forma neurológica). Durante a fase crônica da doença de Chagas a parasitemia diminui e é possível detectar a presença de anticorpos IgG contra diversos antígenos de *T. cruzi* por métodos sorológicos, como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (Pérez-Molina *et al*, 2015).

Atualmente, existem duas drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol (BZ) e o nifurtimox (NFX). Como mencionado acima, a administração destes medicamentos é eficiente apenas durante a fase aguda da doença. Devido aos efeitos colaterais causados por ambas as drogas, em muitos casos o tratamento precisa ser interrompido. Por ter uma melhor penetração no tecido, tolerabilidade, perfil

de segurança e eficácia, o BZ é mais amplamente utilizado no tratamento (Pérez-Molina *et al*, 2015). Um estudo recente mostrou, pela primeira vez, a ocorrência de dormência em *T. cruzi* após infecção em células humanas e em camundongos. Ao analisar as células infectadas, e não tratadas com compostos tripanocidas, foi observado que alguns parasitos amastigotas espontaneamente pararam de se multiplicar. Contudo, tais parasitos são capazes de retomar a replicação, dias ou semanas após entrar em dormência, e se transformar em tripomastigotas, os quais podem infectar novas células hospedeiras. O tratamento com BZ por até 30 dias matou os amastigotas com replicação ativa, ao passo que os amastigotas transientemente dormentes sobreviveram e foram capazes de restabelecer infecções após o término do tratamento. Os autores do trabalho sugerem que a dormência do *T. cruzi* após a infecção é a principal causa da ineficiência do BZ e NFX para tratar a fase crônica da doença de Chagas. No entanto, os fatores que controlam este estado transiente de dormência ainda precisam ser elucidados (Sánchez-Valdéz *et al*, 2018).

A diversidade clínica observada na doença de Chagas tem sido associada tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Aspectos genéticos e imunológicos de cada paciente influenciam nos sintomas desenvolvidos. Tem sido demonstrado que polimorfismos em alguns genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro podem alterar tanto a suscetibilidade ao *T. cruzi* quanto a severidade da doença de Chagas. O estado imunológico do paciente também afeta o curso clínico da doença, já que o processo de reconhecimento e internalização do patógeno, bem como a indução da resposta imune, são essenciais para lidar com a infecção causada pelo parasito (Jiménez *et al*, 2018). É sabido que o *T. cruzi* apresenta uma grande diversidade genética e fenotípica intraespecífica. Diferentes linhagens deste parasito apresentam variações no conteúdo do DNA, número e tamanho de cromossomos, constituição antigênica, patogenicidade,

suscetibilidade à droga e tropismo tecidual. Tais características podem influenciar a progressão clínica da doença de Chagas causada pelas diferentes cepas de *T. cruzi* (Zingales, 2018).

O *T. cruzi* foi definido como uma espécie clonal, cuja principal forma de reprodução é a assexuada, por meio de fissão binária. Neste contexto, acreditava-se que novos clones evoluíram devido ao acúmulo de mutações discretas (Zingales, 2018). Contudo, a existência de linhagens naturalmente híbridas e a obtenção de clones híbridos em laboratório tem revelado que mecanismos de troca gênica são frequentes e importantes para a variabilidade intraespecífica deste parasito (Gaunt *et al*, 2003; Alves *et al*, 2018). O termo unidade discreta de tipagem (DTU) foi proposto para descrever conjuntos de unidades populacionais que são geneticamente mais semelhantes entre si do que entre outras populações, e que podem ser identificadas por meio de marcadores moleculares e características biológicas (Zingales *et al*, 2012). De acordo com a nomenclatura mais utilizada atualmente, as diferentes linhagens do *T. cruzi* são divididas em seis DTUs, designadas de TcI a TcVI, e uma sétima DTU é chamada de TcBat. Nesta classificação, as DTUs TcV e TcVI referem-se às cepas híbridas (Marcili *et al*, 2009; Zingales *et al*, 2009).

A linhagem CL Brener é um clone da linhagem CL isolada de um *T. infestans*, que é um vetor estritamente doméstico no Brasil (Brener e Chiari, 1963). O *T. cruzi* CL Brener é classificado como TcVI, que é uma cepa híbrida originada a partir dos ancestrais TcII e TcIII. Por ser uma linhagem bem caracterizada experimentalmente, CL Brener teve seu genoma sequenciado (El-Sayed *et al*, 2005). Entretanto, a sua natureza híbrida e as sequências de DNA repetitivo impediram a montagem completa do genoma de CL Brener. A linhagem Dm28c, classificada como TcI, está associada com o ciclo silvestre e com o ciclo doméstico da doença de Chagas na Amazônia brasileira, na Venezuela, na

Colômbia e na América Central. Este clone também tem sido utilizado como modelo em diversos estudos e teve o seu genoma sequenciado (Grisard *et al*, 2014).

Por terem divergido muito cedo na escala evolutiva, os tripanossomatídeos apresentam diversas funções celulares e moleculares diferentes dos demais eucariotos. Alguns exemplos são a ausência de íntrons, a transcrição policistrônica, o processamento *trans-splicing* do RNA mensageiro, o controle pós-transcricional da expressão gênica e a edição do RNA mitocondrial (Maslov *et al*, 2018). Além disso, têm sido observadas divergências nos mecanismos de manutenção da integridade genômica destes parasitos (Genois *et al*, 2014; da Silva *et al*, 2017). Um melhor entendimento das vias envolvidas no metabolismo de DNA em *T. cruzi* pode trazer uma maior compreensão sobre os mecanismos que contribuem para o sucesso da infecção causada por este protozoário e verificar o seu possível envolvimento com o processo de dormência.

## **1.2. A replicação do DNA e o estresse replicativo**

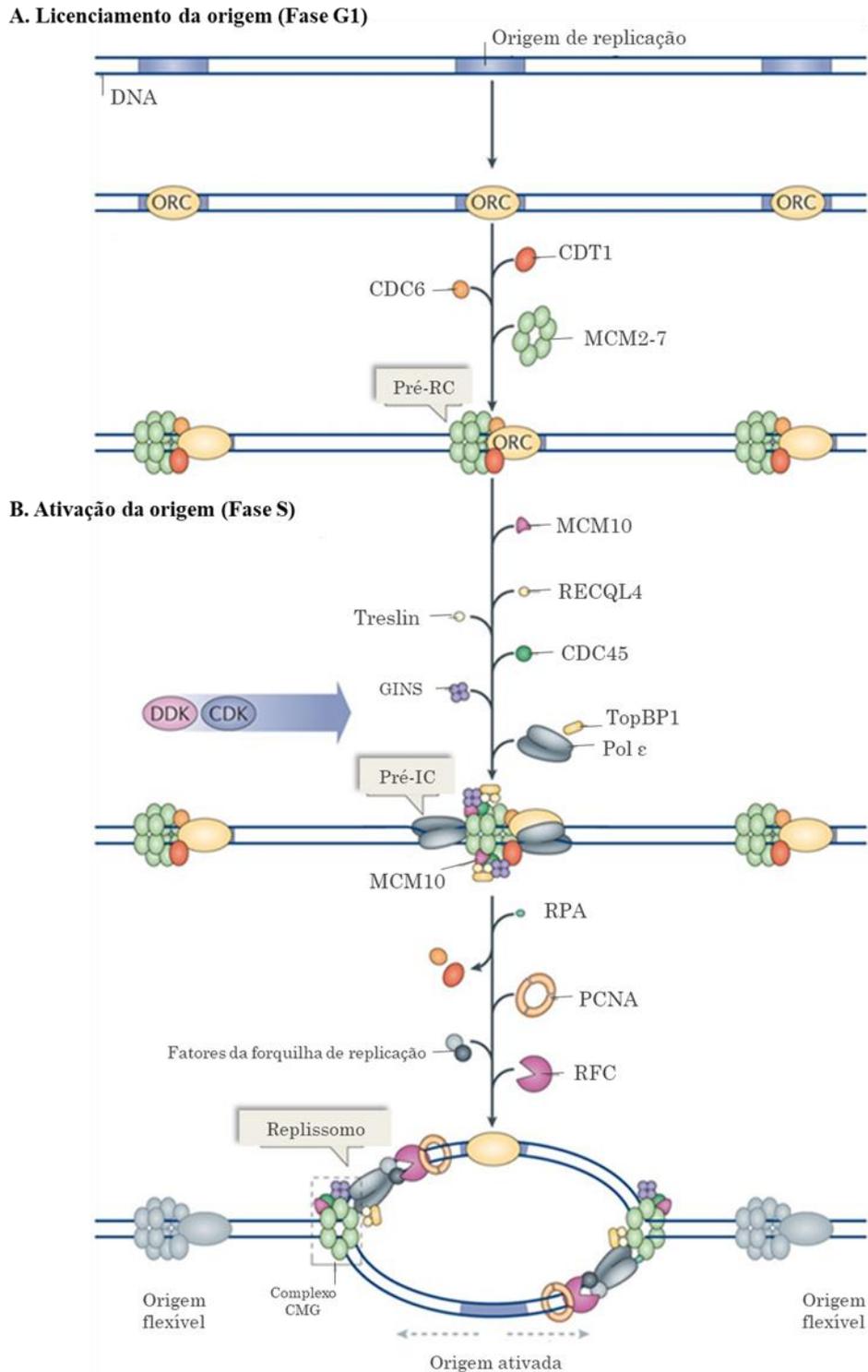
Em todos os tipos celulares a replicação do DNA é um processo fundamental, no qual o material genético precisa ser duplicado fielmente e distribuído entre as células filhas, a fim de manter a estabilidade genômica (Mazouzi *et al*, 2014).

A síntese do DNA inicia-se em regiões definidas do genoma conhecidas como origens de replicação, que funcionam como sítios de ligação para fatores iniciais da duplicação, que, por sua vez, são responsáveis pelo recrutamento da maquinaria de síntese desta molécula (Mazouzi *et al*, 2014).

O início da replicação pode ser dividido em duas etapas, que ocorrem em momentos distintos do ciclo celular. A primeira etapa, chamada de licenciamento da origem, ocorre no início da fase G1 e consiste na montagem do complexo pré-replicativo (pré-RC) nas origens de replicação (Figura 3A). Para tal, o complexo de reconhecimento

da origem (ORC), formado por seis subunidades com atividade ATPase, liga-se às origens de replicação. Em seguida, ocorre a ligação de CDC6 e CDT1, o que permite o recrutamento e ligação de dois hexâmeros da helicase replicativa MCM2-7, que também possui atividade ATPase e é essencial para desenrolar a dupla fita de DNA. A montagem destas proteínas nas origens de replicação leva à formação do complexo pré-RC. A segunda etapa do início da replicação do DNA, que ocorre na fase S do ciclo celular, é a ativação da origem. O complexo pré-RC é convertido no complexo de pré-iniciação (pré-IC), o que culmina na formação de um par de forquilhas de replicação que sintetizam o DNA em direções opostas a partir da origem (Figura 3B). A fosforilação de MCM10, helicase RECQL4, CDC45, Treslin, GINS, TopBP1 e DNA polimerase  $\epsilon$  pelas cinases DDK e CDK promove o carregamento destes fatores de replicação para o complexo pré-RC, desencadeando a montagem do complexo pré-IC. As cinases DDK e CDK também fosforilam o complexo MCM2-7, o que promove a dissociação do hexâmero duplo inativo em dois hexâmeros ativos que irão atuar nas duas forquilhas geradas na origem da replicação. A ativação da helicase induz o recrutamento de outras proteínas, como RFC, PCNA, RPA e outras DNA polimerases, o que converte o complexo pré-IC em duas forquilhas de replicação funcionais, que se movem em direções opostas a partir da origem ativada. A helicase funcional das forquilhas é o complexo CMG, formado por CDC45, MCM2-7 e GINS. O conjunto total de proteínas que se deslocam com cada forquilha de replicação é chamado de replissomo (Fragkos *et al*, 2015).

As primeiras tentativas de definir as proteínas envolvidas no início da replicação dos tripanossomatídeos identificou apenas um fator com homologia a ORC1 e a CDC6 que foi, portanto, chamado de ORC1/CDC6. Estudos posteriores, realizados em *Trypanosoma brucei*, mostraram a presença de uma ORC composta por quatro subunidades (ORC1/CDC6, ORC4, Tb3120 e Tb7980) que divergem das seis subunida-



**Figura 3:** Licenciamento e ativação da origem de replicação. A) O licenciamento das origens de replicação ocorre no início da fase G1 do ciclo celular, com a ligação de fatores iniciais que formam o complexo pré-replicativo (pré-RC). B) A ativação das origens de replicação ocorre durante a fase S e consiste na conversão do complexo pré-RC no complexo de pré-iniciação (pré-IC). A ligação de fatores recrutados pela helicase ativa leva a formação de um par de forquilhas de replicação que sintetizam o DNA em direções opostas a partir da origem. Figura adaptada de Fragkos *et al*, 2015.

des conservadas da ORC de eucariotos modelos. Não foi identificado ortólogo claro de CDT1 nestes protozoários, portanto, os mecanismos pelos quais o complexo MCM2-7 dos tripanossomatídeos é carregado para a origem de replicação permanecem indefinidos. Um ortólogo de ORC1, chamado de ORC1B, é expresso durante as fases S e G2 do ciclo celular e é capaz de interagir com ORC1/CDC6 em *T. brucei*, sugerindo diferenças na regulação da replicação em tripanossomatídeos. A conservação do complexo CMG e dos demais componentes do replissomo dos tripanossomatídeos sugere que as etapas posteriores à formação do complexo pré-RC ocorram de maneira semelhante aos demais eucariotos (da Silva *et al*, 2017).

A maioria das bactérias e arqueas possuem uma única origem de replicação, que apresenta uma sequência de nucleotídeos conservada e é ativada apenas uma vez em cada ciclo de duplicação do DNA. O genoma linear dos eucariotos é replicado a partir de múltiplas origens, distribuídas ao longo dos cromossomos. Até o momento não foi possível identificar uma sequência consenso e os fatores que definem as origens para a maioria dos eucariotos ainda não são completamente entendidos (Fragkos *et al*, 2015). Não existe concordância sobre o número e o posicionamento das origens de replicação presentes nos tripanossomatídeos (da Silva *et al*, 2017).

Para garantir uma replicação completa, acurada e eficiente do DNA, as células eucarióticas regulam a ativação das origens de replicação. Dessa forma, todas as possíveis origens do genoma são licenciadas durante a fase G1 do ciclo celular, mas apenas uma parte delas é posteriormente ativada. Assim, as origens podem ser classificadas como constitutiva, flexível ou dormente. As origens constitutivas são sempre ativadas em todas as células de uma população, enquanto as origens flexíveis são ativadas de maneira aparentemente estocástica. Já as origens dormentes não são ativadas durante um ciclo celular normal. A ativação destas origens ocorre após o bloqueio de uma forquilha de

replicação vizinha. Além disso, devido a complexa organização dos cromossomos, a transcrição do DNA e a concentração de fatores limitantes para a replicação, a ativação das origens não ocorre de forma simultânea. As origens ativadas no início da fase S são chamadas de origens precoces e as origens ativadas posteriormente são classificadas como tardias (Fragkos *et al*, 2015). Experimentos de localização de origens realizados em *Leishmania* e *T. brucei*, sugerem a presença de origens constitutivas e flexíveis nestes tripanossomatídeos. Contudo, os mecanismos que controlam a ativação das origens não são bem entendidos nestes protozoários (da Silva *et al*, 2017).

O estresse replicativo pode ser definido como uma diminuição ou parada da progressão da forquilha causada por barreiras à replicação do DNA (Zeman e Cimprich, 2014). Diversos fatores podem gerar estresse replicativo, como as lesões de DNA não reparadas, que constituem uma barreira física para a progressão das forquilhas de replicação. A incorporação errônea de rNTPs no lugar de dNTPs também causa a parada das polimerases replicativas, bem como a ausência ou quantidades limitadas de nucleotídeos, componentes da maquinaria de replicação ou histonas. Sequências repetitivas no DNA também podem ser uma fonte de estresse replicativo, pois estas regiões tendem a formar estruturas secundárias, como os *hairpins*, que impedem a passagem da forquilha. A compactação da cromatina afeta a acessibilidade do DNA, o que também pode atrasar o movimento das forquilhas (Mazouzi *et al*, 2014). Outra fonte de estresse replicativo é a transcrição do DNA concomitante com a sua replicação. Uma vez que ambos os processos operam utilizando como molde a fita de DNA, as colisões entre estas duas maquinarias ou mesmo a tensão topológica gerada por estes mecanismos induzem o estresse replicativo. Além disso, durante a síntese de RNA, a perda de componentes do processamento desta molécula pode retardar a taxa de transcrição ou impedir a dissociação do complexo de transcrição do DNA. Isto pode gerar híbridos de

DNA-RNA, chamados de *R-loops*, devido ao pareamento entre o transcrito nascente e o DNA atrás do complexo de transcrição, o que interfere na replicação do DNA. Atualmente, tem sido demonstrado que certas regiões gênicas, chamadas de sítios frágeis, são naturalmente propensas à geração de quebras de fitas duplas (DSB, em inglês *double strand break*) quando replicadas ou transcritas, contribuindo para o estresse replicativo. A superexpressão ou ativação constitutiva de oncogenes é uma fonte emergente de estresse replicativo, pois os oncogenes promovem o aumento da iniciação da replicação, o que pode levar ao esgotamento dos grupos de nucleotídeos e aumento de colisões com complexos de transcrição (Zeman e Cimprich, 2014).

Para manter a estabilidade genômica, as células precisam garantir que todo o conteúdo de DNA seja replicado, com precisão e eficiência, uma vez a cada ciclo celular. Assim, existem mecanismos robustos de resposta ao estresse replicativo, que visam reverter a parada da forquilha de replicação e manter a integridade celular (Saldivar *et al*, 2017).

### **1.3. As vias de sinalização e reparo dos danos de DNA**

O DNA pode sofrer danos causados por agentes endógenos e exógenos. A maioria dos danos endógenos decorre da natureza quimicamente ativa da molécula de DNA. Assim, erros ocorridos durante a replicação, alterações químicas espontâneas nos nucleotídeos e reações com subprodutos do metabolismo celular podem ameaçar a integridade do genoma. Já os danos exógenos são causados por agentes ambientais, físicos e químicos que danificam a molécula, como a luz ultravioleta (UV), a radiação ionizante, agentes alquilantes e intercalantes (Chatterjee e Walker, 2017). As lesões não reparadas no DNA podem causar mutações, bloqueio das maquinarias de replicação e

transcrição, ativação dos *checkpoints* do ciclo celular e morte da célula (Hoeijmakers, 2001).

Para proteger o genoma adequadamente, todos os tipos de alterações estruturais do DNA, causados por lesões ou pelo bloqueio da replicação, precisam ser detectados e corretamente reparados. A resposta ao dano de DNA (DDR, em inglês *DNA damage response*) é uma via de transdução de sinal, presente nos eucariotos, que detecta o dano no DNA e o estresse replicativo. Por meio de uma cascata de sinalização, a DDR coordena a parada do ciclo celular e o recrutamento de enzimas de reparo apropriadas a fim de proteger a célula. Uma vez que o DNA tenha sido reparado e a replicação reiniciada, as células retomam a progressão do ciclo celular. Caso contrário, a DDR sinaliza para a senescência ou apoptose (Harper e Elledge, 2007; Ciccia e Elledge, 2010).

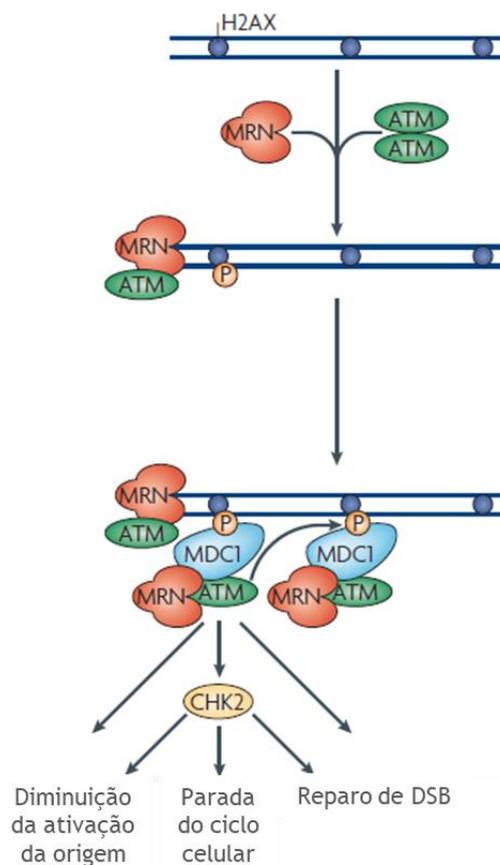
Os componentes da DDR podem ser classificados em sensores, transdutores, mediadores e efetores (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012). Os sensores são as moléculas capazes de detectar a lesão e sinalizá-la para os transdutores que, por sua vez, diversificam e amplificam o sinal da lesão para os mediadores. Estes atuam no recrutamento das proteínas efetoras, as quais são responsáveis pelo controle de processos e vias celulares (Harper e Elledge, 2007). A via de sinalização da DDR é mediada por alterações na atividade proteica via modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, poli-ADP-ribosilação, acetilação e metilação (Ciccia e Elledge, 2010).

As cinases ATM (em inglês *ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (em inglês *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) atuam como os principais transdutores da DDR. Elas fazem parte da família PIKK (cinase relacionada a cinase 3-fosfatidilinositol), que é composta por proteínas de alto peso molecular e com grande similaridade na organização dos domínios proteicos. Ambas são ativadas em resposta a uma lesão no DNA e

fosforilam resíduos de serina e treonina em seus alvos moleculares. Apesar das semelhanças, estes transdutores atuam de forma diferente na DDR: ATM responde à formação de quebras de fita dupla (DSB, em inglês *double strand break*), enquanto ATR é ativada pela presença de DNA de fita simples (ssDNA, em inglês *single strand DNA*). Ainda que possuam funções e substratos específicos, a resposta celular desencadeada por estas cinases é, frequentemente, interligada (Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012).

As DSBs presentes na cromatina são reconhecidas pelo complexo MRN, formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e Nbs1. Este complexo é capaz de ligar-se às regiões de quebra e recrutar ATM, atuando como um sensor para a cinase transdutora da DDR (Figura 4) (Stucki e Jackson, 2006; Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012). ATM existe no núcleo celular na forma de homodímero, não covalente e inativo. Nos sítios de dano, os dímeros de ATM sofrem autofosforilação, o que promove a sua dissociação em monômeros cataliticamente ativos. O monômero de ATM liga-se ao complexo MRN, o que contribui para amplificação da sua ativação (Bakkenist e Kastan, 2003). Uma vez ativa, ATM é capaz de fosforilar vários substratos que estão envolvidos no *checkpoint* do ciclo celular, no reparo de DNA e em diversos processos celulares (Paull, 2015).

Um dos alvos de ATM é a histona H2AX, que é uma variante da histona H2A e está presente em proporções variadas no nucleossomo dos eucariotos. Em mamíferos, a formação de uma DSB promove a rápida fosforilação desta histona no resíduo de serina 139, que passa a ser chamada de  $\gamma$ H2AX, em regiões adjacentes à quebra (Rogakou *et al*, 1998). A  $\gamma$ H2AX é capaz de ligar-se aos domínios BRCT da proteína MDC1, o que permite o recrutamento e ligação de moléculas adicionais do complexo MRN e de ATM para as regiões da cromatina flanqueando a lesão. Assim, a ligação entre  $\gamma$ H2AX e MDC1 amplifica e mantém o sinal de ATM, por mediar a fosforilação de mais moléculas de



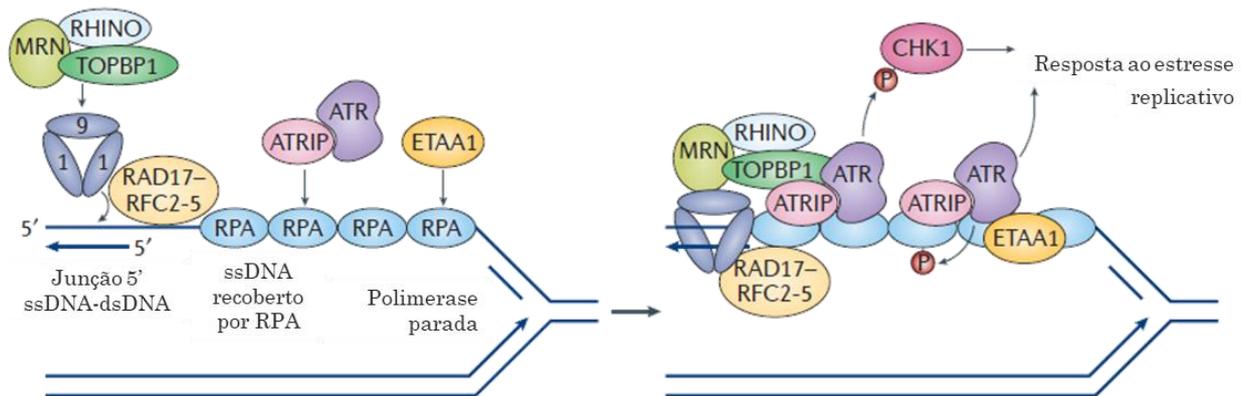
**Figura 4:** Modelo do mecanismo de ativação da cinase ATM. A formação de DSBs acarreta o recrutamento do complexo MRN e a dissociação dos dímeros de ATM por meio de autofosforilação. O monômero de ATM liga-se ao complexo MRN nas regiões de DSBs, o que contribui para a amplificação da sua ativação. ATM ativa é capaz de fosforilar a variante de histona H2AX. A histona  $\gamma$ H2AX liga-se à proteína MDC1, que recruta mais moléculas de ATM e MRN para região de DSBs. A cinase ATM ativa fosforila outros substratos, como a Chk2, promovendo a parada da progressão do ciclo celular, o recrutamento da maquinaria de reparo de quebras duplas e a diminuição da ativação de forquilhas de replicação. Figura adaptada de Cimprich e Cortez, 2008.

H2AX e por proteger a histona fosforilada da ação de fosfatases (Stucki e Jackson, 2006; Paull, 2015). Outros fatores fosforilados pela ATM ativa são a cinase efetora Chk2, capaz de ativar o *checkpoint* do ciclo celular e a proteína BRCA1, que atua no reparo por recombinação homóloga (Cimprich e Cortez, 2008). Em conjunto, estes eventos concentram nas regiões de dano de DNA as proteínas necessárias para diminuir a progressão do ciclo celular e promover o reparo das DSBs. Uma vez que DNA tenha sido

corretamente reparado, a atividade de ATM diminui e os seus alvos fosforilados, incluindo a  $\gamma$ H2AX, rapidamente decaem (Stucki e Jackson, 2006).

Nas células, a principal fonte de ssDNA são as forquilhas de replicação paradas. Isto ocorre devido ao desacoplamento entre as atividades da DNA polimerase e da DNA helicase: apesar da DNA polimerase ter interrompido seu movimento, a helicase replicativa continua desenrolando a dupla hélice à frente da forquilha, expondo uma região de ssDNA. Além disso, em algumas vias de reparo do DNA, o ssDNA é uma estrutura intermediária no processo de reversão do dano, como por exemplo durante a ressecção de DSBs na recombinação homóloga e após a remoção de um pequeno segmento de nucleotídeos pelas enzimas do reparo por excisão de nucleotídeos. Estas regiões de ssDNA são recobertas pela proteína de replicação A (RPA), o que funciona como um sensor para a cinase ATR, estimulando o seu recrutamento para o sítio de dano (Figura 5) (Saldivar *et al*, 2017).

A ATR encontra-se na forma de um complexo com a proteína ATRIP (proteína de interação com ATR), a qual é capaz de interagir e se ligar à RPA. Dessa forma, ATRIP é responsável por carregar a cinase para o local da lesão de DNA (Zou e Elledge, 2003). De uma maneira independente, RPA também interage com o carregador de grampo Rad17-RFC2-5, trazendo-o para o DNA danificado. Este complexo é similar ao carregador RFC responsável pelo carregamento de PCNA durante a replicação do DNA (Zou *et al*, 2003). O carregador Rad17-RFC2-5 recruta e posiciona o complexo heterotrimérico 9-1-1, formado pelas proteínas Rad9, Rad1 e Hus1, na junção 5' ssDNA-dsDNA. Assim como o PCNA, o complexo 9-1-1 tem a forma de um anel e envolve a fita de DNA com a ajuda do seu carregador (Rauen *et al*, 2000; Majka e Burgers, 2003; Ellison e Stillman, 2003). Após o seu posicionamento, o complexo 9-1-1 recruta para o sítio de dano o ativador alostérico TopBP1. A cauda C-terminal de Rad9 fosforilada liga-



**Figura 5:** Modelo do mecanismo de ativação da cinase ATR. Os complexos ATR-ATRIP e 9-1-1 são, independentemente, recrutados para a região de ssDNA recoberto por RPA. O grampo 9-1-1, juntamente com o complexo MRN e RHINO, é responsável por trazer e posicionar o ativador alostérico TopBP1 para o sítio de dano. A aproximação entre ATR e TopBP1, permite a fosforilação e ativação da cinase. ETAA1 liga-se diretamente à RPA e ativa ATR em uma via paralela. Uma vez ativa, ATR fosforila várias moléculas efetoras, entre elas a cinase Chk1. Dessa forma, ATR é capaz de orquestrar diversas ações na célula, como a parada da progressão do ciclo celular, o recrutamento da maquinaria de reparo, a diminuição da ativação de forquilha tardias, a estabilização e reinicialização das forquilha paradas. Figura adaptada de Saldivar *et al*, 2017.

se aos domínios BRCT presentes na porção C-terminal de TopBP1, trazendo-o para a região de dano (Delacroix *et al*, 2007; Mordes *et al*, 2008). Tem sido demonstrado que este recrutamento é parcialmente dependente do complexo MRN e da proteína RHINO. Contudo, os mecanismos pelos quais estas proteínas auxiliam neste processo ainda não foram elucidados (Saldivar *et al*, 2017). Assim, a aproximação entre TopBP1 e ATR-ATRIP permite a interação entre o domínio AAD (em inglês, *ATR-activation domain*) de TopBP1 e a porção C-terminal de ATR, fazendo com que a cinase seja fosforilada e ativada (Delacroix *et al*, 2007; Mordes *et al*, 2008).

Recentemente, um segundo ativador de ATR foi encontrado em vertebrados, a proteína ETAA1, que interage diretamente com RPA após o dano de DNA ou estresse replicativo. Apesar de ser pouco conservada em relação aos outros ativadores de ATR conhecidos em leveduras e mamíferos, a ETAA1 contém um domínio AAD capaz de

promover a ativação de ATR, em uma via paralela e independente de TopBP1 (Bass *et al*, 2016; Haahr *et al*, 2016).

Vários substratos são fosforilados pela ATR ativa a fim de garantir a integridade genômica, destacando-se entre eles a cinase efetora Chk1. Ao ser ativada por ATR, Chk1 fosforila e inativa as fosfatases Cdc25, que regulam as transições do ciclo celular removendo o grupo fosfato inibidor das CDKs. Assim, a ativação de ATR promove o *checkpoint* de replicação e previne a progressão do ciclo celular. Adicionalmente, em resposta ao estresse replicativo, a ATR e seus substratos suprimem a ativação das origens tardias. Tais ações fornecem tempo à célula para reverter as causas do estresse replicativo e garantem a disponibilidade das moléculas necessárias para completar a síntese do DNA. A cinase ATR também é capaz de estabilizar e reiniciar a forquilha parada quando a fonte de estresse é eliminada. Quando a causa do estresse replicativo não pode ser removida, outras vias atuam para promover o fim da duplicação do DNA. A ativação das origens dormentes, coordenada por ATR, pode replicar o DNA entre duas forquilhas que estão paradas. Já a ativação da via de tolerância ao dano permite a troca das DNA polimerases replicativas por polimerases translesão que são capazes de sintetizar o DNA a partir de um molde danificado. Entretanto, se a célula não for capaz de reiniciar a forquilha parada, a forquilha entra em colapso e perde a sua associação com DNA e os demais componentes da maquinaria de replicação. Normalmente, após este evento o DNA é processado por endonucleases, gerando quebras de fita dupla (Muñoz e Méndez, 2016; Saldivar *et al*, 2017).

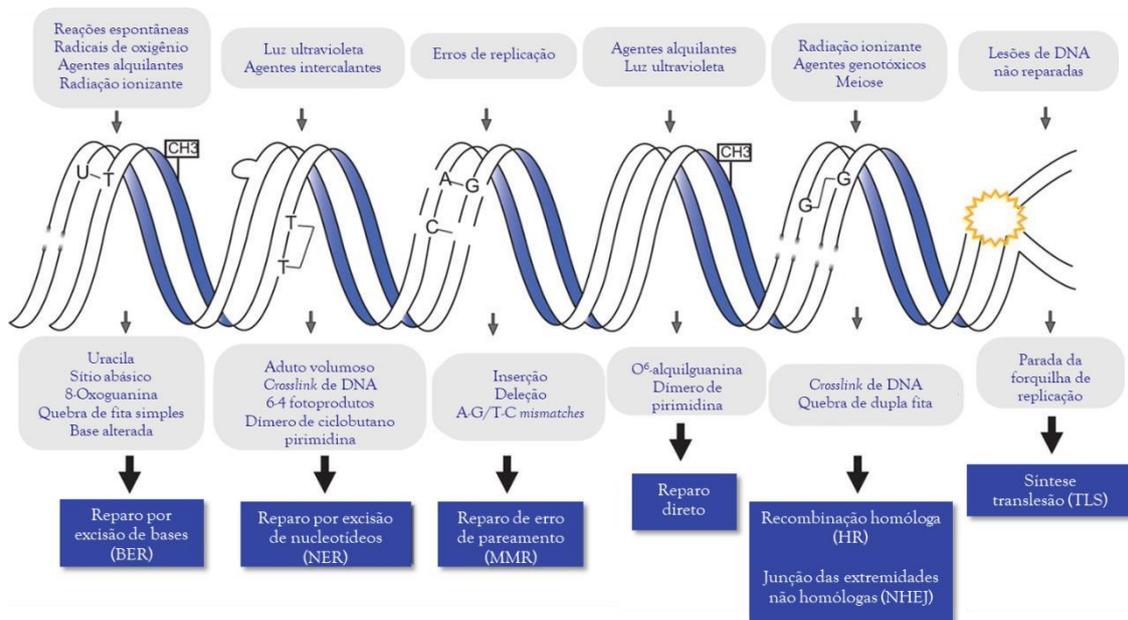
Apesar de as cinases ATM e ATR serem ativadas em resposta a diferentes tipos de lesões no DNA, as suas ações fornecem uma redundância funcional durante a DDR, já que vários substratos são fosforilados por ambas as cinases. Ademais, um tipo de dano de DNA pode ser convertido em outro. As DSBs, que rapidamente promovem a ativação de

ATM, podem ter as suas extremidades ressectadas por nucleases, formando regiões de ssDNA capazes de ativar a ATR. Por outro lado, forquilhas de replicação paradas, que inicialmente levaram à ativação de ATR, podem colapsar, fazendo com que o ssDNA seja processado por nucleases formando DSBs, que fornecem uma plataforma para a ativação de ATM. Esta interligação entre as vias desencadeadas por ATM e ATR permite que as cinases transdutoras da DDR funcionem na ausência uma da outra, o que contribui para manter a estabilidade genômica (Cimprich e Cortez, 2008; Maréchal e Zou, 2013).

Como apresentado acima, os variados tipos de danos aos quais o DNA está exposto iniciam a DDR, o que garante tempo suficiente para que uma das diversas vias de reparo remova o dano em uma maneira dependente do substrato. Ao longo do ciclo celular as vias de reparo direto, reparo por excisão de bases (BER, em inglês *base excision repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, em inglês *nucleotide excision repair*), reparo de erro de pareamento (MMR, em inglês *mismatch repair*), recombinação homóloga (HR, em inglês *homologous recombination*) e junção das extremidades não homólogas (NHEJ, em inglês *nonhomologous end joining*) estão presentes, corrigindo as lesões no DNA e mantendo a estabilidade genômica das células (Figura 6) (Chatterjee e Walker, 2017).

No sistema de reparo direto as lesões causadas pela luz UV ou por agentes alquilantes são revertidas por uma única enzima, que remove adutos covalentes na molécula de DNA sem causar quebras na dupla fita. Um exemplo é a capacidade da fotoliase em reparar, na presença de luz visível, os dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e os fotoprodutos 6-4 (6-4 PP) causados pela luz UV (Spampinato, 2016; Chatterjee e Walker, 2017).

Modificações nas bases nitrogenadas, como desaminação, metilação, hidroxilação ou oxidação, causadas por subprodutos do metabolismo celular ou por agentes exógenos



**Figura 6:** Vias de reparo associadas aos diversos tipos de lesões encontradas no DNA. A molécula de DNA está sujeita a danos provocados tanto por agentes endógenos quanto exógenos. Para reverter estas lesões e manter a integridade da informação genética, as células contam com várias enzimas de reparo especializadas para cada tipo de lesão. Figura adaptada de Genois *et al*, 2014.

são reparadas pelo BER. Nesta via, as lesões são reconhecidas e hidrolisadas pelas DNA-glicosilases, gerando um sítio abásico (sítio AP) que, em seguida, é removido pelas AP-endonucleases. O reparo é finalizado pela ação de DNA polimerases (Pol  $\beta$ , Pol  $\delta$  ou Pol  $\kappa$ ) e DNA ligases, que sintetizam e ligam a fita de DNA (Spampinato, 2016).

A luz UV e agentes intercalantes provocam distorções volumosas na dupla hélice de DNA que interferem no pareamento de bases obstruindo a replicação e a transcrição. O DNA com esse tipo de lesão é reparado pelo NER que, de acordo com o modo de reconhecimento do dano, pode ser subdividido em GG-NER (reparo global do genoma, em inglês *global genome NER*) e TC-NER (reparo acoplado a transcrição, em inglês *transcription-coupled NER*). O GG-NER é iniciado pelo complexo XPC-R23B-CEN2, que analisa todo o genoma em busca de danos. O TC-NER, por meio das proteínas CSA, CSB e XBA2, reconhece lesões presentes em fitas transcritas de genes ativos, sendo

iniciado pela RNA polimerase II parada no sítio de dano. Após o reconhecimento da lesão de DNA, o GG-NER e o TC-NER convergem para uma mesma via, na qual o recrutamento de TFIIH resulta na excisão de nucleotídeos pelas endonucleases ERCC1-XPF e XPG. O DNA é sintetizado pelas DNA polimerases  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\kappa$  e ligado pelas DNA ligases I ou III $\alpha$  (Spampinato, 2016).

O MMR é uma via conservada evolutivamente responsável pela correção de erros no DNA causados durante a replicação pela incorporação errada de nucleotídeos, o que gera mau pareamento entre as bases ou a formação de alças de inserção/deleção. O reconhecimento das lesões é feito pelas proteínas MSH (homóloga de MutS), que recrutam MLH-PMS (homóloga de MutL) em uma maneira dependente de ATP. Após a montagem do complexo de reparo, a fita recém-sintetizada é identificada e sofre excisão pela Exo1. A DNA polimerase  $\delta$  é responsável pela síntese e a DNA ligase I pela ligação da fita reparada (Spampinato, 2016; Chatterjee e Walker, 2017).

As DSBs são reparadas, principalmente, por NHEJ ou HR. Na via NHEJ, que pode ocorrer durante todo o ciclo celular, as duas extremidades quebradas do DNA são diretamente unidas sem o uso de moldes, tornando esta via de reparo propensa a erros. As quebras duplas são reconhecidas e ligadas pelo heterodímero KU70-KU80, que interage com a cinase DNA-PKc. Estas proteínas ligadas à quebra são capazes de recrutar fatores adicionais, responsáveis pelo processamento das extremidades de DNA. Posteriormente, as fitas são ligadas pela DNA ligase IV. A HR ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, quando a cromátide irmã intacta está presente e pode ser usada como molde para troca de informação com a fita danificada. Por ser dependente de homologia na sequência de DNA, o reparo por HR é livre de erros. A extremidade das quebras de DNA são ressectadas pelo complexo MRN, pela nuclease CtIP ou por BLM/DNA2, formando uma região de ssDNA. Com a ajuda de BRCA2, a recombinase Rad51 liga-se ao ssDNA

formando o filamento de nucleoproteína. Rad51 é responsável pela busca de sequências homólogas e invasão da fita, formando uma estrutura chamada de *D-loop*. O reparo é concluído com a extensão e processamento do *D-loop* (Spampinato, 2016).

Além das polimerases replicativas Pol  $\delta$  e Pol  $\epsilon$ , de alta fidelidade, as células também possuem DNA polimerases especializadas capazes de tolerar alguns tipos de danos no DNA. Estas enzimas adicionam nucleotídeos através de moldes de DNA contendo lesões, em um processo chamado de síntese translesão (TLS, em inglês *translesion synthesis*). A TLS é uma via importante para permitir a continuação da replicação do DNA. Entretanto, devido à menor fidelidade das polimerases TLS, nucleotídeos incorretos podem ser incorporados, gerando mutações no DNA (Chatterjee e Walker, 2017).

As vias de reparo de DNA são mecanismos importantes para preservar a informação genética das células. A persistência de danos no DNA gera mutações e pode levar a ativação de vias de morte celular programada, como a apoptose (Hoeijmakers, 2001).

Experimentos em *Leishmania major* sugerem o envolvimento de ATM e ATR na sinalização do dano de DNA, visto que o uso de inibidores específicos para estas cinases, antes do tratamento com peróxido de hidrogênio, reduz de forma significativa a taxa de sobrevivência de parasitos promastigotas (da Silva *et al*, 2018). A indução de RNAi contra ATM e ATR, em formas sanguíneas de *T. brucei*, aumentou a sensibilidade de ambos os parasitos ao MMS (metil metano sulfonato). Contudo, apenas o gene ATR se mostrou essencial para a sobrevivência celular em condições de não estresse (Stortz *et al*, 2017). O sequenciamento e a anotação do genoma de *T. cruzi* revelou a presença de muitos dos genes que codificam para as enzimas envolvidas na DDR e nas principais vias de reparo de DNA. Até o momento, poucos fatores da NHEJ foram encontrados, o que

sugere a ausência deste tipo de reparo de DSBs neste eucarioto. Durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* está exposto a espécies reativas de oxigênio, que podem induzir danos no DNA. Além disso, a organização genômica e a transcrição policistrônica deste parasito podem favorecer colisões entre as maquinarias de transcrição e replicação, o que causa estresse replicativo. Dessa forma, os mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA desenvolvidos pelos tripanossomatídeos são importantes para a manutenção da integridade genômica, bem como para o sucesso da infecção (Genois *et al*, 2014; da Silva *et al*, 2017).

Dados do nosso grupo de pesquisa têm sugerido que o sistema de reparo do *T. cruzi* é muito eficiente em lidar com DSBs (Regis-da-Silva *et al*, 2006; Cerqueira *et al*, 2017; Passos-Silva *et al*, 2018). Nos últimos anos, alguns estudos têm sido conduzidos no sentido de entender a maneira como este parasito responde ao estresse replicativo (Zuma *et al*, 2014; Garcia *et al*, 2016; Pavani *et al*, 2016). Apesar da importância de ATM e ATR para a sinalização e reparo do dano de DNA em outros organismos, ainda não está disponível nenhum trabalho a respeito da função destas cinases em *T. cruzi*.

#### **1.4. Controle do estado topológico do DNA da célula: as DNA topoisomerasas**

Para ter acesso à informação genética armazenada no DNA, as duas fitas complementares precisam ser separadas durante a replicação, a transcrição e o reparo, o que altera a topologia da molécula de DNA. Além disso, os cromossomos replicados precisam ser corretamente separados antes da divisão celular e cada cópia deve ser compactada no interior do núcleo da célula (Champoux, 2001; Pommier *et al*, 2010). As DNA topoisomerasas são enzimas capazes de controlar o superenovelamento do DNA, sendo encontradas nos eucariotos, procariotos, arqueas e em alguns vírus (Capranico *et al*, 2017). Assim, as DNA topoisomerasas são essenciais para resolver os problemas

topológicos intrínsecos da estrutura em dupla hélice do DNA, bem como os gerados durante o seu metabolismo e a expressão gênica (Cuya *et al*, 2017).

As topoisomerases desempenham as suas funções permitindo que duplas hélices ou fitas de DNA passem uma através da outra via uma reação de transesterificação, na qual o grupo fosfato da cadeia de DNA sofre um ataque nucleofílico do grupo hidroxila de um resíduo de tirosina da enzima. Isto cliva o esqueleto fosfodiéster do DNA e liga covalentemente uma das extremidades formadas à topoisomerase, permitindo a passagem da outra fita ou da outra dupla hélice de DNA. Em seguida, a fita clivada é religada por outra reação de transesterificação, que é basicamente o inverso da primeira (Wang, 2002). A reação catalisada pelas topoisomerases não modifica a sequência de DNA e não é dependente de reconhecimento de sequência, ou seja, estas enzimas atuam em qualquer região do DNA que apresente problemas torcionais (Pommier *et al*, 2010; Pommier *et al*, 2016).

Apesar de realizarem a mesma reação química geral, as topoisomerases apresentam algumas diferenças estruturais entre si que acarretam diferenças nos mecanismos de catálise, gerando uma certa especificidade de substratos e funções biológicas (Capranico *et al*, 2017). Dessa forma, as DNA topoisomerases podem ser classificadas em tipo I e tipo II. As enzimas do tipo I são capazes de clivar fitas simples de DNA, enquanto as topoisomerases do tipo II formam dímeros para clivar fitas duplas de DNA, em uma maneira dependente da quebra do ATP. Cada tipo de topoisomerase pode ser subdividido em duas subfamílias: IA, IB, IIA e IIB (Wang, 2002). Tem sido mostrado que cada subfamília desempenha papéis específicos dentro da célula, permitindo uma coordenação precisa do estado topológico do DNA no decorrer do ciclo celular (Pommier *et al*, 2016).

As topoisomerasas da subfamília IA são capazes de relaxar apenas supertorções negativas na molécula de DNA, ou seja, atuam promovendo o aumento do número de ligação (Lk) do DNA. Durante a catálise, o grupo hidroxila da tirosina destas enzimas liga-se covalentemente a extremidade 5' da quebra, formando um intermediário chamado de 5'-P-Y (Pommier *et al*, 2010). Esta ligação transiente entre a topoisomerase e a fita de DNA quebrada é importante para prevenir danos no genoma. Após a clivagem, a enzima altera a topologia do DNA passando a outra fita através da fita clivada. As enzimas desta subfamília necessitam do  $Mg^{+2}$  como cofator para a catálise (Capranico *et al*, 2017). Devido ao seu mecanismo de ação, as topoisomerasas IA podem resolver as supertorções negativas que ocorrem durante a transcrição e a elongação da replicação do DNA. Além disso, em razão da sua capacidade de catalisar a decatenação de fita simples, atuam no término da replicação, na segregação dos cromossomos e na resolução de intermediários que são encontrados no reparo por recombinação (Pommier *et al*, 2016). Isto indica a função destas enzimas na manutenção da estabilidade genômica e, talvez, explique a observação de que, em todos os organismos estudados, pelo menos uma topoisomerase desta família está presente (Ahmad *et al*, 2017).

Nas bactérias foram identificados dois genes que codificam topoisomerasas da subfamília IA. As proteínas procarióticas são chamadas de topoisomerase 1 e topoisomerase 3. Os eucariotos possuem apenas a topoisomerase 3, ao passo que nos eucariotos superiores existem duas isoformas desta enzima, chamadas de topoisomerase 3 $\alpha$  e topoisomerase 3 $\beta$  (Capranico *et al*, 2017).

Algumas células eucarióticas expressam duas isoformas da DNA topoisomerase 3 $\alpha$ , uma no núcleo e outra na mitocôndria. Ambas as enzimas são codificadas no núcleo pelo mesmo gene, sendo que a versão mitocondrial é produzida por um sítio alternativo de iniciação da tradução, anterior ao códon que inicia a tradução da enzima nuclear (Wang

*et al.*, 2002). Estudos com a mosca *Drosophila melanogaster* sugerem que a topoisomerase 3 $\alpha$  presente na mitocôndria seja responsável pela manutenção da integridade do DNA mitocondrial (Tsai *et al.*, 2016). Recentemente, foi descrito que a topoisomerase 3 $\alpha$  presente nas mitocôndrias humanas é essencial para a replicação e segregação do DNA desta organela (Nicholls *et al.*, 2018). Em eucariotos, a versão nuclear da topoisomerase 3 $\alpha$  pode atuar, assim como as topoisomerasas 1 e 2 $\alpha$ , na resolução do superenovelamento negativo gerado atrás da forquilha de replicação durante a síntese do DNA. Quando a replicação do DNA é concluída, tanto a topoisomerase 2 $\alpha$  quanto a 3 $\alpha$  podem remover os concatâmeros (Pommier *et al.*, 2016).

Uma das etapas finais do reparo de DSBs, pela via de recombinação homóloga, é a dissipação das junções de Holliday duplas, o que permite a separação entre os dois cromossomos. Em humanos, a DNA topoisomerase 3 $\alpha$  forma um complexo com BLM, uma helicase da família RecQ, e com o fator RMI1/2, que contribui para a dissolução destas estruturas, gerando produtos sem sobrecruzamento (*noncrossover products*) (Yang *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que é necessária a interação física entre estas três proteínas para promover a dissolução das junções de Holliday duplas. A helicase BLM é responsável pela migração convergente das junções, fazendo com que uma vá ao encontro da outra. A ação catalítica da helicase fornece um substrato de ssDNA, o hemicatenano, que pode ser processado pela topoisomerase 3 $\alpha$ . A ligação de RMI1/2 modula a atividade de decatenação da topoisomerase, tornando a dissolução das junções de Holliday mais eficiente (Bizard e Hickson, 2014; Bocquet *et al.*, 2014). A interação física e funcional entre topoisomerasas da família IA e helicases da família RecQ já foi observada em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e em outras células de vertebrados (Gangloff *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1999; Harmon *et al.*, 1999;

Bennett *et al*, 2000; Seki *et al*, 2006). Dessa forma, a DNA topoisomerase 3 $\alpha$  contribui para a estabilidade genômica impedindo o rearranjo cromossômico e permitindo a conclusão da recombinação homóloga (Capranico *et al*, 2017).

Durante a transcrição, é normal que fragmentos do transcrito recém-sintetizado permaneçam ligados ao DNA molde. O superenovelamento negativo na fita de DNA, atrás da RNA polimerase, favorece a formação destes híbridos de DNA-RNA, que são chamados de *R-loops*. Como mencionado anteriormente, o acúmulo de *R-loops* está associado com a instabilidade genômica. Nas células, a topoisomerase 3 $\beta$  forma um complexo com o fator TDRD3 (em inglês, *Tudor domain-containing protein 3*), o qual é responsável pelo recrutamento da topoisomerase até a cromatina. No núcleo, a topoisomerase 3 $\beta$  é capaz de relaxar o DNA atrás da maquinaria de transcrição e, assim, suprimir a formação dos *R-loops* em genes transcritionalmente ativos, permitindo a continuação da transcrição e protegendo a integridade do DNA (Yang *et al*, 2014).

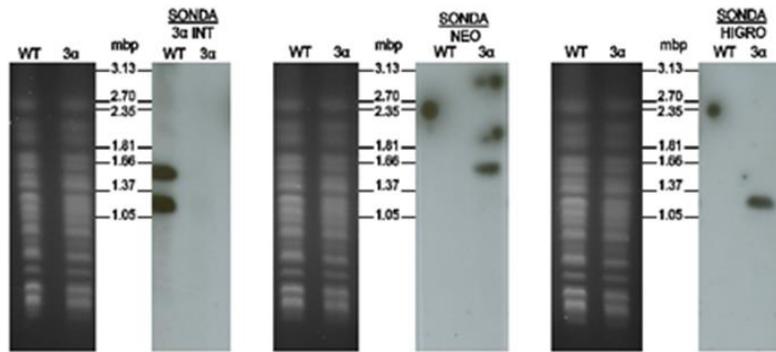
Estudos recentes, em células humanas, mostraram que a topoisomerase 3 $\beta$  também é capaz de utilizar como substrato a molécula de RNA, ou seja, esta enzima atua como uma RNA topoisomerase (Stoll *et al*, 2013; Xu *et al*, 2013). O complexo topoisomerase 3 $\beta$  - TDRD3 interage com FMRP (em inglês, *fragile-X mental retardation protein*), uma proteína ligante de mRNA (RBP, em inglês *mRNA-binding protein*) que modula a tradução de vários mRNAs necessários para o neurodesenvolvimento e é silenciada na síndrome do X-frágil. Neste complexo ternário, a topoisomerase 3 $\beta$  é capaz de se associar a polirribossomos, regulando o processamento e a tradução dos mRNA alvos de FMRP (Stoll *et al*, 2013; Xu *et al*, 2013; Siaw *et al*, 2016). A análise estrutural das topoisomerases IA, de humanos, não indicou a presença de algum elemento responsável pela diferença de substratos utilizados pelas topoisomerases 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  (Goto-Itô *et al*, 2017). No entanto, a topoisomerase 3 $\beta$  possui em sua porção C-terminal, um

domínio conservado de ligação ao RNA chamado RGG, que está ausente na topoisomerase 3 $\alpha$ . A deleção ou mutações no domínio RGG reduz a atividade catalítica da topoisomerase 3 $\beta$  (Ahmad *et al*, 2016b; Huang *et al*, 2018). A atividade de RNA topoisomerase também tem sido observada em topoisomerases de bactérias, leveduras e demais eucariotos, o que sugere a relevância desta enzima durante o desenvolvimento celular (Ahmad *et al*, 2016a). O uso do DNA ou do RNA como substratos faz com que a topoisomerase 3 $\beta$  atue solucionando problemas topológicos que surgem durante a transcrição e a tradução do mRNA (Ahmad *et al*, 2017).

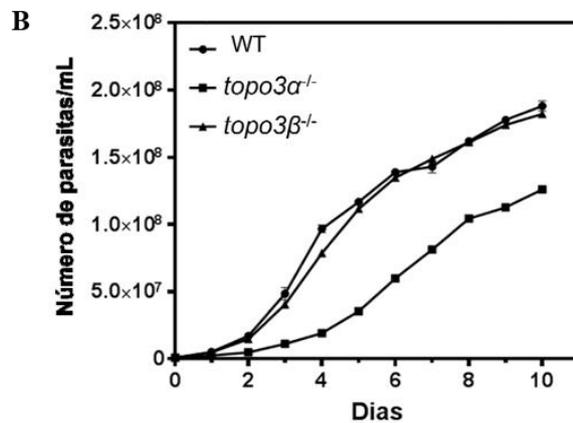
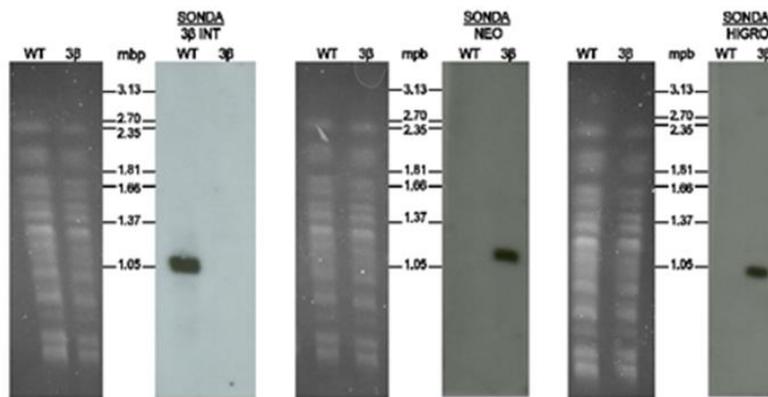
A análise da sequência disponível no banco de dados tem mostrado que os tripanossomatídeos apresentam um conjunto completo dos diversos tipos de DNA topoisomerases em seu genoma. Nestes parasitos, as enzimas da subfamília IA são denominadas de topoisomerase IA, topoisomerase 3 $\alpha$  e topoisomerase 3 $\beta$ . As topoisomerases desta subfamília são filogeneticamente bem conservadas e estão compartimentalizadas no núcleo e na mitocôndria dos tripanossomatídeos (Balaña-Fouce *et al*, 2014). Foi demonstrado que a topoisomerase mitocondrial de *T. brucei*, chamada de topoisomerase IA, é responsável pela correta replicação e segregação dos minicírculos que constituem o kDNA (Scocca e Shapiro, 2008). Já a topoisomerase 3 $\alpha$ , presente neste parasito, é importante para a variação antigênica mediada por recombinação homóloga no *T. brucei* (Kim e Cross, 2010). O estudo da topoisomerase 3 $\beta$  de *Leishmania donovani* mostrou que esta enzima se localiza tanto no núcleo quanto no cinetoplasto do parasito. Apesar da enzima ter se mostrado funcionalmente ativa, sendo capaz de reverter o fenótipo de crescimento lento de leveduras mutantes para topoisomerase 3, o papel desempenhado por esta topoisomerase não foi completamente determinado neste parasito (Banerjee *et al*, 2011).

A fim de estudar o papel das topoisomerasas  $3\alpha$  e  $3\beta$ , em *T. cruzi*, o grupo do Dr. Stenio Perdigão Fragoso (Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná) construiu parasitos nocautes para estes genes. Para tal, as porções inicial e final da região codante de ambos os genes foram clonadas no vetor pTc2KO (Anexo 2) contendo o gene de resistência à higromicina ou neomicina. Então, estes vetores foram utilizados para transfectar parasitos epimastigotas selvagens da cepa Dm28c. Após a seleção dos parasitos, a deleção dos genes das topoisomerasas  $3\alpha$  e  $3\beta$  foi confirmada por Southern blot, um experimento que mostrou a ausência destes genes e a presença dos genes de resistência aos antibióticos nos parasitos mutantes (Figura 7A). Ambos os mutantes se mostraram viáveis, contudo, os parasitos com o gene da topoisomerase  $3\alpha$  depletado apresentaram uma certa redução no crescimento quando comparados com os parasitos selvagens e nocautes para topoisomerase  $3\beta$  (Figura 7B). Esta diferença no perfil de crescimento dos mutantes pode indicar que estas enzimas desempenham funções biológicas distintas na célula. Para caracterizar a função destas enzimas em *T. cruzi*, parasitos selvagens e nocautes foram tratados com três diferentes doses de hidroxiureia por 24 horas. Amostras foram coletadas 0, 5 e 9 horas após o tratamento e submetidas a análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo. Logo após o tratamento, todas as células estão sincronizadas na fase G1. Todavia, ao contrário dos parasitos selvagens, os parasitos nocautes para as topoisomerasas são capazes de progredir para a fase S do ciclo celular 5 horas após a remoção da droga (Figura 8). Tal resultado pode indicar o envolvimento das topoisomerasas  $3\alpha$  e  $3\beta$  nos mecanismos de *checkpoint* do ciclo celular. Entretanto, mais experimentos são necessários para elucidar a função destas enzimas em *T. cruzi* (Umaki, 2013).

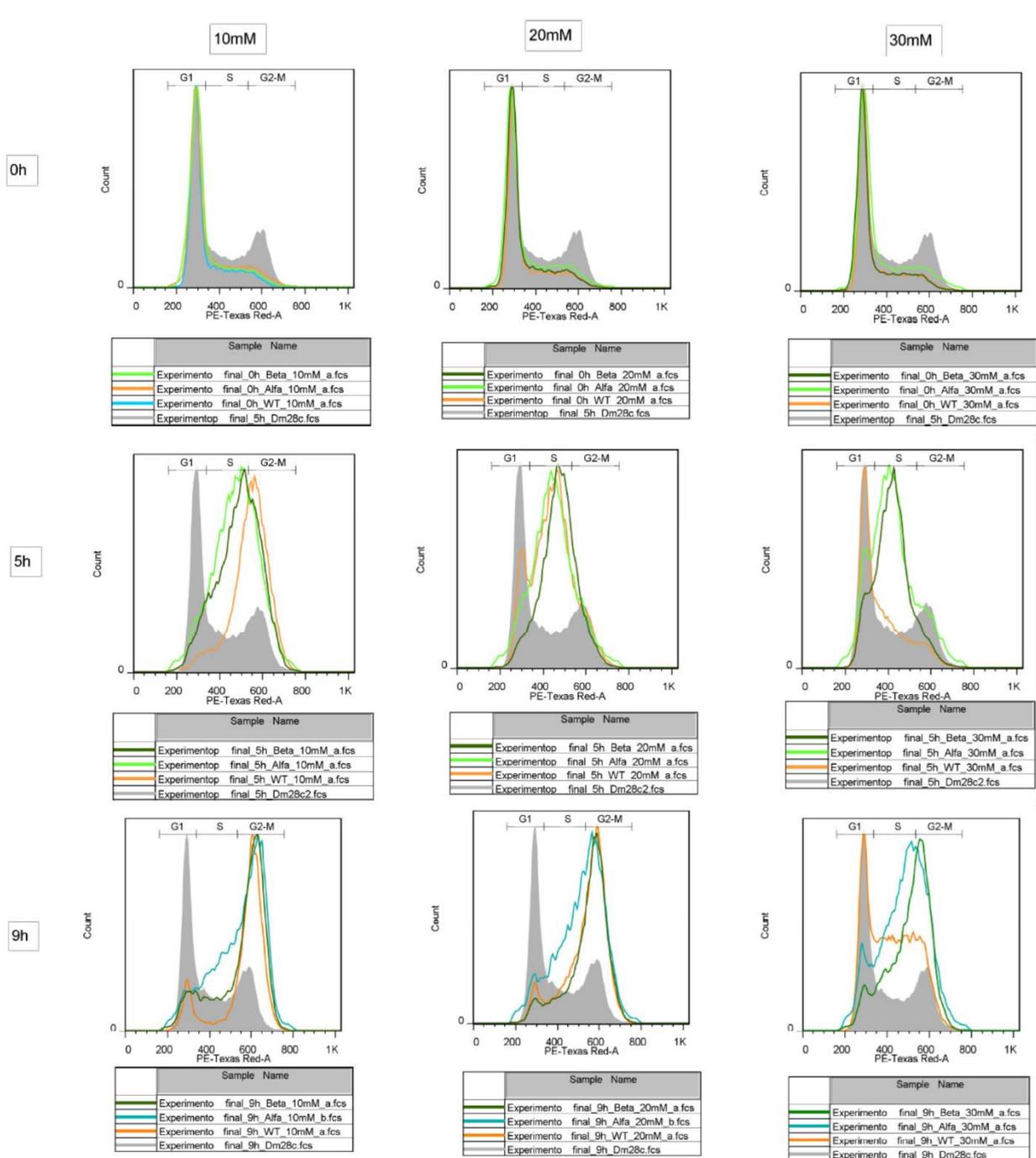
**A** Confirmação da deleção do gene da topoisomerase 3 $\alpha$



Confirmação da deleção do gene topoisomerase 3 $\beta$



**Figura 7:** Geração de parasitos nocautes para as topoisomerases 3 $\alpha$  e 3 $\beta$ . A) A análise por Southern blot utilizando sondas marcadas para detectar regiões internas dos genes da topoisomerase 3 $\alpha$ , topoisomerase 3 $\beta$ , higromicina ou neomicina confirmou a obtenção de parasitos nocautes. B) Curva de crescimento mostra a viabilidade dos parasitos mutantes. As células deficientes em topoisomerase 3 $\alpha$  apresentam uma taxa de proliferação celular menor que as células selvagem e deficiente em topoisomerase 3 $\beta$ . Experimentos realizados por Umaki, 2013.



**Figura 8:** Caracterização dos parasitos nocautes para as topoisomerases  $3\alpha$  e  $3\beta$ . Células selvagens e nocautes para as topoisomerases  $3\alpha$  e  $3\beta$  foram tratadas com doses diferentes de hidroxiureia por 24 horas. Em seguida, amostras foram recolhidas para a análise da progressão do ciclo celular. Os histogramas com as doses maiores sugerem que as células nocautes perderam o controle do *checkpoint* G1/S. Experimentos realizados por Umaki, 2013.

Conforme exposto anteriormente, experimentos realizados com as DNA topoisomerasas do tipo IA em bactérias, tripanossomatídeos e eucariotos superiores permitem assumir que estas enzimas atuam evitando o estresse replicativo nas células. Uma vez que a forquilha de replicação tenha parado o seu movimento, as células eucarióticas contam com as cinases ATR e ATM para coordenar a resposta ao estresse replicativo e recrutar proteínas de reparo, como a Rad51. Apesar dos diversos trabalhos já realizados com este parasito, poucos estudos têm sido conduzidos a fim de entender as funções desempenhadas por essas proteínas em *T. cruzi*. Assim, ainda existem muitas lacunas para um melhor entendimento da biologia deste tripanossomatídeo e dos mecanismos pelos quais a infecção se instala com sucesso. Ao longo do curso clínico da doença de Chagas, a maioria dos pacientes em fase crônica permanecem assintomáticos por décadas. Cerca de 20 a 30 anos após a infecção inicial, estes pacientes passam a apresentar comprometimento em alguns órgãos. Até o momento, não está claro o que acontece com o parasito durante todos estes anos de infecção assintomática e quais fatores permitem a reativação da doença. Um estudo recente mostrou que, após a infecção, algumas amastigotas de *T. cruzi* espontaneamente se tornam dormentes. Tais células são capazes de retomar a proliferação celular e reestabelecer a infecção, mesmo após o tratamento com BZ. Ainda não são conhecidos os mecanismos envolvidos no controle da dormência, mas é possível especular que o metabolismo do DNA seja importante para este processo, bem como para a infecção crônica. Dessa forma, o presente trabalho envolveu o estudo das funções realizadas pelas DNA topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  para prevenir o estresse replicativo, bem como das cinases de *checkpoint* ATM e ATR para sinalizar e reparar os danos de DNA gerados em decorrência da parada da forquilha de replicação em *T. cruzi*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os mecanismos de resposta ao dano de DNA durante o estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi*, por meio do estudo da função dos genes ATM, ATR, Rad51 e das DNA topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$ .

### **2.2. Objetivos Específicos**

Como objetivos específicos podemos citar:

- Analisar o efeito da ausência dos genes TcTopo3 $\alpha$  e TcTopo3 $\beta$  nos mecanismos de reparo de DNA, em formas epimastigotas de *T. cruzi*, por meio de ensaios com agentes genotóxicos;
- Analisar o efeito da ausência destes genes na progressão do ciclo celular dos parasitos submetidos ao tratamento com agentes genotóxicos;
- Analisar o efeito da ausência destes genes na sinalização de danos ao DNA nos parasitos submetidos ao tratamento com agentes genotóxicos;
- Analisar a resposta de parasitos epimastigotas heminocautes para o gene TcRad51 aos danos de DNA causados pelo tratamento com os agentes genotóxicos hidroxiiureia e metil metano sulfonato;
- Analisar o efeito da depleção dos genes TcATM e TcATR nos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA através de ensaios com agentes genotóxicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Células utilizadas e condições de cultivo

Para estudar os genes TcTopo3 $\alpha$  e TcTopo3 $\beta$  foram utilizados parasitos epimastigotas da cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* selvagens e nocautes para os genes alvos. Estas células, já modificadas, foram gentilmente cedidas pelo Doutor Stenio Fragoso (ICC – Fiocruz Paraná). As células foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptose* pH 7,4 (LIT: 4 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,4 g.L<sup>-1</sup> de KCl, 2 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 8 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g.L<sup>-1</sup> de triptose, 5 g.L<sup>-1</sup> de infusão de fígado, 0,02 mg.mL<sup>-1</sup> de hemina) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) e mantidas a 28°C.

Também foram utilizadas formas epimastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* selvagens e modificadas, na qual um dos alelos do gene Rad51 foi deletado. Estes parasitos heminocautes, contruídos em nosso laboratório (Passos-Silva *et al*, 2018), foram cultivados em meio LIT pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) e mantidos a 28°C.

Para a clonagem dos genes TcATM e TcATR foi utilizada a linhagem *Escherichia coli* XL1-Blue (genótipo: *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*). O meio Luria Bertani (LB) foi usado para cultivo bacteriano a 37°C e para o estoque das culturas a -80°C, mediante acréscimo de 25% de glicerol. Para a transfecção foram utilizadas formas epimastigotas selvagens da cepa CL Brener de *T. cruzi*. O meio LIT pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) foi usado para cultivo celular a 28°C.

### 3.2. Curva de crescimento na presença de agentes genotóxicos

Para estudar o papel dos genes TcRad51, TcTopo3 $\alpha$  e TcTopo3 $\beta$ , bem como analisar o efeito do estresse replicativo em *T. cruzi*, parasitos selvagens (chamados de WT) e mutantes (chamados de Rad51+/-, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO, respectivamente) foram tratados com alguns agentes genotóxicos. Para todas as drogas testadas, células com crescimento exponencial foram diluídas para a concentração inicial de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e o crescimento das culturas foi acompanhado por contagem em câmara citométrica, até os controles atingirem a fase estacionária. Durante a contagem, foi usado o corante vital eritrosina (0,04% em PBS, pH 7,4) para diferenciar células vivas e mortas. Para cada tratamento, foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

Parasitos foram incubados com 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ou 15  $\mu$ M de camptotecina (CPT) em meio LIT e mantidos a 28°C. Após 48 horas de tratamento, a camptotecina foi removida do meio de cultura e os parasitos foram ressuspensos em meio LIT fresco, livre de drogas. Parasitos foram tratados com 50 ou 100  $\mu$ M de cisplatina (Cis) em PBS por 1 hora a 28°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio LIT fresco a 28°C. Parasitos foram tratados com 10, 20 ou 30 mM de hidroxiuréia (HU) em meio LIT e incubados a 28°C por 24 horas. Após esse tempo, a droga foi retirada do meio, as células foram lavadas três vezes com PBS e os parasitos foram ressuspensos em meio fresco. Parasitos foram tratados com 1,5 mM de metil metano sulfonato (MMS) em PBS a 28°C por 1 hora. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio LIT fresco. Alternativamente, o tratamento com esta droga foi realizado em meio LIT por períodos variados. Parasitos em meio LIT foram expostos a 500 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto 60 localizada no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento de

Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN). A irradiação foi realizada em um raio de 27 cm da fonte por 19 minutos e 28 segundos a uma taxa de dose de 1541 Gy/h. Parasitos em meio LIT foram expostos a 1500 J.m<sup>-2</sup> de UVC no aparelho Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

### **3.3. Análise da progressão do ciclo celular por FACS**

Com o intuito de avaliar as alterações no ciclo celular dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO devido ao estresse replicativo, as células foram submetidas à análise por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) após o tratamento com cisplatina (50 ou 100  $\mu$ M), hidroxiureia (10, 20 ou 30 mM) ou MMS (1,5 mM). Células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com estas drogas, conforme explicado no item anterior, e a cada 24 horas amostras foram recolhidas para análise da progressão do ciclo celular. Para tal,  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos, lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% a -20°C por pelo menos 16 horas. Após este período, para marcação do conteúdo de DNA, as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspendidas em PBS contendo 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de RNase A (Invitrogen) e 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídeo (BD Pharmingen). As amostras foram incubadas nessa solução por 30 minutos a 37°C e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram lidas nos aparelhos FACSCan ou FACSCalibur (Benckton-Dickson) e os resultados analisados em forma de histograma no programa FlowJo VX.

### **3.4. Preparo do extrato total de proteínas e quantificação pelo método de Bradford**

Para medir o nível de dano de DNA nos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO após o tratamento com 100  $\mu$ M de cisplatina, 20 mM de hidroxiureia ou 1,5 mM de MMS  $1 \times 10^8$  células de cada cultura foram utilizadas para preparar o extrato total de proteínas.

Para tal, as células foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram lisadas com 50 µL de tampão de amostra 2X (100 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, 200 mM de DTT). Seguindo com o processo de lise celular, as amostras foram sonicadas no aparelho Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific) a 30% da amplitude máxima por 5 ciclos de 20 segundos, com um intervalo de 20 segundos entre cada ciclo. Então, as amostras foram fervidas por 5 minutos e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

A concentração proteica dos extratos foi determinada pelo método de Bradford. Para cada ensaio foram utilizados 10 µL de extrato proteico, 10 µL de água deionizada estéril e 180 µL de reagente de Bradford (Bio-Rad) diluído 1:4 em água deionizada estéril. Cada amostra proteica foi dosada em duplicata. A curva de calibração foi preparada com 20 µL de diferentes concentrações de BSA (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>) em triplicata. A leitura da absorbância foi feita a 595 nm no aparelho iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). A quantidade de proteína em cada extrato foi estimada com base na equação linear resultante da curva de calibração.

### **3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot para mensurar o dano no DNA**

Para a separação das proteínas de acordo com seu tamanho foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com o detergente aniônico SDS (SDS-PAGE). Tanto o gel de empilhamento 5% quanto o gel de separação 15% foram preparados seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russell, 2001. Os extratos proteicos foram descongelados, fervidos por 5 minutos e 15 µg de cada foram aplicados no gel de empilhamento. A corrida foi realizada a 125 V por cerca de 2 horas utilizando o tampão Tris-Glicina (25 mM de Tris, 250 mM de glicina pH8,3 e 0,1% de SDS). Para cada

conjunto de amostras foram feitos dois géis, um deles foi utilizado na transferência para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF – GE Healthcare Amersham™) e o outro, chamado de réplica, foi corado com solução corante (0,25% Coomassie Brilliant Blue G-250, 50% metanol e 10% ácido acético) por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após esse tempo, o gel réplica foi descorado *overnight* utilizando solução descorante (30% metanol e 10% ácido acético). Após a corrida, o gel utilizado para a transferência foi lavado e incubado por 10 minutos em tampão de transferência gelado (30 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Concomitantemente, a membrana de PVDF foi ativada com metanol por 30 segundos, lavada e incubada por 10 minutos no tampão de transferência gelado. O aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) foi utilizado para realizar a transferência semi-seca por 1 hora a 300 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada, por pelo menos 2 horas sob agitação, com solução de bloqueio, que consiste de tampão TBST (150 mM NaCl, 20 mM de Tris pH 7,5 e 0,1% Tween 20) contendo 5% leite em pó desnatado. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por 5 minutos. Então, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti- $\gamma$ H2A, na diluição 1:3000, produzido em coelho e gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Richard McCulloch (University of Glasgow). Alternativamente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -tubulina produzido em camundongo (Sigma) na diluição 1:10000. Em ambos os casos, a incubação ocorreu em solução de bloqueio sob agitação *overnight*. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por 5 minutos e incubada com os anticorpos secundários, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma Immuno Chemicals) ou anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:5000 por 1 hora. Então, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por 5 minutos e revelada utilizando o sistema Immobilon™

Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) no aparelho ImageQuant LAS 500 (GE).

### 3.6. Iniciadores

Com base nas sequências dos genes ATM e ATR de humanos (Genbank: NP\_000042.3 e NP\_001175.2, respectivamente), as sequências dos genes ATM e ATR de *T. cruzi* da cepa CL Brener foram identificadas no banco de dados de tripanossomatídeos Tritryp (Tabela 1). A análise de domínios proteicos foi realizada utilizando o software Conserved Domains Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>).

**Tabela 1:** Número de acesso das sequências dos genes ATM e ATR.

Gene	Tamanho	Cromossomo	Número de acesso (TritrypDB)
ATM Esmeraldo-like	12286 pb	1	TcCLB.506533.34
ATM Não Esmeraldo-like	12705 pb	1	TcCLB.509395.20
ATR Esmeraldo-like	8694 pb	35	TcCLB.506223.120
ATR Não Esmeraldo-like	6549 pb	35	TcCLB.511719.10

Com base nestas sequências, os iniciadores utilizados neste trabalho foram desenhados (Tabela 2). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT Technologies e diluídos em água deionizada estéril para a concentração estoque de 200 µM.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados neste trabalho. Os sítios de restrição presentes nos iniciadores estão sublinhados.

Primers	Sequência	Amplicon	Tm	Finalidade
ATMhemiEsm5'F <u>ApaI</u>	5' <u>GGG CCC ACC</u> ATT GCG TAG GTA TTT T 3'	554 pb	61,6°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiEsm5'R <u>SpeI</u>	5' <u>ACT AGT</u> GTC TCA CCC CTC ACT CCT TCC 3'		62,5°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiEsm3'F <u>XhoI</u>	5' <u>CTC GAG</u> TAA CAT ATC GAG CAC CAT C 3'	581 pb	56,8°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)

ATMhemiEsm3'RBglII	5' <u>AGA TCT</u> GCA GGA AGC AAC GAG 3'		57,2°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiNEsm5'FApaI	5' <u>GGG CCC</u> ATT GCG TAG GCA TTT C 3'	534 pb	61,4°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiNEsm5'RSpeI	5' <u>ACT AGT</u> GTC TCA CCC CTC ACT CCT TCT 3'		61,8°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiNEsm3'FXhoI	5' <u>CTC GAG</u> TAA CAT ATC GAG CAC CAT T 3'	560 pb	56,5°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATMhemiNEsm3'RBglII	5' <u>AGA TCT</u> GCA GGA AGC AAC GAA 3'		56,7°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATRhemiEsm5'FApaI	5' <u>GGG CCC</u> CAA TTC TTT AAT AAA T 3'	478 pb	51,2°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATRhemiEsm5'RSpeI	5' <u>ACT AGT</u> ACA TAT ACA TAT ATA TAT ACG CAA AC 3		51,2°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATRhemiEsm3'FXhoI	5' <u>CTC GAG</u> CGA ATT TAC TGC CGC ATA G 3'	636 pb	59,7°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
ATRhemiEsm3'RBglII	5' <u>AGA TCT</u> GGT GGG TCC TTC TGC AT 3'		60,1°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pGEM T-Easy)
NeoFSpeI	5' <u>ACT AGT</u> ATG GGA TCG GCC ATT GAA 3'	804 pb	57,8°C	Heminocaute ATM e ATR (pGEM T-Easy)
NeoRXhoI	5' <u>CTC GAG</u> TCA GAA GAA CTC GTC AAG AA 3'		57,9°C	Heminocaute ATM e ATR (pGEM T-Easy)
HygroFSpeI	5' <u>ACT AGT</u> ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC G 3'	1062 pb	58,5°C	Heminocaute ATM e ATR (pGEM T-Easy)
HygroRXhoI	5' <u>CTC GAG</u> TTA GGA TCG GGG GAT C 3'		58,5°C	Heminocaute ATM e ATR (pGEM T-Easy)
ATMhemiEsm5'FKpnI	5' <u>GGT ACC</u> CCG ACC ATT GCG TAG GTA TTT T 3'	555 pb	62°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATMhemiEsm5'RSaII	5' <u>GTC GAC</u> CTC ACC CCT CAC TCC TTC C 3'		64,1°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATMhemiEsm3'FBamHI	5' <u>GGA TCC</u> GTA ACA TAT CGA GCA CCA TC 3'	583 pb	58,8°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO total e parcial)
ATMhemiEsm3'RXbaI	5' <u>TCT AGA</u> GGC AGG AAG CAA CGA G 3'		58,5°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO total e parcial)
ATMhemiNEsm5'FKpnI	5' <u>GGT ACC</u> ACC ATT GCG TAG GCA TTT C 3'	534 pb	60,2°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATMhemiNEsm5'RSaII	5' <u>GTC GAC</u> TCA CCC CTC ACT CCT TCT 3'		61,7°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total)

ATMhemiNEsm3'FBamHI	5' <u>GGA TCC</u> GTA ACA TAT CGA GCA CCA TT 3'	562 pb	58,5°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total e parcial)
ATMhemiNEsm3'RXbaI	5' <u>TCT AGA</u> GGC AGG AAG CAA CGA A 3'		58,1°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total e parcial)
ATRhemiEsm5'KpnI	5' <u>GGT ACC</u> CAC GCA ATT CTT TAA TAA AT 3'	482 pb	54°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATRhemiEsm5'RSaI	5' <u>GTC GAC</u> ACA TAT ACA TAT ATA TAT ACG CAA AC 3'		53,8°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATRhemiEsm3'FBamHI	5' <u>GGA TCC</u> GCC AAG TCT CGC GCT 3'	465 pb	64,2°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATRhemiEsm3'RXbaI	5' <u>TCT AGA</u> GTA CGG CTT TGG CGG AAT GGG 3'		63,3°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ParcialATMhemiEsm5'FKpnI	5' <u>GGT ACC</u> GGG AGC GAT AAT GGT GGC ATA 3'	457 pb	63,5°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATMhemiEsm5'RSaI	5' <u>GTC GAC</u> CAC GCC TCT TAT CAC CGG T 3'		64,1°C	Heminocaute ATM Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATMhemiNEsm5'FKpnI	5' <u>GGT ACC</u> CCC GCT CTT ATT TGC TGC TG 3'	533 pb	63,3°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATMhemiNEsm5'RSaI	5' <u>GTC GAC</u> GGT AAG GCG CAT GCA C 3'		63,1°C	Heminocaute ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATRhemiEsm5'FKpnI	5' <u>GGT ACC</u> GGC GCA TGA TGG GTT CT 3'	505 pb	63,7°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATRhemiEsm5'RSaI	5' <u>GTC GAC</u> GGC AAA TAA CGT TGG CTC TCG 3'		63,2°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATRhemiEsm3'FBamHI	5' <u>GGA TCC</u> CGC ATA GGC GGT GTG A 3'	402 pb	63,6°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ParcialATRhemi3'RXbaI	5' <u>TCT AGA</u> GTC ATG TGC CGC ATC GCC 3'		62,9°C	Heminocaute ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
RT-ATMhemiNEsmF	5' CAC ATC GTG CGA TCG CCA TC 3'	123 pb	59°C	PCR em tempo real ATM Não Esmeraldo-like
RT-ATMhemiR	5' GAA CAA TGG CCG GCA TCT GC 3'		59,8°C	PCR em tempo real ATM Não Esmeraldo-like
RT-ATRhemiEsmF	5' GCG CTG CGT TGT ATG CAA CAG 3'	107 pb	59,9°C	PCR em tempo real ATR Esmeraldo-like
RT-ATRhemiEsmR	5' TCC TGT TTT CTA TGC TCA GCT GGC 3'		59,3°C	PCR em tempo real ATR Esmeraldo-like

ATMhemiNEsmF	5' CAT CTC ATG ACG CCG ATT CCA TT 3'	746 pb	57,5°C	Localização do cassete ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATMhemiNEsmR2	5' CCT TTG GGT TCG GCA TTT GG 3'		57,2°C	Localização do cassete ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATRhemiEsmF	5' CGC ATA TCA AAT TAC GTG GAA AAA GCA 3'	662 pb	56,6°C	Localização do cassete ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATRhemiEsmR2	5' GCC CCT GCT TCT CCA CAT AA 3'		57,3°C	Localização do cassete ATR Esmeraldo-like (pTc2KO total)
ATMparcialNEsmF	5' GCG GTG CTT CTC CTA ATC GA 3'	766 pb	57°C	Localização do cassete ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ATMparcialNEsmR2	5' GAC GAT GAT GCA CAC TAT CCA GTA G 3'		56,8°C	Localização do cassete ATM Não Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ATRparcialEsmF	5' GTG GAT GGA CTC GTG GTT CT 3'	635 pb	56,8°C	Localização do cassete ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
ATRparcialEsmR2	5' TTG AAG AGT CCC TGT CGC C 3'		57,1°C	Localização do cassete ATR Esmeraldo-like (pTc2KO parcial)
HigroIntR1	5' AGC TGA AAG CAC GAG ATT CTT CG 3'		57,4°C	Localização dos cassetes (pTc2KO total e parcial)
NeoIntR1	5' CAT CAG AGC AGC CGA TTG TCT 3'		57,3°C	Localização dos cassetes (pTc2KO total e parcial)

### 3.7. Reação em cadeia da polimerase

Cerca de  $5 \times 10^7$  células epimastigotas selvagens da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram utilizadas para a extração do DNA genômico com o kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), através do protocolo de extração de DNA em células, fornecido pelo fabricante.

A primeira abordagem para deletar os genes TcATM e TcATR utilizou os oito primeiros conjuntos de iniciadores, chamados de pGEM *T-Easy* (Tabela 2). As reações de amplificação foram preparadas com 0,25  $\mu$ M dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada conjunto, juntamente com 1 ng do DNA molde, 0,1 mM de cada dNTP, 2  $\mu$ L de tampão de amplificação 10X, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase

(Invitrogen), totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. As condições de amplificação consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos por 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 51°C – 61°C dependendo do conjunto de iniciadores utilizado e 1 minuto a 72°C. Em seguida, foram feitas mais quatro rodadas de amplificação, compostas de 5 ciclos cada. Em cada rodada, a temperatura de hibridização do iniciador foi diminuída em 2°C. A sexta rodada de amplificação, na qual a temperatura de hibridização do iniciador era 10°C a menos que a temperatura utilizada na primeira rodada, era composta por 20 ciclos. A última etapa da amplificação foi a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose TAE 1% contendo SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen). As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat.

Na segunda abordagem para a deleção dos genes alvos, foram utilizados os seis conjuntos de iniciadores chamados de pTc2KO total (Tabela 2). As reações de amplificação para clonagem foram preparadas com 0,25  $\mu$ M dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada conjunto, juntamente com 50 ng do DNA molde, 0,1 mM de cada dNTP, 2  $\mu$ L de tampão de amplificação 10X, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen), totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. As demais reações de amplificação foram preparadas com a mesma quantidade de iniciadores, DNA molde e dNTP, acrescido de 2  $\mu$ L de tampão de amplificação IB 10X e de 1U de Taq Pht DNA polimerase (Phoneutria), totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. Em ambos os casos, as condições de amplificação consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 51°C – 60°C dependendo do conjunto de iniciadores utilizado e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose TAE 1% contendo SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen).

As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad).

Na terceira abordagem para a construção dos cassetes de deleção foram utilizados os seis conjuntos de iniciadores chamados de pTc2KO parcial (Tabela 2). As reações de amplificação foram preparadas como descrito acima. De forma similar à anterior, as condições de amplificação consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C – 61°C dependendo do conjunto de iniciadores utilizado e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Novamente, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose TAE 1% contendo SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen) e as imagens foram registradas pelo sistema de fotodocumentação Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad).

### **3.8. Clonagem das regiões intergênicas dos genes TcATM e TcATR**

Nas duas primeiras abordagens para deletar os genes ATM e ATR se fez necessário a construção de um cassete de deleção, que consiste de um gene de seleção (higromicina ou neomicina) flanqueado pelas regiões intergênicas a montante (5'UP) e a jusante (3'DW) da ORF do gene alvo. Ou seja, um dos alelos de ATM e ATR é inteiramente substituído pelo gene de resistência ao antibiótico. Na terceira abordagem, o cassete de deleção é formado pelo gene higromicina ou neomicina flanqueado pelas regiões a montante e a jusante apenas da região gênica que compreende o domínio cinase dos genes ATM e ATR. Dessa forma, este cassete é capaz de deletar uma parte dos genes alvos. Para a construção dos cassetes nas três abordagens testadas neste trabalho, foram realizadas as reações de amplificação descritas no item anterior. Os produtos de PCR obtidos foram ligados no vetor pGEM T-*Easy* (Promega) (Anexo 1) em uma reação

contendo 5  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação 2X, 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase, 1  $\mu\text{L}$  do vetor pGEM e 3  $\mu\text{L}$  de cada produto de PCR. A reação foi mantida a 4°C *overnight*.

Para obtenção de bactérias *E. coli* XL1-Blue termocompetentes, 450 mL de cultura com  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  igual a 0,3 foi mantida no gelo por 10 minutos e em seguida centrifugada a 2500 g por 7 minutos a 4°C e lavada com 45 mL de  $\text{CaCl}_2$  gelado. As células foram solubilizadas em 45mL de  $\text{CaCl}_2$  gelado e mantidas no gelo por 30 minutos. Após essa incubação, as células foram centrifugadas novamente, solubilizadas em 4,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  gelado e armazenadas em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cultura a -80°C.

Para a transformação, alíquotas de *E. coli* XL1-Blue termocompetente foram incubadas com todo volume de cada reação de ligação por 30 minutos no gelo. Em seguida, as alíquotas foram submetidas ao choque térmico a 42°C por 55 segundos. Imediatamente após o choque, as alíquotas foram incubadas no gelo por 1 minuto, transferidas para 500  $\mu\text{L}$  de meio LB e mantidas por 60 minutos a 37°C e 180 rpm. Em seguida, 300  $\mu\text{L}$  da cultura foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina e incubada a 37°C *overnight*. Para seleção dos clones positivos foi realizada uma PCR de colônia, na qual as colônias foram utilizadas como amostra de DNA na reação de PCR com Taq Pht descrita no item 3.7.

Os clones positivos para a PCR de colônia foram crescidos em 15 mL de meio LB líquido com 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi realizada com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, 10 ng de cada plasmídeo foi utilizado como molde em reações de PCR com a Taq Pht.

### 3.9. Montagem dos cassetes de deleção

A primeira tentativa de montar os cassetes de deleção consistiu em clonagens e ligações sequenciais utilizando apenas o vetor pGEM T-*Easy* (Promega). Conforme exposto no item anterior, a região intergênica 5'UP e 3'DW da ORF dos genes de interesse, bem como os genes de resistência à higromicina e neomicina foram clonados separadamente no vetor pGEM T-*Easy* (Promega). Os plasmídeos contendo os genes de resistência foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *SpeI* (Fermentas). Assim, 3 µg do plasmídeo foram incubados com 1,5 µL da enzima *SpeI*, 10 µL do tampão Tango 10X, 1 µL de BSA 10 µg. µL<sup>-1</sup> e água para um volume final de 100 µL por 4 horas a 37°C. Logo após, foram adicionados 1,5 µL da enzima *XhoI* e 12,5 µL do tampão Tango 10X e a incubação foi repetida por 16 horas. Os fragmentos liberados foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit de purificação QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, estes fragmentos foram ligados aos vetores contendo os fragmentos 3'DW dos genes alvos, previamente digeridos com as mesmas enzimas e purificados. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) e seu tampão 10X (Promega). A reação de ligação foi preparada levando em conta a seguinte proporção:

$$\text{quantidade do inserto (ng)} = \frac{\text{quantidade do vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)} \times 3}{\text{tamanho do vetor (pb)}}$$

As reações de ligação foram incubadas a 4°C *overnight*. De forma similar ao descrito no item anterior, o produto de ligação foi utilizado para transformar células *E. coli* XL1 Blue termocompetentes. Os clones positivos foram selecionados por meio de PCR de colônia e tiveram seu DNA plasmidial extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Novamente, após a extração, 10 ng de cada plasmídeo foi utilizado como molde em reações de PCR com a Taq Pht, para

confirmação da inserção do fragmento de resistência. A incapacidade de comprovar a correta ligação entre o gene de resistência e a região intergênica 3'DW impediu o prosseguimento da montagem do cassete utilizando apenas o vetor pGEM T-*Easy* (Promega).

Como metodologia alternativa, os cassetes para deleção integral e parcial dos genes ATM e ATR foram montados utilizando o vetor pTc2KO (Anexo 2), construído pelo grupo do Dr. Stenio Fragoso (ICC – Fiocruz Paraná). Este vetor contém os genes de resistência à higromicina ou neomicina flanqueados por regiões intergênicas não reguladas em *T. cruzi*, que sinalizam para o correto processamento do transcrito destes genes. A presença de sítios de restrição próximos ao marcador de seleção permite a clonagem das regiões 5' UP e 3'DW dos genes alvos.

Os plasmídeos contendo a região a montante 5'UP, obtidos no item anterior, foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI* (Promega). Assim, 3 µg do plasmídeo foram incubados com 1,5 µL da enzima *KpnI*, 10 µL do tampão J 10X, 1 µL de BSA 10 µg. µL<sup>-1</sup> e água para um volume final de 100 µL por 4 horas a 37°C. Logo após, foram adicionados 1,5 µL da enzima *SalI* e 10 µL do tampão D 10X e a incubação foi repetida por 16 horas. Os fragmentos liberados foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit de purificação GenElute Gel Extraction Kit (Sigma - Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A ligação ao vetor pTc2KO contendo os genes de resistência à higromicina ou neomicina, previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado, foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) e seu tampão 10X (Promega). A reação de ligação foi preparada da mesma maneira descrita acima. Novamente, o produto de ligação foi utilizado para transformar células *E. coli* XL1 Blue termocompetentes. Os clones positivos selecionados por PCR de colônia tiveram seu DNA plasmidial extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification

System (Promega) e, após a extração, 10 ng de cada plasmídeo foi utilizado como molde em reações de PCR com a Taq Pht, para confirmação da inserção do fragmento 5'UP.

Para finalizar a construção dos cassetes de deleção foi necessária a inserção da região intergênica 3'DW nos plasmídeos anteriormente selecionados. Para tal, os mesmos passos descritos acima foram realizados. Contudo, nesta etapa, foi feita uma digestão com as enzimas *BamHI* e *XbaI* (Promega). Assim, 3 µg dos plasmídeos pGEM contendo a região intergênica 3'DW e dos plasmídeos pTc2KO contendo a região a montante 5' UP foram incubados com 1,5 µL da enzima *BamHI*, 1,5 µL da enzima *XbaI*, 10 µL do tampão E 10X, 1 µL de BSA 10 µg. µL<sup>-1</sup> e água para um volume final de 100 µL por 16 horas a 37°C. Os fragmentos liberados foram purificados do gel, ligados e utilizados para transformar bactérias *E. coli* XL1 Blue termocompetentes. Como anteriormente, os clones positivos foram selecionados por meio de PCR de colônia, tiveram seu DNA plasmidial extraído e testado por PCR com a Taq Pht, para confirmação da inserção do fragmento 3'DW.

### **3.10. Sequenciamento de DNA plasmidial**

Os plasmídeos contendo o cassete de deleção, obtidos conforme descrito no item anterior, foram encaminhados para sequenciamento pelo método de Sanger na Myleus Biotechnology ([www.myleus.com](http://www.myleus.com)). Para isso, as amostras foram preparadas com 100 ng de plasmídeo e 10 pmol dos iniciadores em um volume final de 7,5 µL. O sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no aparelho ABI3730 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. As sequências geradas foram analisadas no software DNA Baser v4 ([www.dnabaser.com](http://www.dnabaser.com)) e alinhadas com as sequências de *T. cruzi* CL Brener utilizando o software MultAlin ([multalin.toulouse.inra.fr/multalin/](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)).

### 3.11. Transfecção de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Cerca de 15 µg dos clones confirmados na etapa anterior foram digeridos com 3 µL das enzimas *KpnI* e *XbaI* (Promega), 40 µL do tampão Multicore 10X, 4 µL de BSA 10 µg. µL<sup>-1</sup> e água para um volume final de 400 µL a 37°C por 16 horas. Em seguida, o DNA digerido foi precipitado utilizando isopropanol e acetato de sódio 3M e solubilizado em 5 µL de água deionizada estéril.

A transfecção dos plasmídeos foi realizada por eletroporação no aparelho Nucleofector™ 2b Device (Lonza). Para tal, 4x10<sup>7</sup> parasitos selvagens em fase exponencial de crescimento foram centrifugados, lavados duas vezes com PBS estéril e ressuspendidos em 80 µL de tampão TbBSF 1X estéril (90 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES pH7,3). Aos 5 µL da digestão precipitada foram adicionados 7,5 µL de água deionizada estéril e 7,5 µL de TbBSF 3X estéril, totalizando 20 µL de DNA que foram adicionados aos 80 µL de células. O volume total foi transferido para cubetas de 0,2 cm (Sigma-Aldrich) e o programa U033 foi utilizado na eletroporação. Como controle, uma amostra foi feita sem DNA, apenas com água. Em seguida, os parasitos transfectados foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT e incubados a 28°C. Para selecionar as células que receberam o cassete de deleção, 24 horas após a transfecção, foi adicionado ao meio de cultura higromicina (Invitrogen) ou neomicina (G418 – Gibco). Foram testadas quatro formas de seleção diferentes, que variam na concentração de antibiótico utilizado. Na primeira tentativa, 24 horas após a transfecção, foi adicionado 50 µg.mL<sup>-1</sup> de antibiótico e a cada semana a quantidade de antibiótico nas células repicadas foi aumentada até atingir 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Nas demais tentativas, a seleção ocorreu com as doses fixas de 200, 300 ou 500 µg.mL<sup>-1</sup>. Para todas as situações, os parasitos transfectados foram considerados selecionados

quando os parasitos transfectados apenas com água estavam mortos, o que ocorreu cerca de 5 semanas após a transfecção.

### **3.12. Reação de PCR com os parasitos selecionados**

Cerca de  $5 \times 10^7$  células epimastigotas dos parasitos selecionados após a transfecção foram utilizadas para a extração do DNA genômico com o kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), através do protocolo de extração de DNA em células, fornecido pelo fabricante. Os DNAs obtidos foram utilizados em reações de PCR para verificar a presença e a localização do cassete de deleção. As reações de amplificação foram preparadas com 0,25  $\mu$ M dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada conjunto (Tabela 2), juntamente com 50 ng do DNA molde, 0,1 mM de cada dNTP, 2  $\mu$ L de tampão de IB 10X e de 1U de Taq Pht DNA polimerase (Phoneutria), totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. As condições de amplificação consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C – 61°C dependendo do conjunto de iniciadores utilizado e 3 minutos e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose TAE 1% contendo SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen). As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Gel Documentation System (Bio-Rad).

### **3.13. Extração de RNA total e confirmação dos heminocautes por RT-qPCR**

Para confirmar que os parasitos selecionados estão com reduzidos níveis de expressão dos genes TcATM e TcATR foi realizada PCR quantitativa em tempo real. O primeiro passo foi a extração do RNA total de cerca de  $1 \times 10^8$  células de epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento pelo método do TRIzol (Invitrogen). As

amostras de RNA obtidas foram dosadas a 260 nm e sua qualidade foi analisada em gel de agarose 1% contendo formaldeído. Uma vez verificado que o RNA estava íntegro era necessário remover as contaminações com DNA genômico. Assim, 10 µg de cada amostra de RNA foram tratadas com a DNase disponível no TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> Kit (Ambion), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram novamente dosadas e submetidas a reação de PCR descrita no item 3.7, para conferir a eficiência do tratamento com DNase. O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa usando como molde 1 µg do RNA tratado, utilizando o kit Super Script III First – Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o Power SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para testar a eficiência dos iniciadores desenhados neste trabalho (Tabela 2) foram preparadas reações, em triplicata, contendo diferentes concentrações do cDNA da cepa CL Brener WT (50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng, 1,56 ng, 0,78 ng e 0,39 ng). O valor de inclinação da curva padrão foi utilizado no software qPCR Efficiency Calculator (Thermo Fisher Scientific) para determinar a eficiência de cada iniciador. Foram consideradas aceitáveis as eficiências entre 90% e 110%. Em seguida, todas as reações foram feitas em triplicata, contendo 5 ng de cDNA, 300 nM de cada iniciador (Tabela 2), 5 µL de Mix SYBR 2X (Applied Biosystems) e água deionizada estéril para completar um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto cada, seguidos por um último ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos. Um controle negativo da transcrição reversa (sem a enzima transcriptase reversa) e um controle negativo sem cDNA (substituído por água deionizada estéril) foram incluídos em cada

placa para cada conjunto de iniciadores utilizados, com a finalidade de confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de iniciadores ou a contaminação dos reagentes, respectivamente. Após as reações, foi feita a análise da curva de dissociação dos produtos amplificados de cada amostra para verificar se as reações estavam produzindo mais de um produto ou se havia formação de dímeros. A quantidade relativa de transcritos alvos em cada amostra foi determinada usando o método  $\Delta\Delta C_t$  e GAPDH como gene constitutivo, para a normalização dos resultados obtidos.

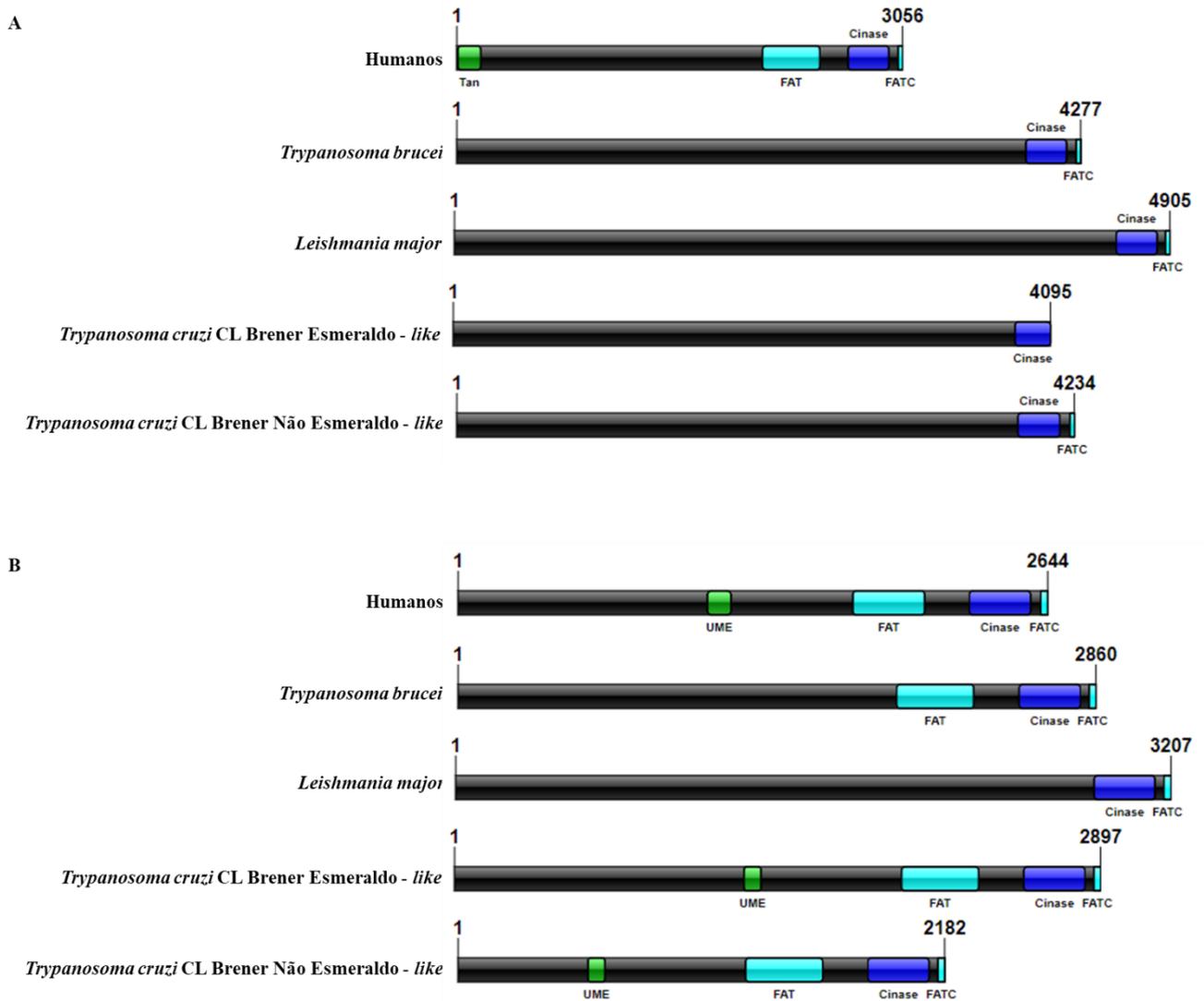
Adicionalmente, para confirmar que os parasitos selecionados possuem apenas um alelo dos genes TcATM e TcATR a reação de RT-qPCR, descrita acima, foi realizada tendo como molde o DNA genômico dos parasitos selecionados e do parasito WT.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ATM e ATR em *Trypanosoma cruzi* CL Brener

Tem sido mostrado que a região N-terminal das proteínas PIKK são formadas por  $\alpha$ -hélices que carregam diversas repetições do motivo HEAT (em inglês, *huntingtin*, *elongation factor 3*, *A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1*), importante para a interação com outras proteínas bem como para a regulação da atividade cinase. Já na região C-terminal, além do domínio cinase catalítico, são encontrados os domínios FAT (domínio FRAP-ATM-TRRAP) e FATC (domínio FAT C-terminal), que são necessários para a ativação e atividade das cinases (Awasthi *et al*, 2015). Devido a essa conservação na organização dos domínios proteicos, as sequências de aminoácidos das proteínas ATM e ATR de humanos foram utilizadas para realizar um BLAST (em inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) no proteoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*, disponível no banco de dados dos tripanossomatídeos (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Em seguida, foi realizada uma busca pelos domínios proteicos presentes nas sequências de maior similaridade, ou seja, as que apresentam uma maior pontuação de alinhamento (*score*) e significância estatística (*E-value*). Tal análise permitiu a identificação apenas dos domínios cinase e FATC em TcATM, também presentes na ATM de outros tripanossomatídeos (Figura 9A). Na proteína TcATR foi possível a identificação de todos os domínios presentes na proteína humana (Figura 9B). Assim, a análise dos domínios proteicos presentes nas sequências obtidas sugere a existência de apenas uma cópia de cada gene no genoma de *T. cruzi*, o que permite a geração de parasitos heminocutes para as cinases TcATM e TcATR. Segundo a anotação disponível no banco de dados, 434 pb estão ausentes na porção final do alelo ATM Esmeraldo – *like* e 2145 pb na porção inicial

do alelo ATR Não Esmeraldo – *like* (Figura 9 e Tabela 1). Contudo, não é possível inferir se tal diferença entre os alelos é real ou decorre de problemas no sequenciamento.

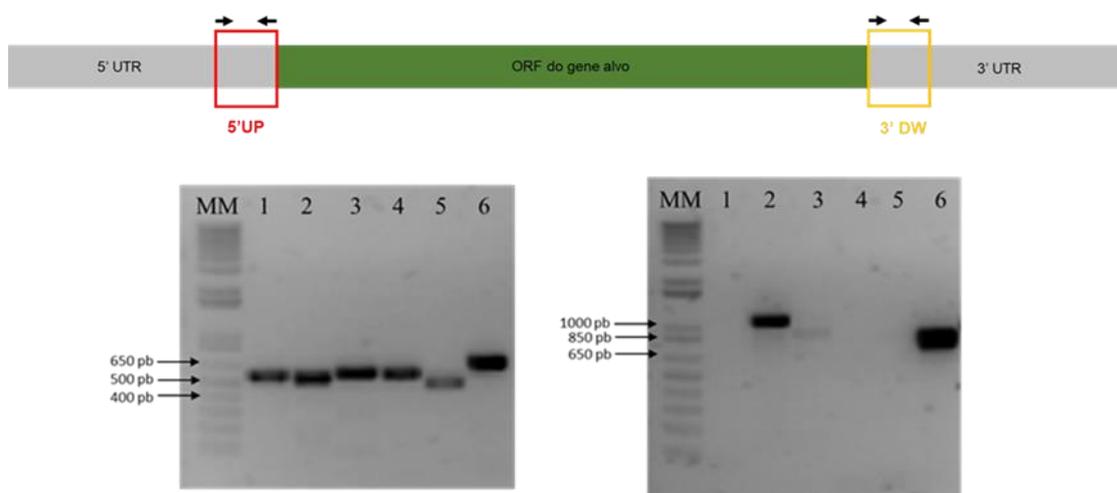


**Figura 9:** Domínios proteicos presentes nas cinases ATM e ATR. Esquema mostrando os domínios proteicos das cinases ATM (A) e ATR (B) de vários organismos encontrados pelo software Conserved Domains Database. É possível notar que a ATM dos tripanossomatídeos apresentam apenas os domínios cinase e FATC, enquanto a ATR de *T. cruzi* apresenta todos os domínios presentes na proteína humana.

#### 4.2. Montagem dos cassetes de deleção no vetor pGEM T-*Easy*

Para estudar o papel dos genes ATM e ATR em *T. cruzi*, foram construídos cassetes de deleção alelo-específicos baseados na sequência de nucleotídeos disponíveis

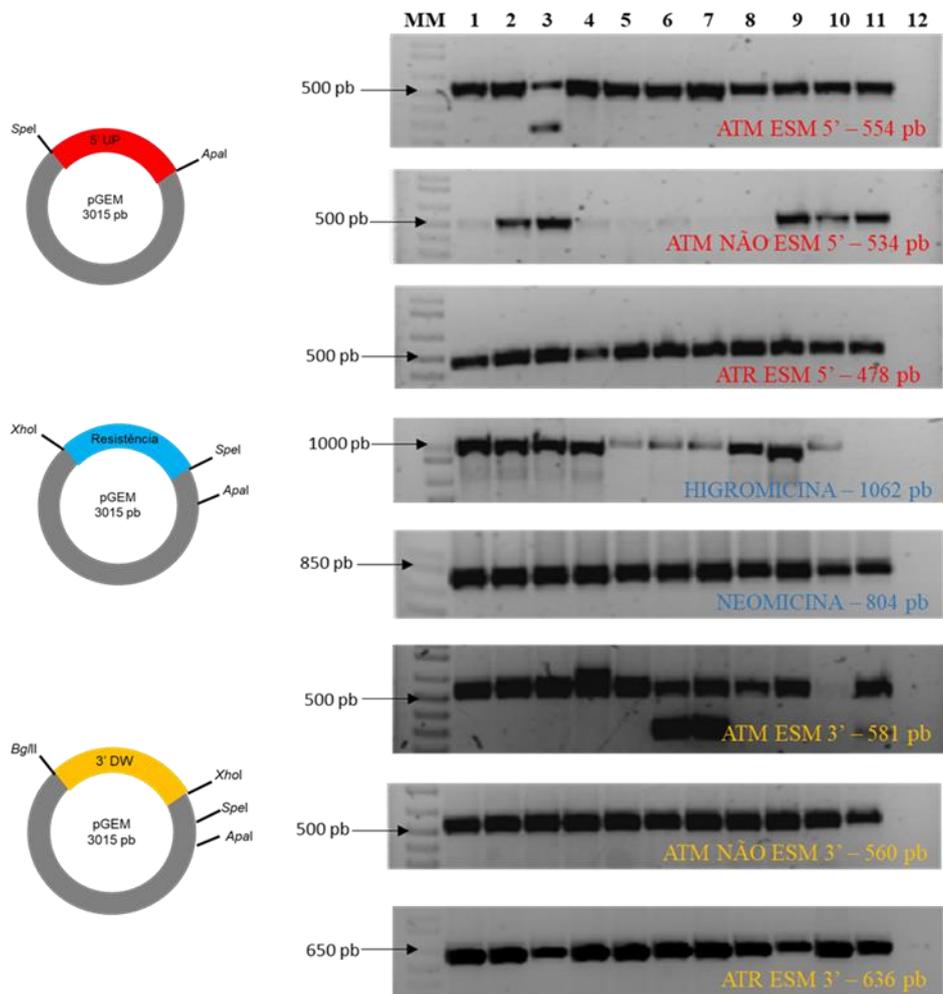
em banco de dados da cepa híbrida CL Brener. Isto torna possível a deleção isolada de uma das cópias de cada gene. O primeiro passo na construção dos cassetes foi a amplificação dos genes de resistência, higromicina e neomicina, e das regiões 5' UP e 3' DW à ORF dos genes alvos (Figura 10).



**Figura 10:** Amplificação dos fragmentos de interesse para montagem do cassete de deleção. Acima esquema mostrando as regiões intergênicas amplificadas. A esquerda, gel de agarose 1% dos produtos de amplificação obtidos da análise do genoma de *T. cruzi* CL Brener com os iniciadores ATM Esmeraldo-like 5'UP (1), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP (2), ATM Esmeraldo-like 3' DW (3), ATM Não Esmeraldo-like 3' DW (4), ATR Esmeraldo-like 5' UP (5) e ATR Esmeraldo-like 3' DW (6). A direita, gel de agarose 1% dos produtos de amplificação obtidos da análise do genoma de *T. cruzi* CL Brener WT com os iniciadores Higromicina (1) e Neomicina (4), do genoma de *T. cruzi* CL Brener resistente a higromicina B com os iniciadores Higromicina (2) e Neomicina (5) e do genoma de *T. cruzi* CL Brener resistente a G418 com os iniciadores Higromicina (3) e Neomicina (6). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Os produtos de PCR obtidos foram, individualmente, ligados ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega). Após a transformação bacteriana por choque térmico, as colônias crescidas foram testadas por PCR de colônia (Figura 11). Os clones confirmados tiveram seu DNA plasmidial extraído.

Os plasmídeos contendo o gene de resistência foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *SpeI* (Fermentas). Entretanto, apenas o plasmídeo contendo neomicina

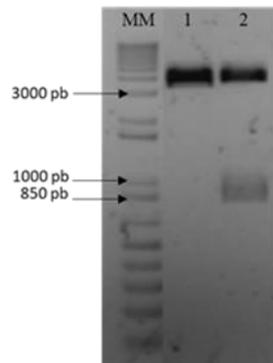


**Figura 11:** PCR de colônia. Gel de agarose 1% do produto de amplificação de colônias obtidas após transformação. Para todos os géis, colônias testadas (1 a 10), controle positivo (11) e reação sem DNA (12). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

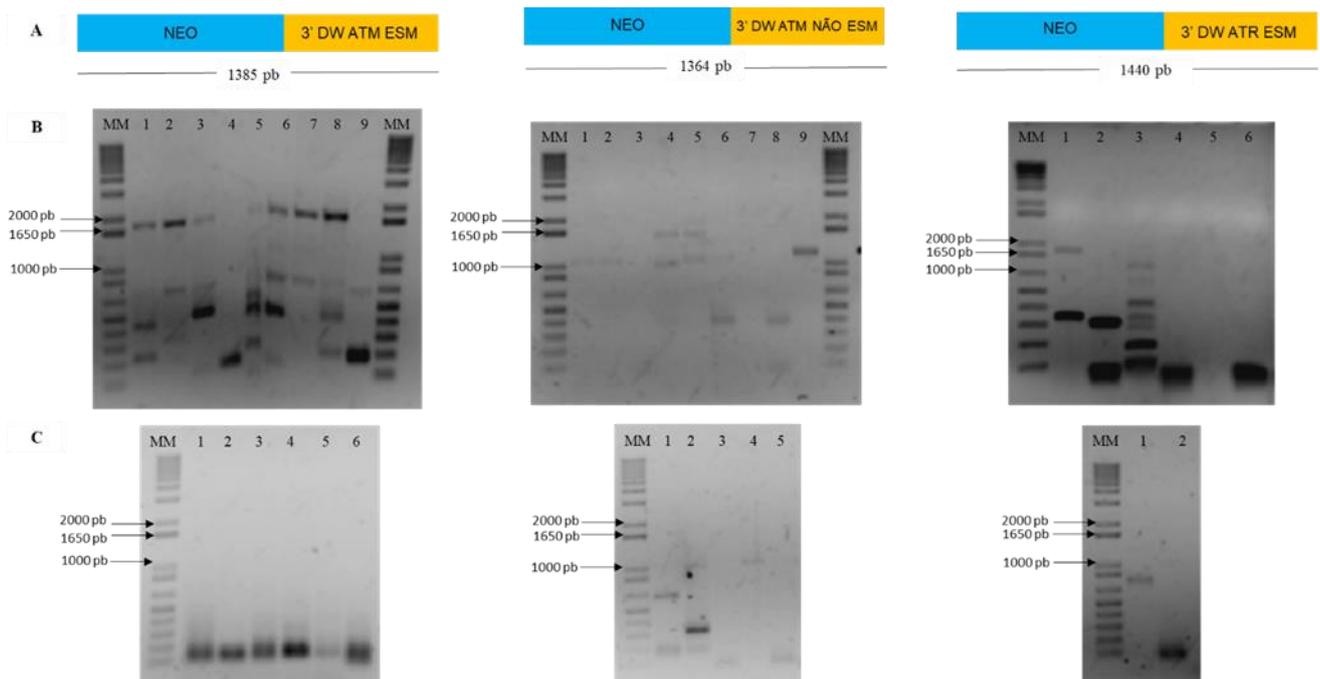
liberou o fragmento no tamanho esperado (Figura 12). Assim, este fragmento foi purificado do gel de agarose e ligado aos plasmídeos contendo a região 3' DW, que também foram digeridos com estas enzimas e purificados.

O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias termocompetentes. As colônias obtidas foram testadas por PCR de colônia (Figura 13B). Contudo, não foi possível selecionar colônias com amplicon apenas no tamanho esperado. Apesar da amplificação inespecífica, algumas destas colônias foram escolhidas para a extração de DNA plasmidial (Figura 13C). Após várias tentativas, não foi possível comprovar a

correta ligação entre o gene de resistência e a região intergênica 3'DW nos clones selecionados. Assim, esta estratégia de montagem dos cassetes foi abandonada.



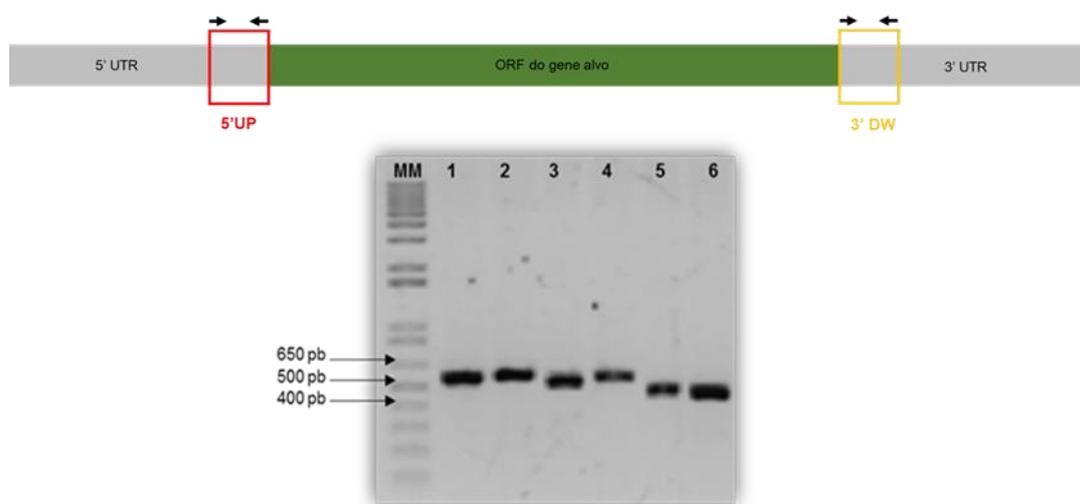
**Figura 12:** Digestão dos plasmídeos contendo os genes de resistência. Gel de agarose 1% da digestão dos plasmídeos contendo o gene de resistência à higromicina (1) ou neomicina (2) com as enzimas *XhoI* e *SpeI* (Fermentas). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).



**Figura 13:** Verificação da ligação entre o fragmento 3' DW e o gene de resistência à neomicina. A) Esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a ligação entre os fragmentos. B) Gel de agarose 1% da análise do produto de amplificação de colônias obtidas após transformação bacteriana. C) Gel de agarose 1% da análise do produto de amplificação dos plasmídeos extraídos de algumas das colônias selecionadas na PCR de colônia. Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

### 4.3. Montagem dos cassetes de deleção total no vetor pTc2KO

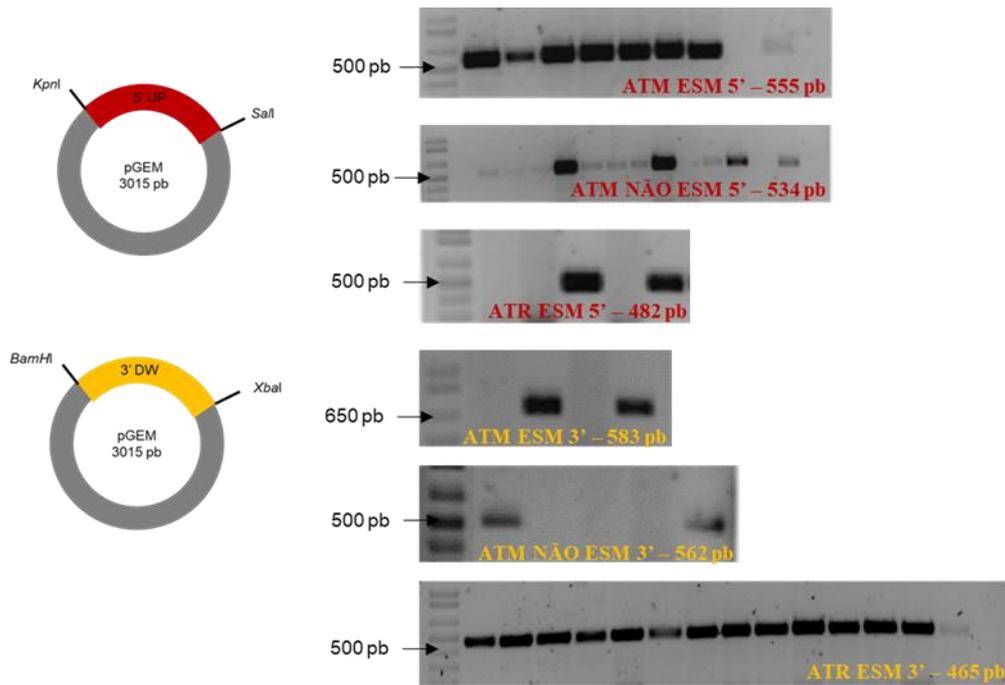
A segunda estratégia para montar os cassetes de deleção fez uso do vetor pTc2KO, que já contém os genes de resistência à higromicina ou neomicina e sítios de restrição próximos ao marcador de seleção, permitindo a clonagem das regiões 5' UP e 3' DW dos genes de interesse. Para iniciar a construção dos cassetes, as regiões 5' UP e 3' DW à ORF dos genes alvos foram amplificadas (Figura 14).



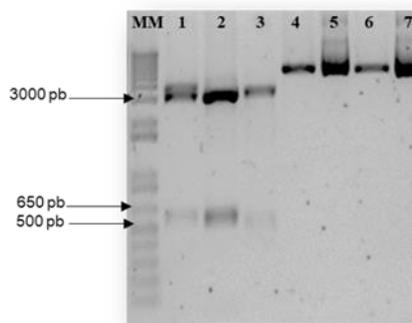
**Figura 14:** Amplificação das regiões intergênicas dos genes ATM e ATR. Acima esquema mostrando as regiões intergênicas amplificadas. Gel de agarose 1% dos produtos de amplificação obtidos da análise do genoma de *T. cruzi* CL Brener com os iniciadores ATM Esmeraldo-like 5' UP (1), ATM Esmeraldo-like 3' DW (2), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP (3), ATM Não Esmeraldo-like 3' DW (4), ATR Esmeraldo-like 5' UP (5) e ATR Esmeraldo-like 3' DW (6). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Os produtos de PCR obtidos foram ligados ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega). As colônias crescidas após a transformação bacteriana por choque térmico foram testadas por PCR de colônia (Figura 15), sendo que os clones confirmados tiveram seu DNA plasmidial extraído.

Os clones contendo a região intergênica 5' UP e os plasmídeos pTc2KO foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI* (Promega) (Figura 16). Após a diges-

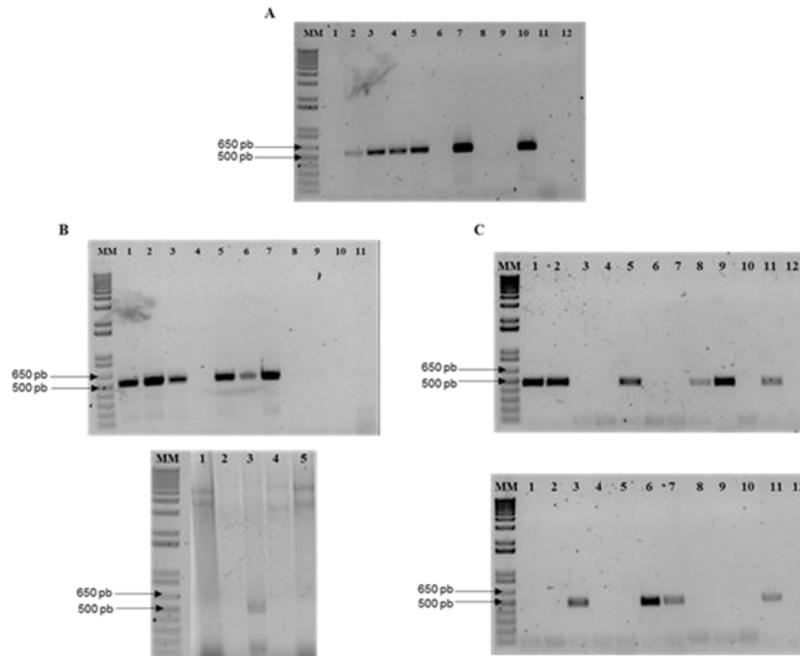


**Figura 15:** PCR de colônia. Gel de agarose 1% do produto de amplificação de colônias obtidas após transformação. Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).



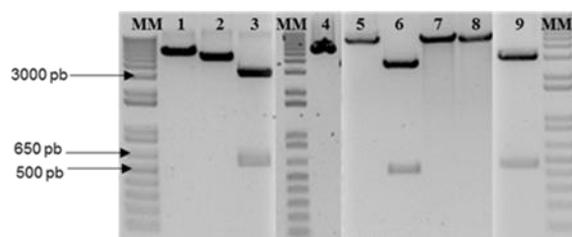
**Figura 16:** Digestão com as enzimas *KpnI* e *SalI*. Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *KpnI* e *SalI* dos plasmídeos ATM Esmeraldo-like 5' UP clone 1 (1), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP clone 5 (2), ATR Esmeraldo-like 5' UP clone 3 (3), pTc2KO Higo (4) e pTc2KO Neo (6). As canaletas 5 e 7 são referentes, respectivamente, aos vetores pTc2KO Higo e pTc2KO Neo não digeridos. Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

tão, os fragmentos liberados foram purificados e ligados. As colônias crescidas após a transformação foram testadas por PCR de colônia (Figura 17). As colônias confirmadas tiveram seu DNA plasmidial extraído. Em seguida, os clones contendo a região intergêni-

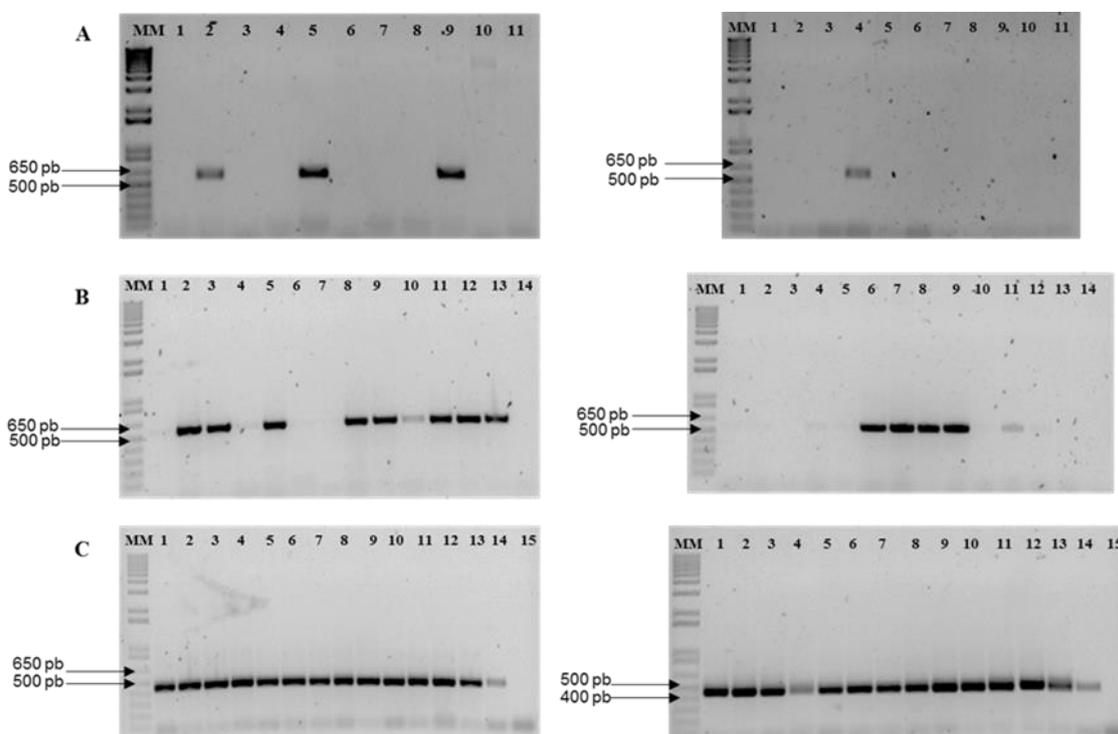


**Figura 17:** PCR de colônia. A) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 5' UP do gene ATM Esmeraldo-like, da análise de colônias obtidas após transformação. Clones com resistência à higromicina (1 a 5), clones com resistência à neomicina (6-10), controle positivo (11), reação sem DNA (12). B) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 5' UP do gene ATM Não Esmeraldo-like, da análise de colônias obtidas após transformação. Painel de cima: clones com resistência à higromicina (1 a 10), reação sem DNA (11). Painel de baixo: clones com resistência à neomicina (1 a 5). C) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 5' UP do gene ATR Esmeraldo-like, da análise de colônias obtidas após transformação. Painel de cima: clones com resistência à higromicina (1 a 10), controle positivo (11), reação sem DNA (12). Painel de baixo: clones com resistência à neomicina (1 a 10), controle positivo (11), reação sem DNA (12). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

ca 5' UP inserida nos plasmídeos pTc2KO e os clones contendo a região intergênica 3' DW foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*II (Promega) (Figura 18). Após a digestão, os fragmentos liberados foram purificados e ligados. As colônias obtidas após a transformação foram testadas por PCR de colônia (Figura 19).

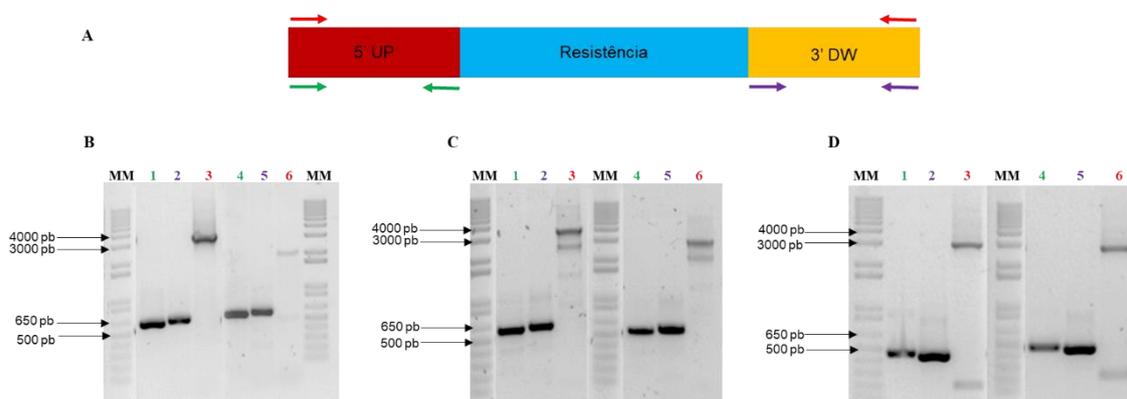


**Figura 18:** Digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I. Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I dos plasmídeos ATM Esmeraldo-*like* 5' UP - Higro clone 4 (1), ATM Esmeraldo-*like* 5' UP - Neo clone 4 (2), ATM Esmeraldo-*like* 3' DW clone 2 (3), ATM Não Esmeraldo-*like* 5' UP - Higro clone 1 (4), ATM Não Esmeraldo-*like* 5' UP - Neo clone 3 (5), ATM Não Esmeraldo-*like* 3' DW clone 1 (6), ATR Esmeraldo-*like* 5' UP - Higro clone 2 (7), ATR Esmeraldo-*like* 5' UP - Neo clone 6 (8), ATR Esmeraldo-*like* 3' DW clone 13 (9). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).



**Figura 19:** PCR de colônia. A) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 3' DW do gene ATM Esmeraldo-*like*, da análise de colônias obtidas após transformação. Pannel da esquerda indica clones com resistência à higromicina, enquanto o pannel da direita indica clones com resistência à neomicina. B) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 3' DW do gene ATM Não Esmeraldo-*like*, da análise de colônias obtidas após transformação. Pannel da esquerda indica clones com resistência à higromicina, enquanto o pannel da direita indica clones com resistência à neomicina. C) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores para a região 3' DW do gene ATR Esmeraldo-*like*, da análise de colônias obtidas após transformação. Pannel da esquerda indica clones com resistência à higromicina, enquanto o pannel da direita indica clones com resistência à neomicina. Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

A construção do cassete resultou em um gene de resistência à higromicina ou neomicina flanqueado pelas regiões intergênicas 5' *upstream* e 3' *downstream* dos genes ATM e ATR, o que foi confirmado por reações de PCR (Figura 20).

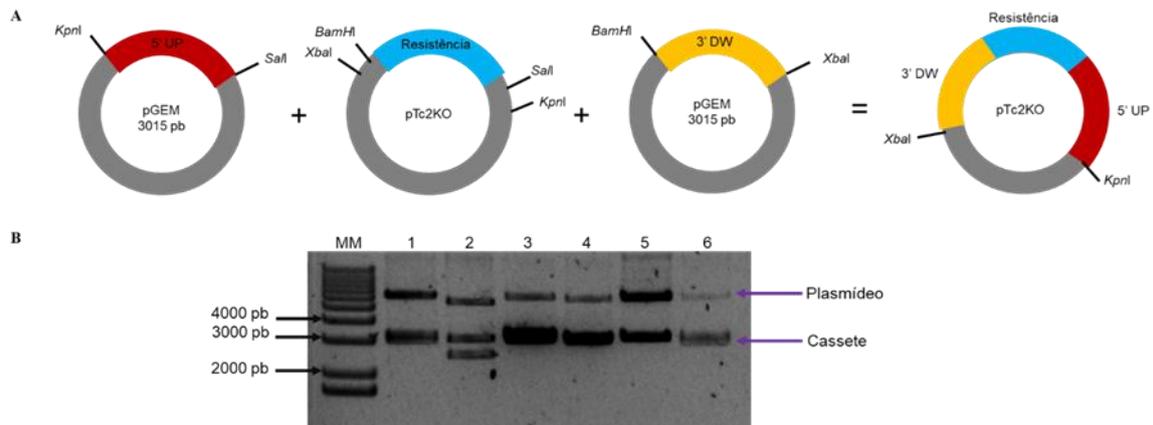


**Figura 20:** PCR com os plasmídeos para confirmar a construção dos cassetes de deleção total. A) Esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a construção do cassete de deleção. B) Gel de agarose 1% da análise do cassete montado para ATM Esmeraldo-*like*. ATM Esm 5' – Higo – ATM Esm 3' clone 5 (1 a 3), e ATM Esm 5' – Neo – ATM Esm 3' clone 4 (4 a 6). C) Gel de agarose 1% da análise do cassete montado para ATM Não Esmeraldo-*like*. ATM Não Esm 5' – Higo – ATM Não Esm 3' clone 8 (1 a 3) e ATM Não Esm 5' – Neo – ATM Não Esm 3' clone 9 (4 a 6). D) Gel de agarose 1% da análise do cassete montado para ATR Esmeraldo-*like*. ATR Esm 5' – Higo – ATR Esm 3' clone 1 (1 a 3) e ATR Esm 5' – Neo – ATR Esm 3' clone 2 (4 a 6). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

O cassete foi liberado do plasmídeo pTc2KO por meio da digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI* (Figura 21). O produto da digestão foi precipitado e utilizado para transfectar parasitos selvagens *T. cruzi* da cepa CL Brener.

#### 4.4. Reação de PCR com os parasitos selecionados para detectar e localizar o cassete de deleção total

Após a transfecção, foi possível selecionar duas culturas: a transfectada com o cassete ATM Não Esmeraldo-*like* resistente à neomicina (chamada de ATM +/-) e com o

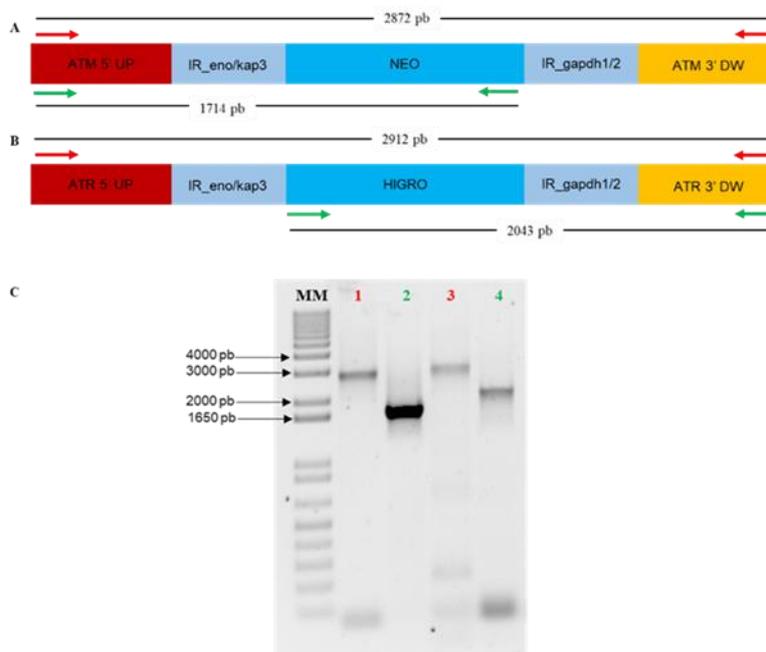


**Figura 21:** Digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI* para liberação do cassete de deleção total. A) Esquema da construção do cassete de deleção e sua liberação do plasmídeo pTc2KO. B) Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *KpnI* e *XbaI* dos plasmídeos ATM Esm 5'- Higro – ATM Esm 3' clone 5 (1), ATM Esm 5'- Neo – ATM Esm 3' clone 4 (2), ATM Não Esm 5'- Higro – ATM Não Esm 3' clone 8 (3), ATM Não Esm 5'- Neo – ATM Não Esm 3' clone 9 (4), ATR Esm 5'- Higro – ATR Esm 3' clone 1 (5) e ATR Esm 5'- Neo – ATR Esm 3' clone 2 (6). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

cassete ATR Esmeraldo-like resistente à higromicina (chamada de ATR +/-). O DNA genômico destes parasitos foi utilizado em reações de PCR para verificar a presença do cassete de deleção total nas culturas obtidas (Figura 22). As bandas amplificadas no gel confirmam que o cassete está presente nos parasitos selecionados.

Para confirmar que o cassete sofreu recombinação homóloga no local esperado e substituiu o gene alvo pelo gene de resistência, foram desenhados iniciadores para realizar uma reação de PCR de localização do cassete (Figura 23A). Nesta reação, o iniciador *forward* hibridiza com a região 5' *upstream* do gene alvo, em um sítio anterior ao utilizado no processo de clonagem. Um dos iniciadores *reverse* hibridiza com uma região interna dos genes ATM ou ATR, enquanto o outro se hibridiza com a região interna dos genes de resistência à higromicina ou neomicina. Assim, esta reação permite distinguir entre o alelo selvagem intacto e o alelo interrompido, bem como determinar se o cassete foi inserido na posição genômica desejada. Após várias tentativas não foi possível

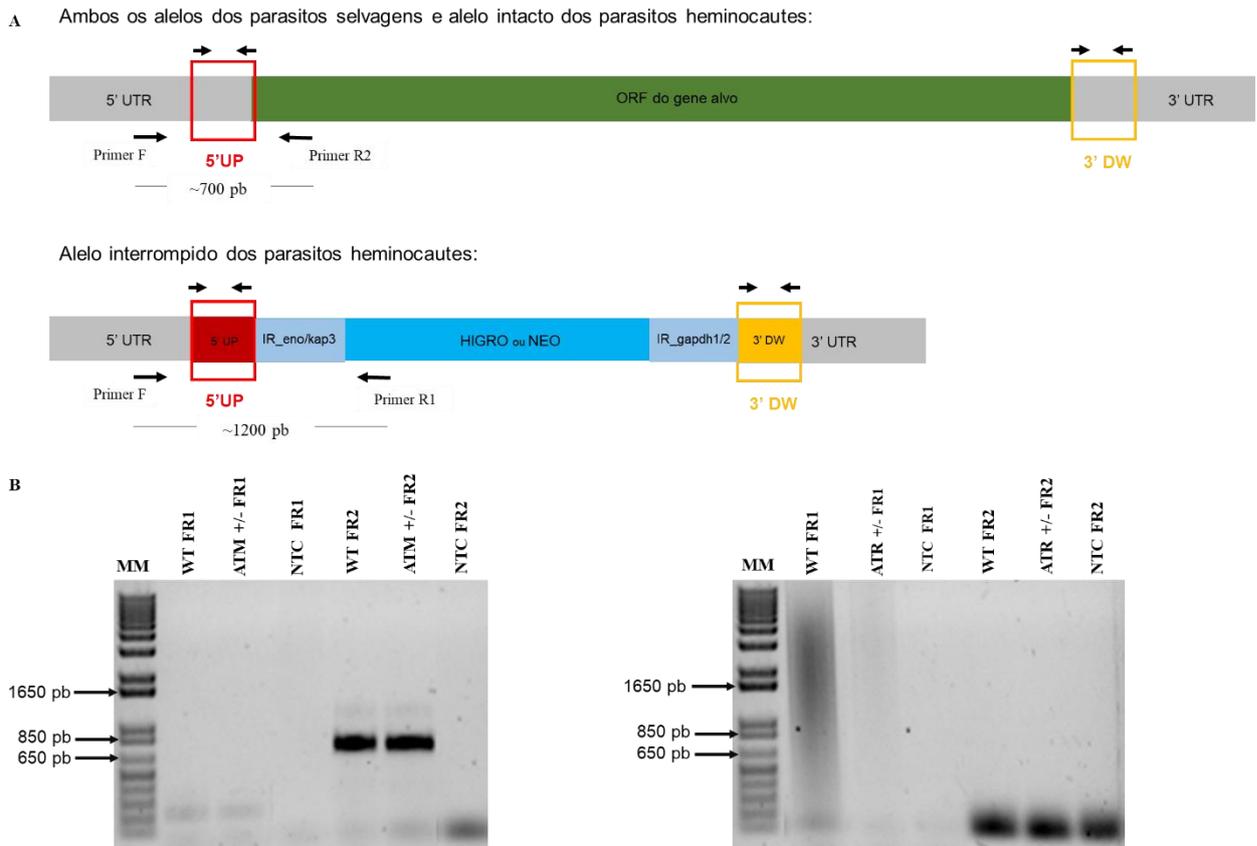
localizar a região de inserção do cassete de deleção nos parasitos selecionados (Figura 23B).



**Figura 22:** PCR com os DNAs genômicos das culturas selecionadas após a transfecção para confirmar a presença dos cassetes de deleção total. A) Esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a presença do cassete de deleção nas culturas ATM +/- . B) Esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a presença do cassete de deleção nas culturas ATR +/- . C) Gel de agarose 1% da análise do DNA genômico das culturas depletadas para ATM Não Esmeraldo-like (1 e 2) e ATR Esmeraldo-like (3 e 4). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

#### 4.5. Análise do número de cópias e nível de expressão por RT-qPCR

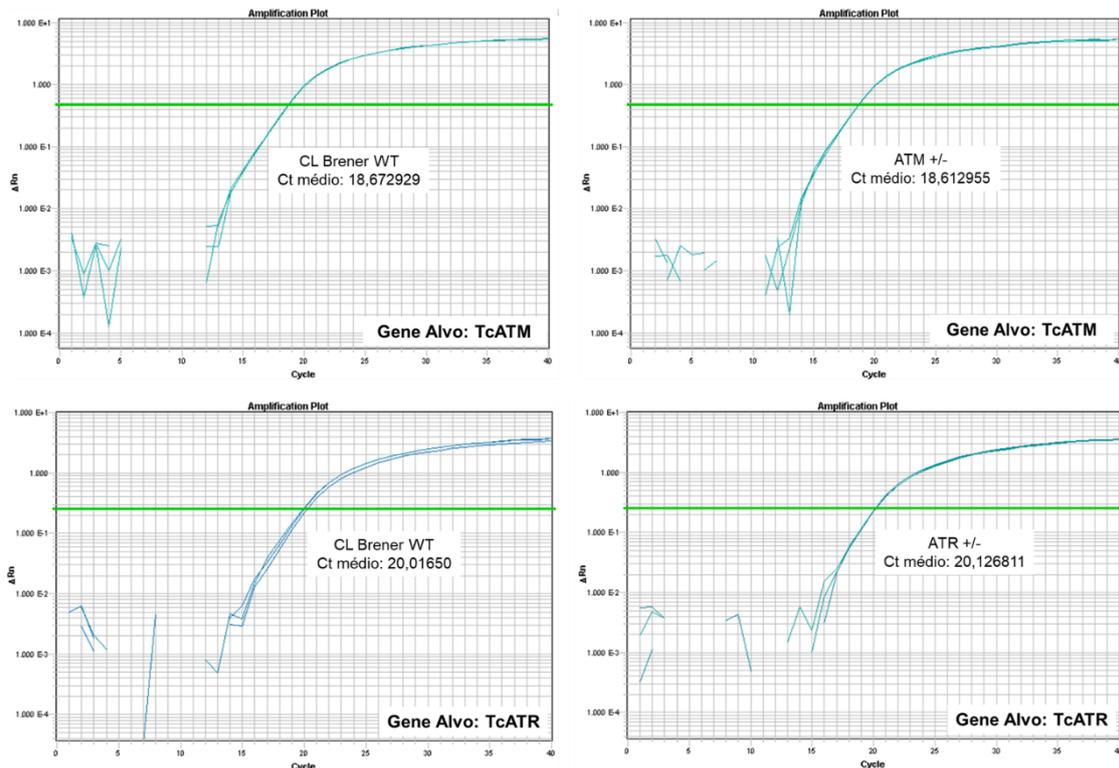
Mesmo não sendo possível determinar a correta inserção do cassete de deleção nos parasitos selecionados, foi realizada uma reação de PCR em tempo real utilizando como molde o DNA genômico. Esta reação permite comparar o número de cópias do gene alvo presente na cultura selvagem e nas culturas tranfectadas, sendo esperado que os parasitos tranfectados amplifiquem o gene alvo alguns ciclos depois da amplificação dos parasitos selvagens. No entanto, para ambos os genes testados, as células ATM+/- e ATR+/- apresentaram o valor de Ct (*Cycle threshold*) similar ao apresentado pelo WT, o



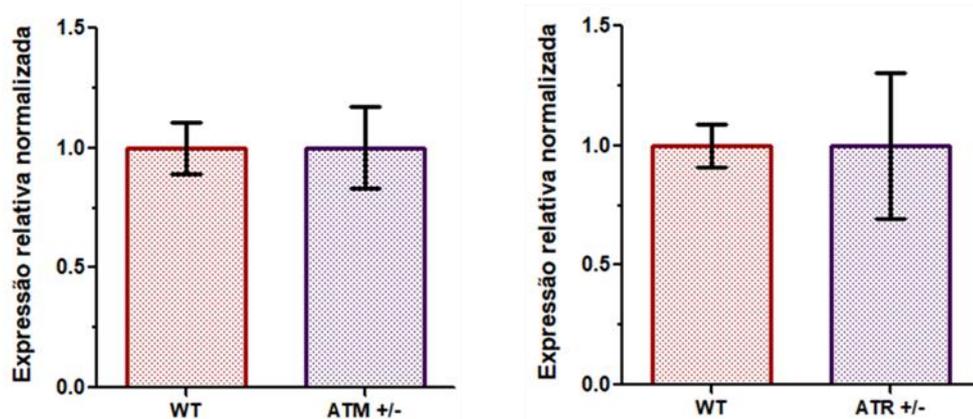
**Figura 23:** PCR para localização dos cassetes de deleção total nas culturas selecionadas após a transfecção. A) Esquema das reações de PCR realizadas para localizar a região de inserção do cassete de deleção. B) Gel de agarose 1% da análise do DNA genômico das culturas depletadas para ATM Não Esmeraldo-*like* e ATR Esmeraldo-*like*. NTC é a reação de PCR realizada sem molde de DNA. Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

que indica que as culturas testadas apresentam o mesmo número de cópias dos genes TcATM e TcATR (Figura 24).

Para determinar o nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes, foi realizada uma reação de RT-qPCR tendo como molde o cDNA sintetizado a partir do mRNA total extraído destas células. O método do  $\Delta\Delta C_t$  foi utilizado para fazer a quantificação relativa da expressão gênica, que mostrou que as células ATM $^{+/-}$  e ATR $^{+/-}$  possuem a mesma quantidade de transcritos alvos que as células selvagens (Figura 25).



**Figura 24:** Análise do número de cópias dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes. Para comparar o número de cópias dos genes alvos nas culturas WT, ATM $+/$ - ou ATR $+/$ - foram realizadas reações de RT-qPCR utilizando como molde o DNA genômico destas células. Para ambos os genes testados, o início da amplificação foi muito semelhante entre as culturas selvagens e mutantes, indicando que elas possuem o mesmo número de cópias dos genes alvos.

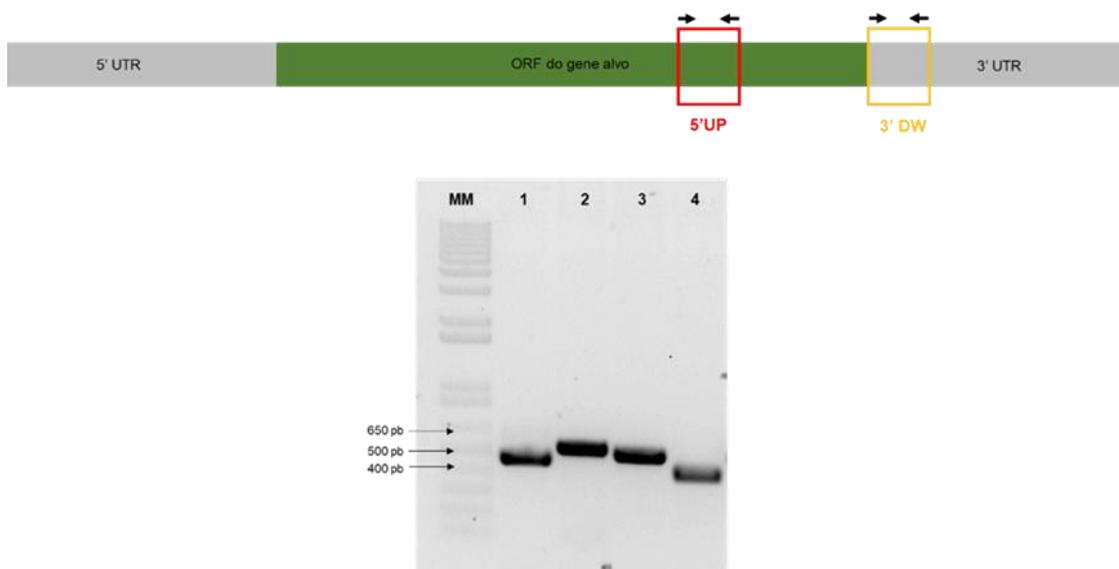


**Figura 25:** Análise do nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes. Quantificação relativa das células WT, ATM $+/$ - e ATR $+/$ -, mostrando que não houve diminuição da expressão de TcATM e TcATR.

Os parasitos selecionados após a transfecção parecem ter incorporado o cassete de deleção em uma outra região, o que permitiu a manutenção da expressão gênica de TcATM e TcATR. Portanto, tais parasitos foram descartados.

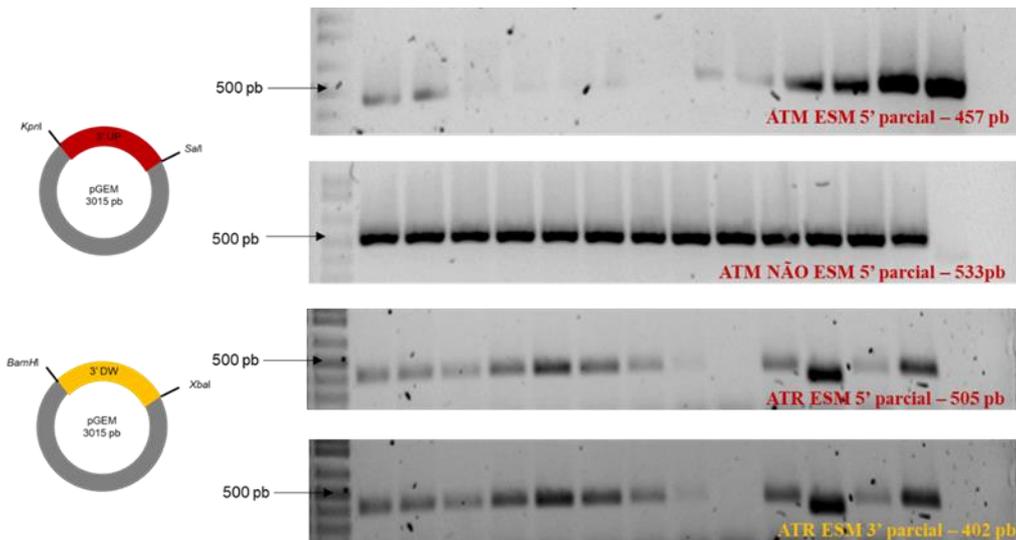
#### 4.6. Montagem dos cassetes de deleção parcial no vetor pTc2KO

Após várias tentativas de transfecção, com o cassete para a deleção dos genes TcATM e TcATR inteiros, não foi possível selecionar corretamente parasitos heminocautes. Dessa forma, foi testada uma terceira abordagem, na qual o cassete deleta apenas a região que codifica para o domínio cinase. A construção deste novo cassete de deleção foi iniciada com a amplificação por PCR das regiões a montante e a jusante da porção gênica a ser deletada (Figura 26).



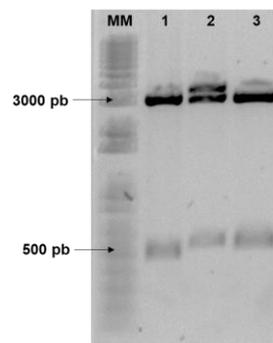
**Figura 26:** Amplificação dos fragmentos de interesse para montagem do cassete de deleção parcial. Acima esquema mostrando as regiões amplificadas. Gel de agarose 1% dos produtos de amplificação obtidos da análise do genoma de *T. cruzi* CL Brener com os iniciadores ATM Esmeraldo-like 5'UP parcial (1), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP parcial (2), ATR Esmeraldo-like 5' UP parcial (3) e ATR Esmeraldo-like 3' DW parcial (4). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Os produtos de PCR obtidos foram ligados ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega). As colônias crescidas após a transformação bacteriana por choque térmico foram testadas por PCR de colônia (Figura 27), sendo que os clones confirmados tiveram seu DNA plasmidial extraído.



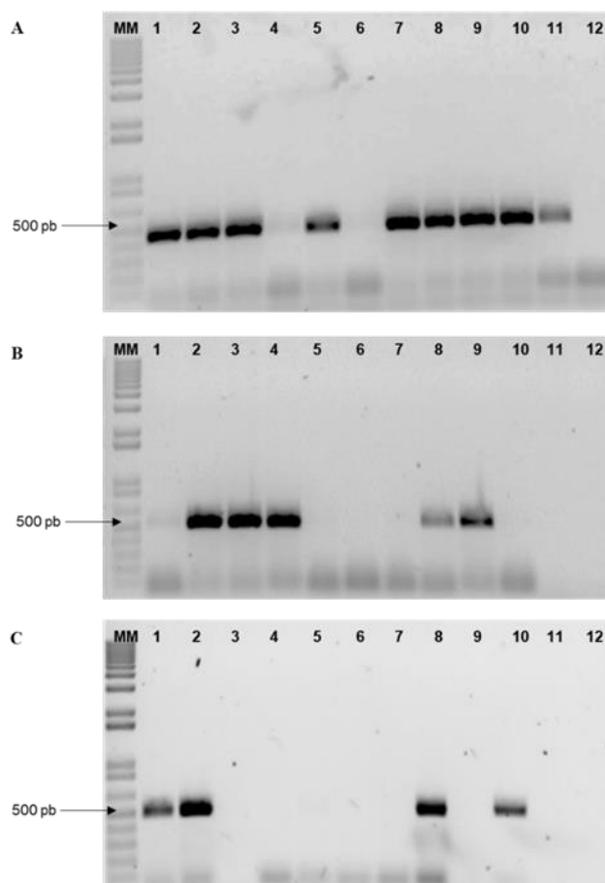
**Figura 27:** PCR de colônia. Gel de agarose 1% do produto de amplificação das colônias obtidas após transformação. Marcador molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Os plasmídeos pGEM contendo a região 5' UP e os plasmídeos pTc2KO foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI* (Promega) (Figura 28). Após a diges-



**Figura 28:** Digestão com as enzimas *KpnI* e *SalI*. Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *KpnI* e *SalI* dos plasmídeos ATM Esmeraldo-like 5' UP parcial clone 10 (1), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP parcial clone 1 (2), ATR Esmeraldo-like 5' UP parcial clone 6 (3). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

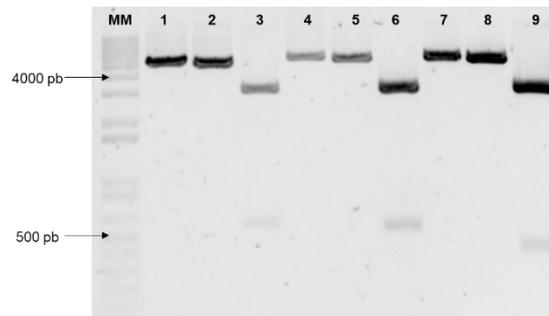
tão, os fragmentos liberados foram purificados e ligados. As colônias crescidas após a transformação bacteriana foram testadas por PCR de colônia (Figura 29). O DNA plasmidial dos clones confirmados foi extraído.



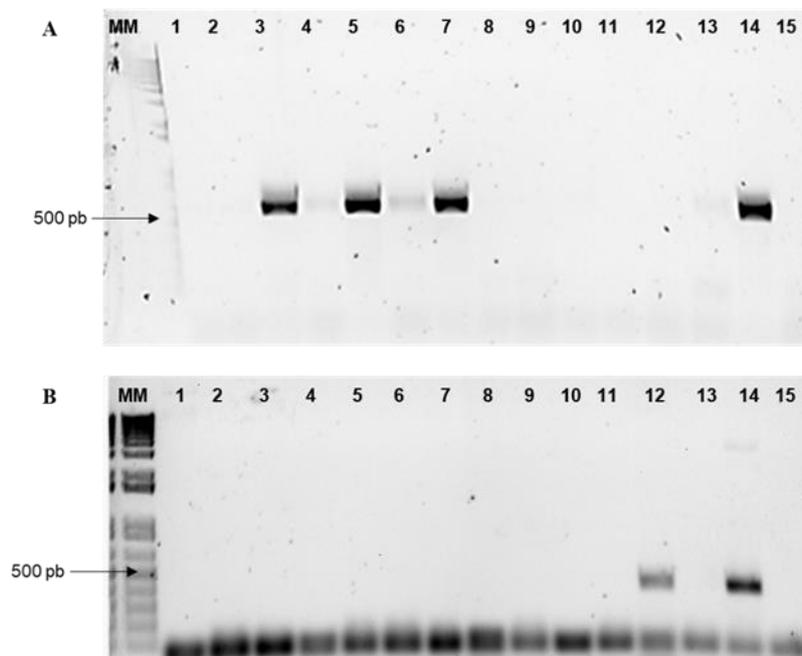
**Figura 29:** PCR de colônia. Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores ATM Esmeraldo-like 5' UP parcial (A), ATM Não Esmeraldo-like 5' UP parcial (B) ou ATR Esmeraldo-like 5' UP parcial (C), da análise de colônias obtidas após transformação. Em todos os géis, clones com resistência à higromicina (1 a 5), clones com resistência à neomicina (6-10), controle positivo (11), reação sem DNA (12). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Os plasmídeos pTc2KO contendo a região 5' UP inserida e os plasmídeos pGEM contendo a região intergênica 3' DW foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*II (Promega) (Figura 30). Após a digestão, os fragmentos liberados foram

purificados e ligados. As colônias crescidas após a transformação bacteriana por choque térmico foram testadas por PCR de colônia (Figura 31).

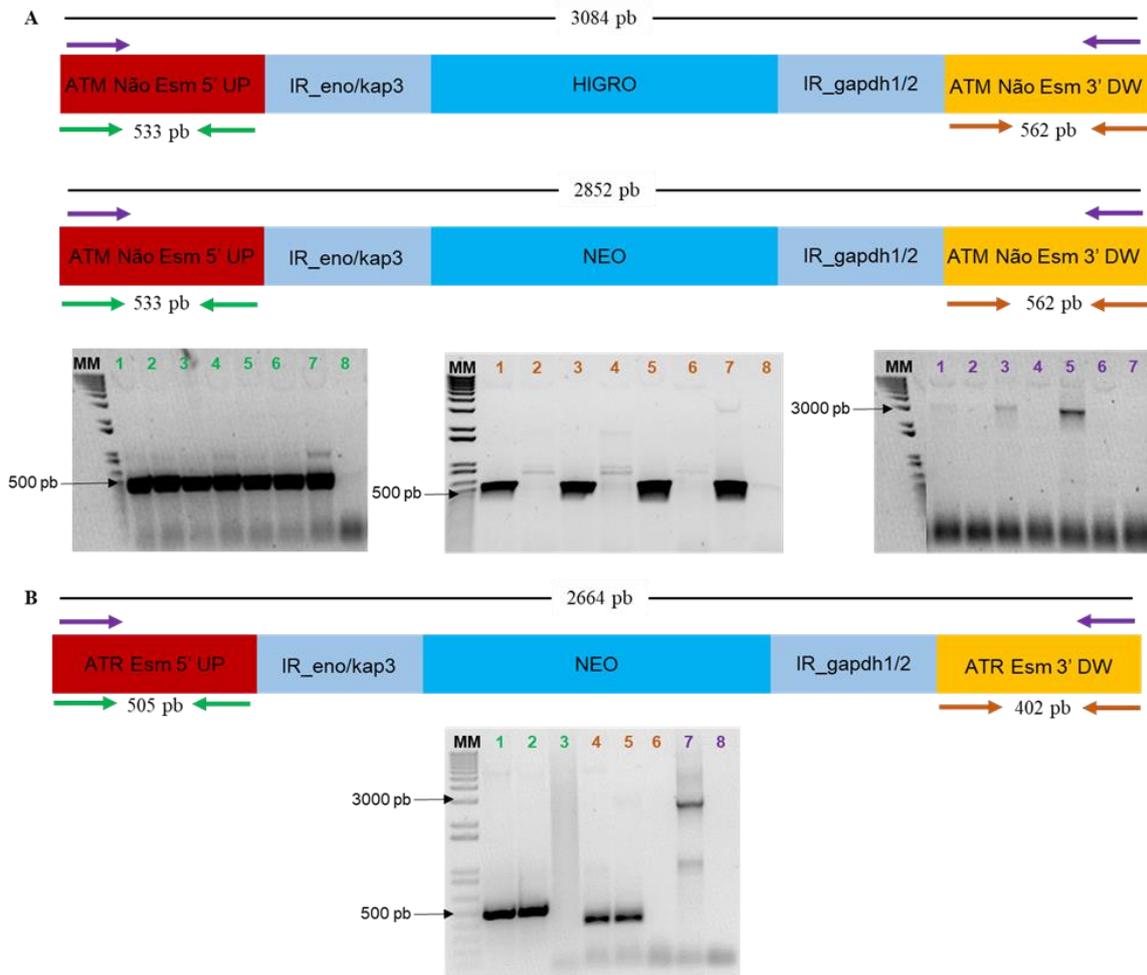


**Figura 30:** Digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I. Gel de agarose 1% do produto da digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I dos plasmídeos ATM Esmeraldo-*like* 5'UP-Higro clone 1 (1), ATM Esmeraldo-*like* 5'UP-Neo clone 2 (2), ATM Esmeraldo-*like* 3'DW clone 2 (3), ATM Não Esmeraldo-*like* 5'UP-Higro clone 3 (4), ATM Não Esmeraldo-*like* 5'UP-Neo clone 4 (5), ATM Não Esmeraldo-*like* 3'DW clone 1 (6), ATR Esmeraldo-*like* 5'UP-Higro clone 1 (7), ATR Esmeraldo-*like* 5'UP-Neo clone 5 (8), ATR Esmeraldo-*like* 3'DW clone 5 (9). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).



**Figura 31:** PCR de colônia. A) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores ATM Não Esmeraldo-*like* 3' DW, da análise de colônias obtidas após transformação. Clones com resistência à higromicina (1 a 6), clones com resistência à neomicina (7 a 13), controle positivo (14), reação sem DNA (15). B) Gel de agarose 1% do produto de amplificação, com os iniciadores ATR Esmeraldo-*like* 3' DW parcial, da análise de colônias obtidas após transformação. Clones com resistência à neomicina (1 a 13), controle positivo (14), reação sem DNA (15). Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

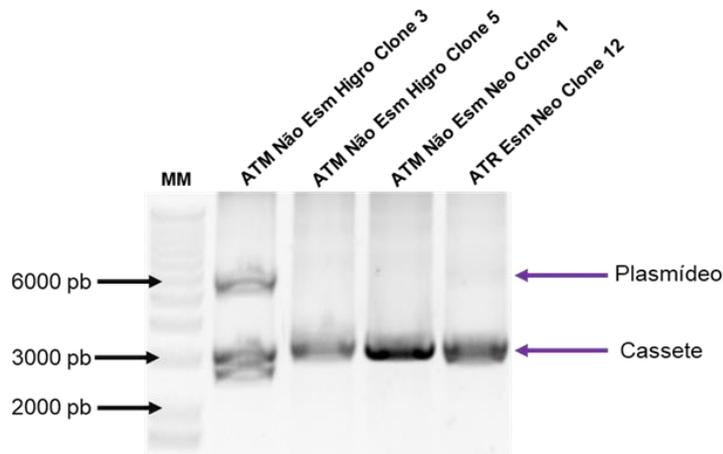
A completa construção do cassete para a deleção da porção final dos genes TcATM e TcATR foi confirmada por PCR com os plasmídeos obtidos após a inserção da região 3' DW (Figura 32).



**Figura 32:** PCR com os plasmídeos para confirmar a construção do cassete de deleção parcial. A) Acima, esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a construção do cassete de deleção para ATM Não Esmeraldo-like. Em baixo, gel de agarose 1% da análise dos plasmídeos ATM Não Esm 5' – Higo – ATM Não Esm 3' clone 3 (1), ATM Não Esm 5' – Higo – ATM Não Esm 3' clone 4 (2), ATM Não Esm 5' – Higo – ATM Não Esm 3' clone 5 (3), ATM Não Esm 5' – Higo – ATM Não Esm 3' clone 6 (4), ATM Não Esm 5' – Neo – ATM Não Esm 3' clone 1 (5), ATM Não Esm 5' – Neo – ATM Não Esm 3' clone 7 (6), controle positivo (7, nos dois géis da esquerda) e reação sem DNA (8, nos dois géis da esquerda e 7, no gel da direita). B) Acima, esquema das reações de PCR realizadas para confirmar a construção do cassete de deleção para ATR Esmeraldo-like. Em baixo, gel de agarose 1% da análise do plasmídeo ATR Esm 5' – Neo – ATR Esm 3' clone 12 (1, 4 e 7), controle positivo (2 e 5) e reação sem DNA (3, 6 e 8). Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).



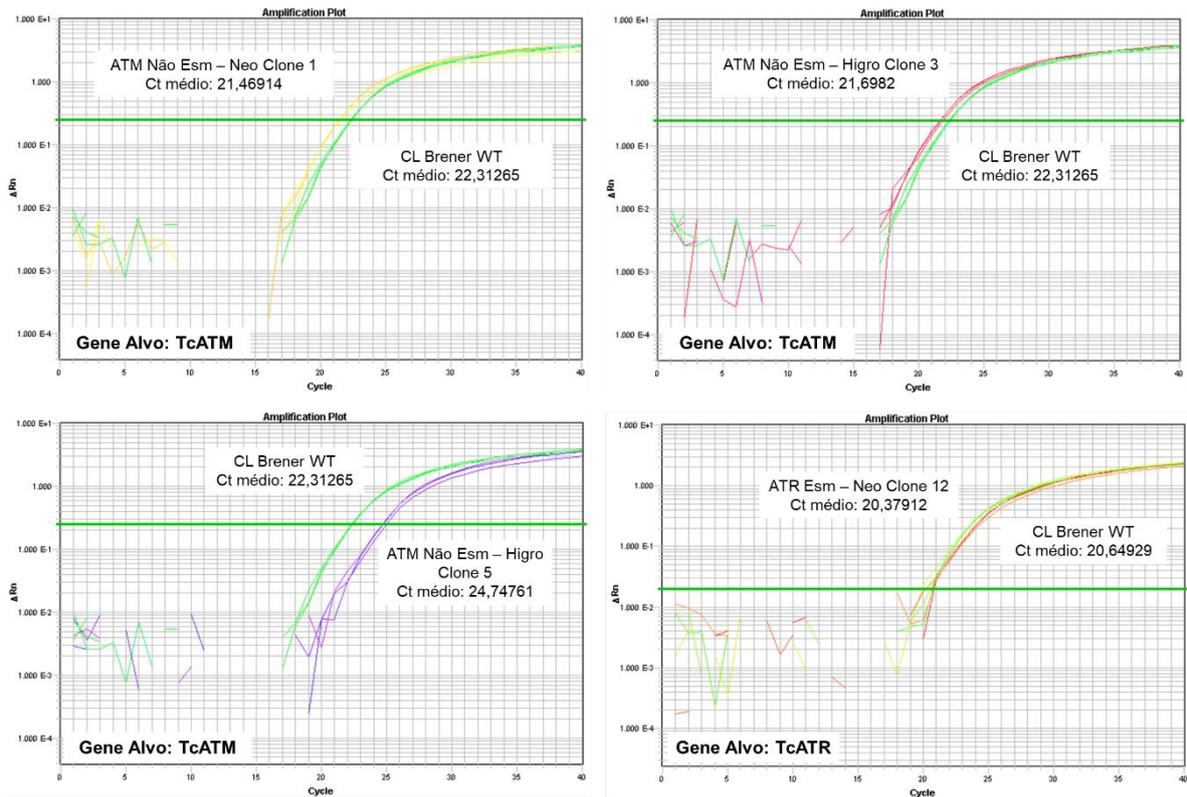




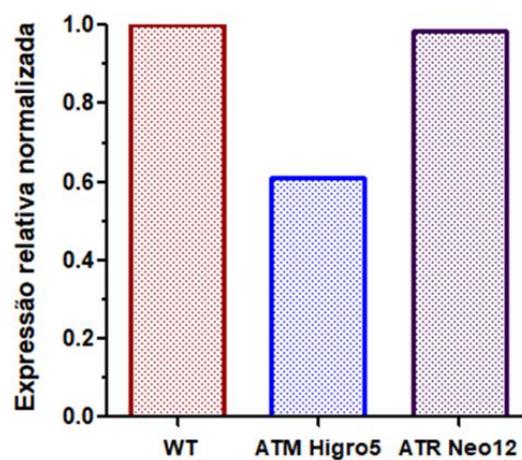
**Figura 34:** Digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI* para liberação do cassete de deleção parcial. Gel de agarose 0,6% do produto da digestão enzimática com as enzimas *KpnI* e *XbaI* dos plasmídeos ATM Não Esm 5'- Higo – ATM Não Esm 3' clone 3, ATM Não Esm 5'- Higo – ATM Não Esm 3' clone 5, ATM Não Esm 5'- Neo – ATM Não Esm 3' clone 1 e ATR Esm 5'- Neo – ATR Esm 3' clone 12. Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

O DNA genômico dos parasitos selecionados foi utilizado como molde na reação de RT-qPCR para verificar o número de cópias dos genes TcATM e TcATR nas células selvagens e mutantes. A análise da amplificação mostra que apenas os parasitos ATM Não Esmeraldo Higo clone 5 possuem um valor de Ct maior que o das células WT, o que sugere que esta cultura apresenta uma menor quantidade do gene TcATM (Figura 35).

Assim, o mRNA total das células WT, ATM Não Esmeraldo Higo clone 5 e ATR Esmeraldo Neo clone 12 foi extraído e utilizado como molde para a síntese de cDNA, o que permitiu a determinação do nível de expressão dos genes alvos por RT-qPCR. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ , o que mostrou que a cultura heminocaute para ATM possui um nível reduzido deste gene, em comparação aos parasitos selvagens. Por outro lado, a cultura heminocaute para ATR possui a mesma quantidade de transcritos alvos que as células WT (Figura 36). Para verificar o nível de expressão foram realizadas triplicatas técnicas, mas apenas uma répli-



**Figura 35:** Análise do número de cópias dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes. Para comparar o número de cópias dos genes alvos nas culturas selvagens e mutantes foram realizadas reações de RT-qPCR utilizando como molde o DNA genômico destas células. Apenas para ATM Não Esmeraldo Higo clone 5, o início da amplificação foi posterior ao de CL Brener WT, indicando que essa cultura possui um menor número de cópia de TcATM.



**Figura 36:** Análise do nível de expressão dos genes TcATM e TcATR nos parasitos heminocautes. Quantificação relativa das células selvagens e mutantes, mostrando que houve diminuição da expressão apenas de TcATM.

ca biológica foi testada. Assim, mais experimentos precisam ser realizados para se chegar a uma conclusão com significância estatística.

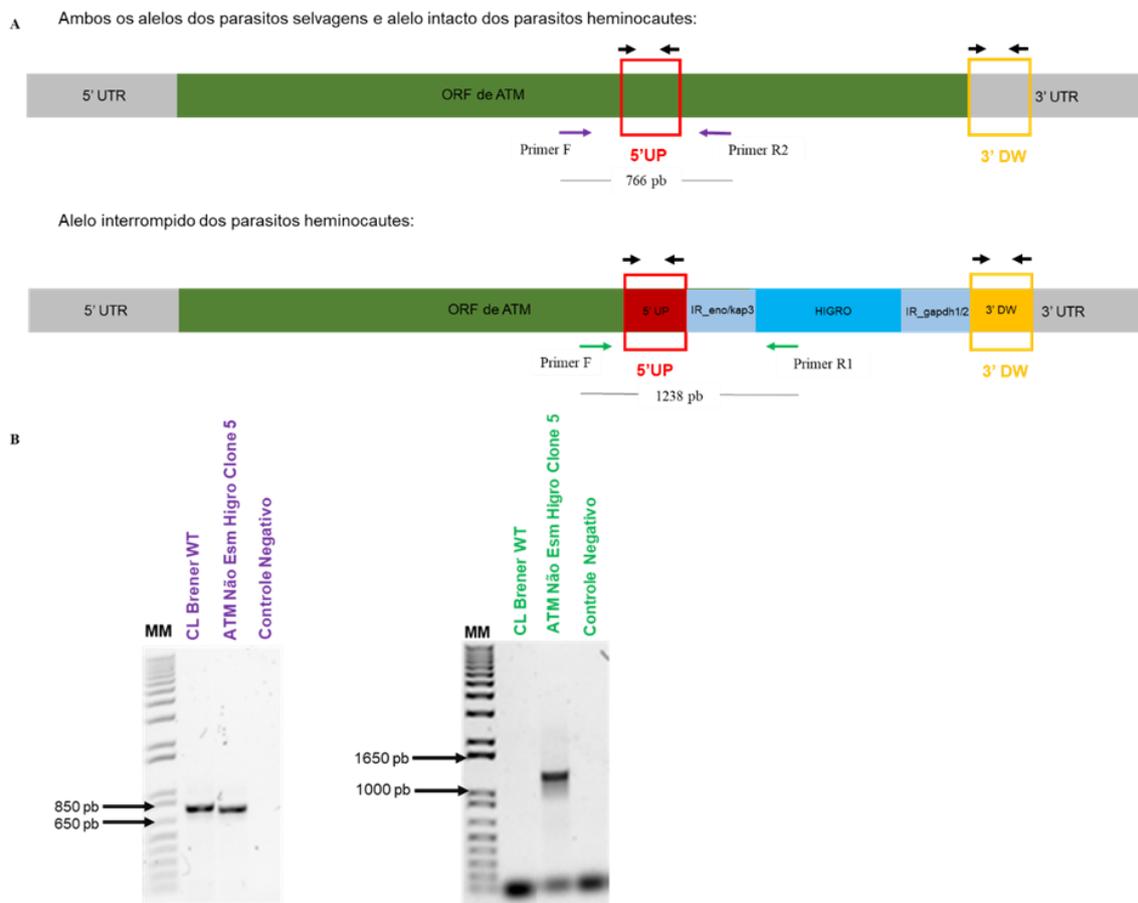
#### **4.8. Reação de PCR com a cultura selecionada para localizar o cassete de deleção parcial do gene TcATM**

Os resultados obtidos das reações de RT-qPCR sugerem que apenas a cultura ATM Não Esmeraldo Higro clone 5 apresenta um menor número de cópia de TcATM e possui um nível reduzido da expressão gênica deste gene. Assim, foi realizada uma reação de PCR, como descrita anteriormente, para verificar se o cassete de deleção parcial foi corretamente inserido no genoma destes parasitos. A análise do gel de agarose mostrou que estes parasitos amplificaram corretamente os fragmentos esperados, indicando uma correta inserção do cassete (Figura 37).

Os resultados obtidos indicam que a cultura ATM Não Esmeraldo Higro clone 5 é de fato um heminocaute para TcATM, o que permite a utilização destes parasitos para a caracterização funcional deste gene em *T. cruzi*.

#### **4.9. Curva de crescimento após a exposição à radiação gama**

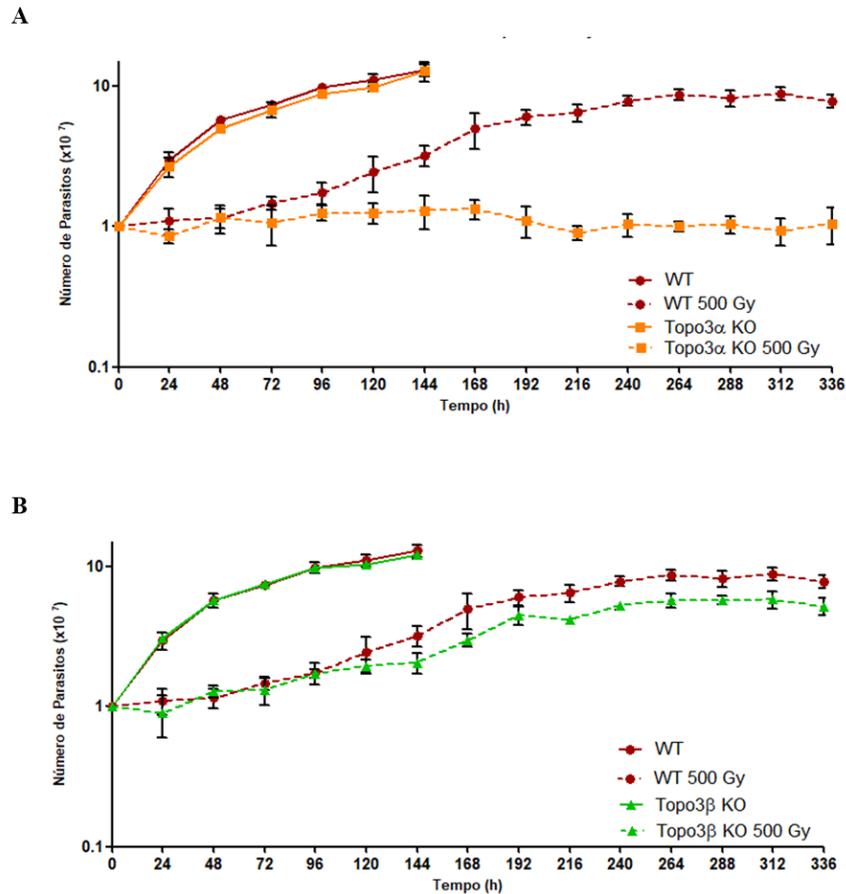
A radiação gama pode, diretamente ou por meio de radicais livres gerados, modificar a permeabilidade da membrana celular, alterar a estrutura e função de proteínas e enzimas e danificar o DNA. As lesões ao DNA causadas pelos raios gama variam desde oxidação de bases e formação de sítios AP até quebras de fita simples e de fita dupla. Muitos dos danos causados pela radiação gama são reparados gerando DSBs como estruturas intermediárias, o que aumenta este tipo de dano após a irradiação. O grande número e proximidade das lesões geradas pela radiação gama constituem um desafio para os mecanismos de reparo de DNA, causando instabilidade genômica (Sage e Shikazono,



**Figura 37:** PCR para localização do cassete de deleção parcial na cultura selecionada após a transfecção. A) Esquema das reações de PCR realizadas para localizar a região de inserção do cassete de deleção. B) Gel de agarose 1% da análise do DNA genômico das culturas selvagem e heminocaute para ATM Não Esmeraldo-like. Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen).

2017; Harrell *et al*, 2018). Dessa forma, para verificar o envolvimento das topoisomerasas  $3\alpha$  e  $3\beta$  no reparo de DBSs em *T. cruzi*, os parasitos selvagens e mutantes foram expostos a 500 Gy de radiação gama. Após a irradiação, as células WT, Topo $3\alpha$  KO e Topo $3\beta$  KO pararam o crescimento por alguns dias, em comparação com os parasitos não expostos à radiação gama (Figura 38). Com o passar do tempo, os parasitos WT e Topo $3\beta$  KO foram capazes de retomar o crescimento, enquanto as células Topo $3\alpha$  KO permaneceram paradas durante todo o tempo de análise do experimento. Tal resultado

sugere que a topoisomerase 3 $\alpha$  é necessária para o reparo de DSBs geradas após a irradiação em *T. cruzi*.

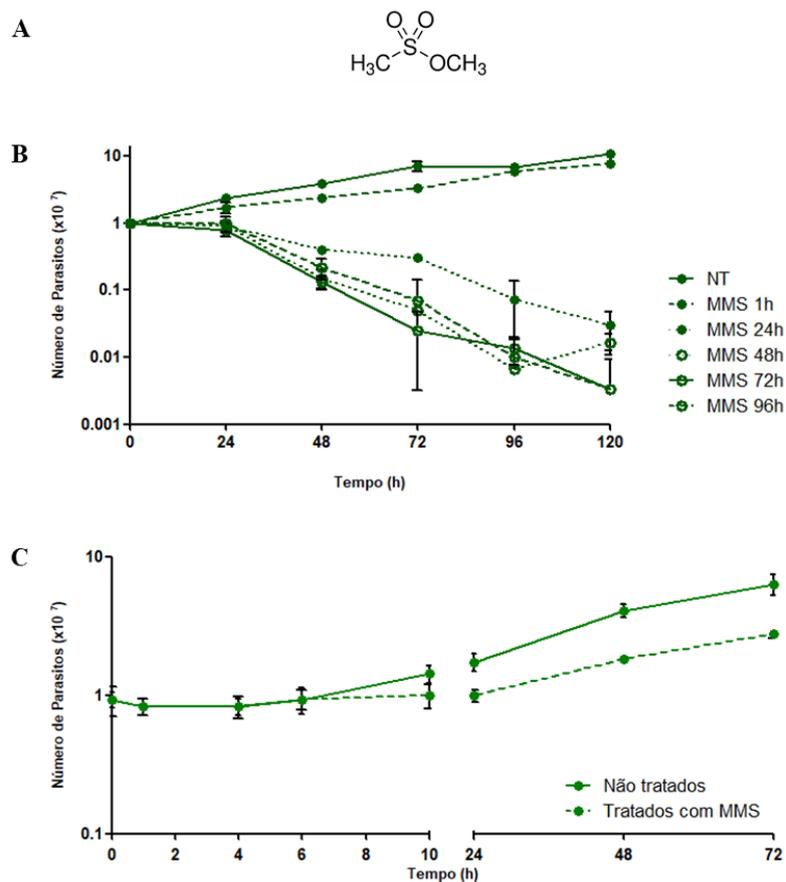


**Figura 38:** Curva de crescimento após radiação gama. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT) (A e B), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) (A) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) (B) após exposição a 500 Gy de radiação gama. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $1,0 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.10. Resposta ao estresse replicativo causado pelo MMS

O MMS é um agente alquilante capaz de metilar DNA fita simples ou dupla, gerando N3-metilimina, N1-metiladenina, N3-metiladenina, N7-metiladenina, N3-metilcitosina, N1-metilguanina, N3-metilguanina e N7-metilguanina. Algumas dessas modificações são capazes de parar o movimento das polimerases replicativas e, assim,

esses adutos bloqueiam a síntese de DNA (Wyatt e Pittman, 2006). Para verificar como o *T. cruzi* responde ao estresse replicativo causado pelo MMS, epimastigotas selvagens da cepa CL Brener foram tratadas com 1,5 mM deste agente alquilante por diferentes tempos (Figura 39). A exposição prolongada ao MMS causou a morte celular (Figura 39B). Por outro lado, o tratamento por apenas 1 hora retardou o crescimento dos parasitos, em comparação às células não tratadas. Posteriormente, os parasitos tratados por 1 hora foram capazes de retomar o crescimento celular (Figura 39C). Estes resultados mostram que o *T. cruzi* é sensível à parada da forquilha de replicação causada pelo MMS.

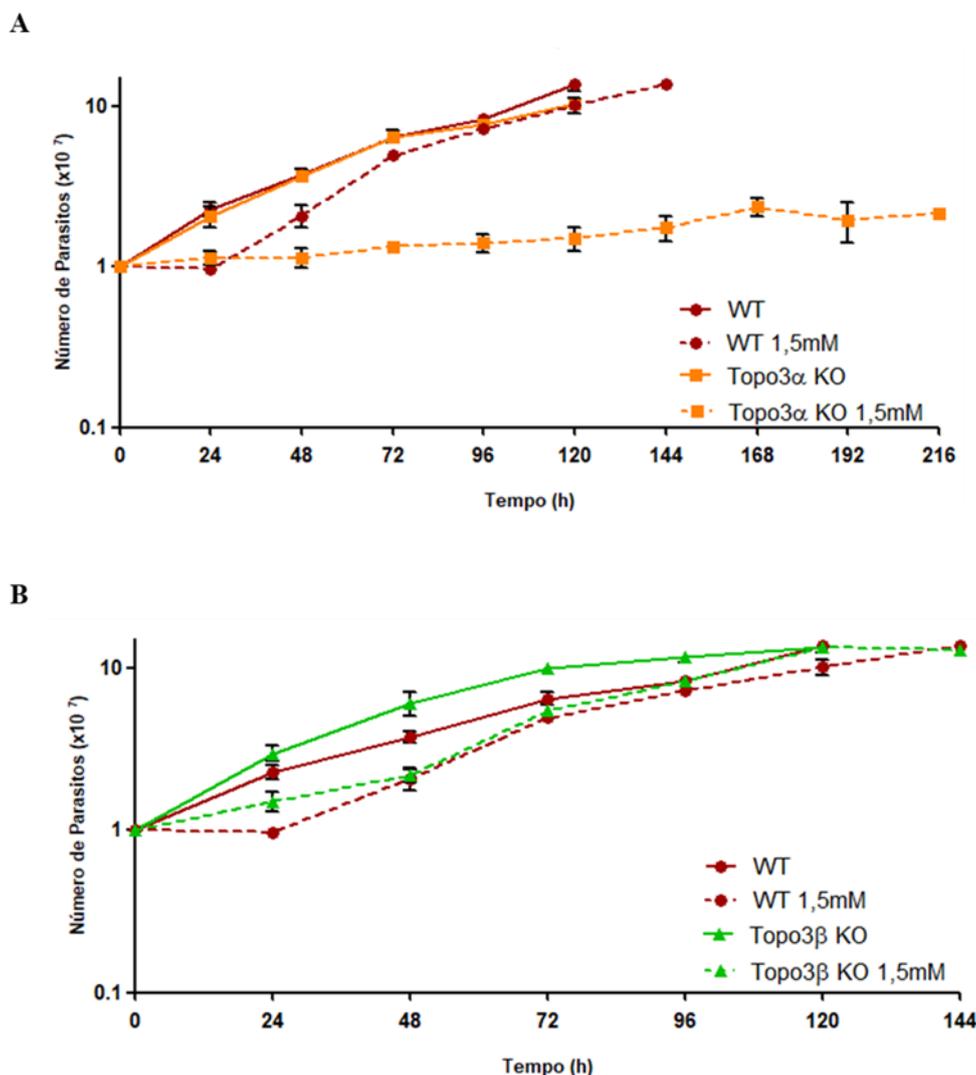


**Figura 39:** Curva de crescimento dos parasitos selvagens após o tratamento com MMS. A) Estrutura química do MMS. B) Avaliação do perfil de crescimento de *T. cruzi* WT após o tratamento com 1,5 mM de MMS em meio LIT por diferentes tempos. C) Avaliação do perfil de crescimento de *T. cruzi* WT após o tratamento com 1,5 mM de MMS em PBS por 1 hora a 28°C. Depois do tratamento, os parasitos foram cultivados em meio LIT e contados em câmara citométrica nos tempos indicados no gráfico. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Com a finalidade de estudar o papel dos genes das topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  durante o estresse replicativo em *T. cruzi*, as culturas de parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO foram submetidas ao tratamento com MMS. De forma similar ao observado com os parasitos CL Brener WT, no tempo de 24 horas, o tratamento com 1,5 mM de MMS por 1 hora provocou uma parada de crescimento das células testadas (Figura 40). No entanto, apenas os parasitos Topo3 $\alpha$  KO permaneceram parados nos tempos posteriores. Mesmo após um longo período de tempo, estes parasitos não retomaram o crescimento e não morreram, sugerindo que a topoisomerase 3 $\alpha$  é importante para lidar com as forquilhas de replicação paradas causadas pelo MMS em *T. cruzi*.

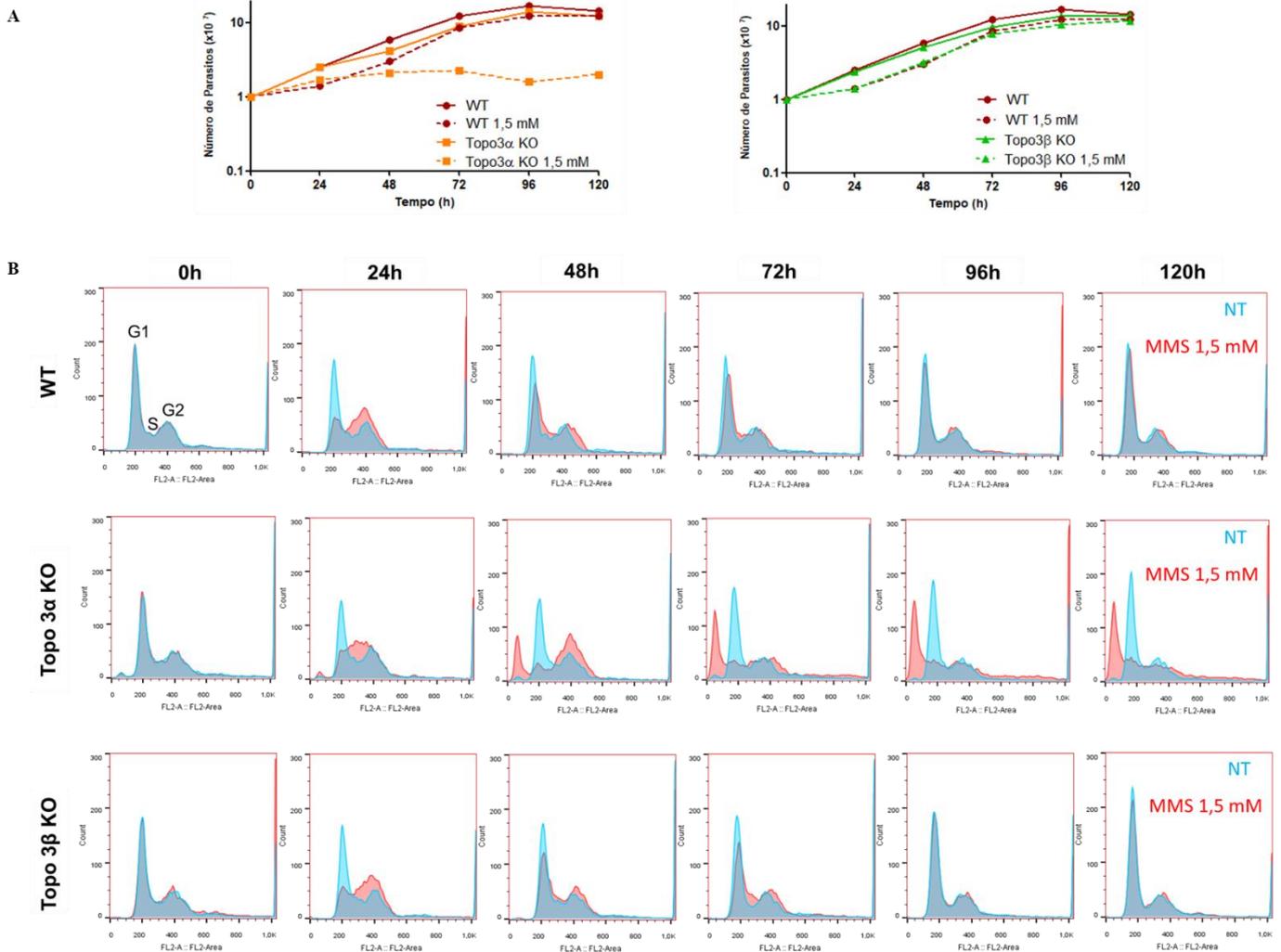
A análise por FACS mostra que o MMS altera a progressão do ciclo celular de *T. cruzi*, quando comparado com as células que não receberam tratamento (Figura 41). Para os três parasitos avaliados, o MMS provoca um acúmulo de células na fase S/G2 no tempo de 24 horas. Tanto WT quanto Topo3 $\beta$  KO são capazes de retomar a progressão normal do ciclo celular nos tempos posteriores. Já Topo3 $\alpha$  KO, no tempo de 48 horas, aumenta a quantidade de células na fase G2, o que sugere uma capacidade de retomada do ciclo celular. Contudo, estas células não são capazes de retomar a progressão normal do ciclo celular e se acumulam na fase sub-G1.

Como já mencionado, durante a DDR ocorre a fosforilação de um resíduo de serina da variante de histona H2AX, em células de mamíferos. Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* também foi observado que uma serina conservada presente na histona H2A é fosforilada em resposta a danos no DNA. Em *T. brucei*, a indução de DSBs promoveu um acúmulo, no sítio de dano de DNA, da histona H2A fosforilada no resíduo de treonina 130. Esta treonina foi identificada na cauda C-terminal da histona H2A dos outros tripanossomatídeos. Assim,  $\gamma$ H2A tem sido utilizada como um marcador da presença de dano no DNA nos tripanossomatídeos, como



**Figura 40:** Curva de crescimento após o tratamento com MMS. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT) (A e B), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) (A) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) (B) após o tratamento com 1,5 mM de MMS em PBS por 1 hora a 28°C. Depois do tratamento, os parasitos foram cultivados em meio LIT e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

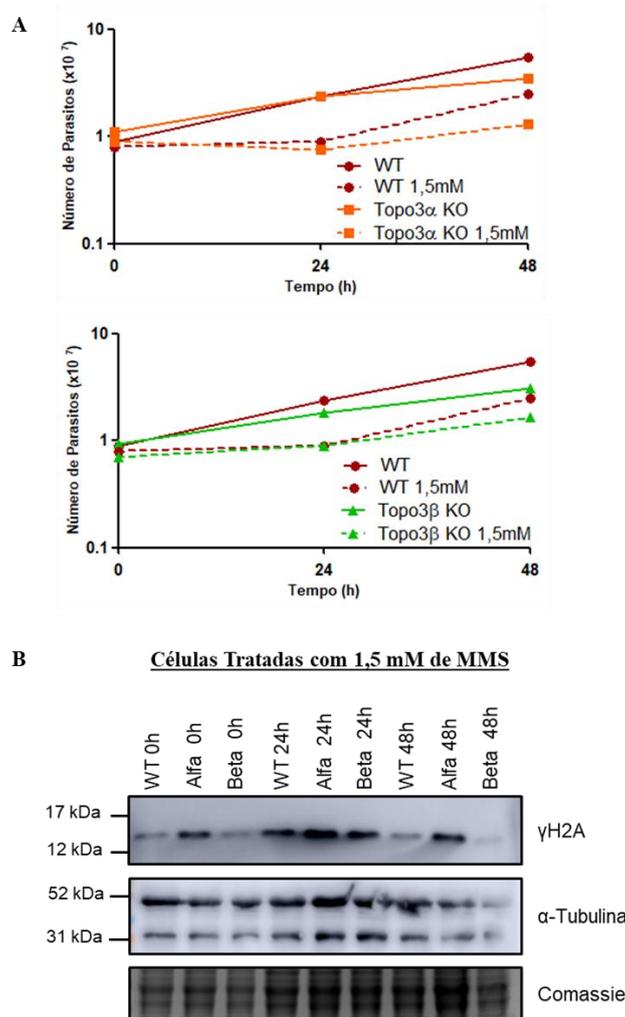
ocorre nos demais eucariotos (Glover e Horn, 2012). Para verificar se o fenótipo apresentado pelos parasitos TcTopo3 $\alpha$  KO após o tratamento com MMS é devido ao acúmulo de lesões no DNA não reparadas, 15  $\mu$ g de extrato total de proteína foi utilizado no Western blot com o anticorpo anti- $\gamma$ H2A. Como controle de carregamento foi utilizado o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina.



**Figura 41:** Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com MMS. A) As culturas selvagens (WT), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) foram tratadas com 1,5 mM de MMS por 1 hora. Os gráficos representam o perfil de crescimento dos parasitos durante o experimento. B) A cada 24 horas as amostras foram recolhidas e analisadas por FACS, após serem marcadas com iodeto de propídeo. Histograma representativo da progressão do ciclo celular. Em todos os histogramas, as curvas azuis representam as células não tratadas e as vermelhas referem-se as células expostas ao MMS. Foram realizados três experimentos independentes.

Para medir o nível de dano ao DNA causado por 1,5 mM de MMS, alíquotas foram recolhidas nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o tratamento. Todos os parasitos aumentam o nível de  $\gamma$ H2A 24 horas após o tratamento com MMS (Figura 42B). Apenas as células Topo3 $\alpha$  KO não são capazes de reduzir a fosforilação da histona no tempo de

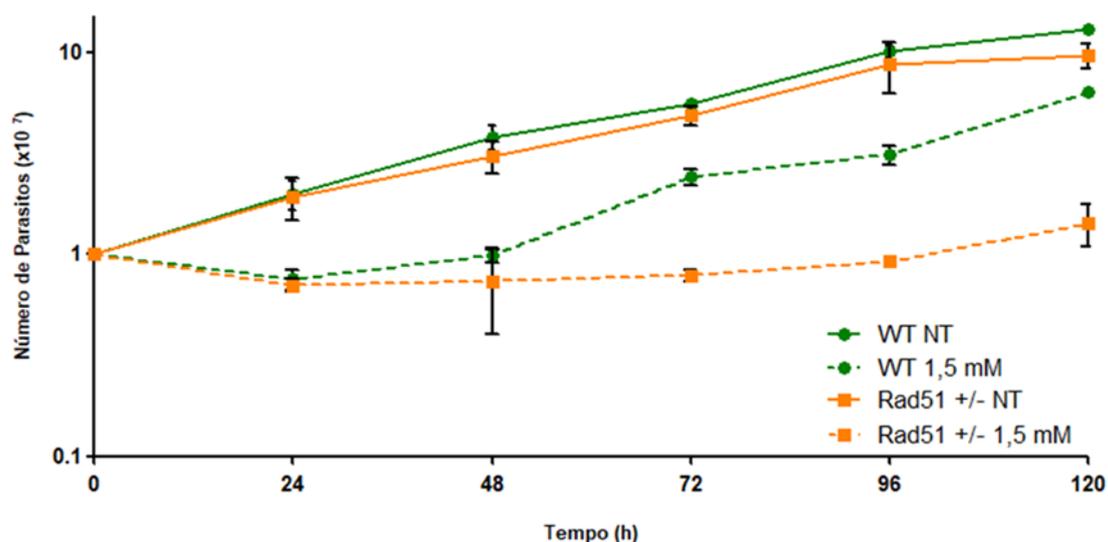
48 horas, sugerindo que a ausência desta topoisomerase impede o reparo das lesões causadas por MMS em *T. cruzi*.



**Figura 42:** Nível de dano no DNA após o tratamento com MMS. A) Gráficos do perfil de crescimento dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO durante o experimento. B) Membrana representativa do Western blot com anticorpo anti- $\gamma$ H2A com as células tratadas com MMS. Os três parasitos aumentaram os níveis de  $\gamma$ H2A 24 horas após o tratamento com MMS. No tempo de 48 horas, as células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de reparar os danos no DNA, enquanto os parasitas Topo3 $\alpha$  KO não conseguiram. O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado como controle de carregamento. Foram realizados três experimentos independentes.

Para verificar se as lesões causadas pelo MMS são reparadas pela via de recombinação homóloga, parasitos heminocutes para o gene TcRad51 também foram

tratados com este agente genotóxico. A exposição ao MMS provocou uma parada no crescimento tanto dos parasitos mutantes quanto dos parasitos selvagens por 24 horas. Como já visto anteriormente, após esse tempo, as células selvagens foram capazes de retomar o crescimento. Contudo, durante o tempo analisado, as células Rad51+/- permaneceram paradas (Figura 43). Este fenótipo, similar ao observado para os parasitos Topo3 $\alpha$  KO, sugere que a topoisomerase 3 $\alpha$  pode atuar no reparo por recombinação homóloga das DSBs geradas após a parada das forquilhas de replicação induzida por MMS em *T. cruzi*.



**Figura 43:** Curva de crescimento de Rad51+/- após o tratamento com MMS. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT) e heminocaute para TcRad51 (Rad51+/-) após o tratamento com 1,5 mM de MMS em PBS por 1 hora a 28°C. Depois do tratamento, os parasitos foram cultivados em meio LIT e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

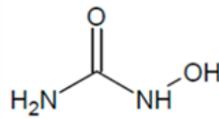
#### 4.11. Resposta ao estresse replicativo causado pela hidroxiureia

A HU é um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, que reduz a ribose presente nos ribonucleotídeos para formar os desoxirribonucleotídeos. Por catalisar uma etapa limitante na biossíntese dos quatro nucleotídeos precursores do DNA, a atividade desta enzima é finamente regulada ao longo do ciclo celular, atingindo seu nível máximo

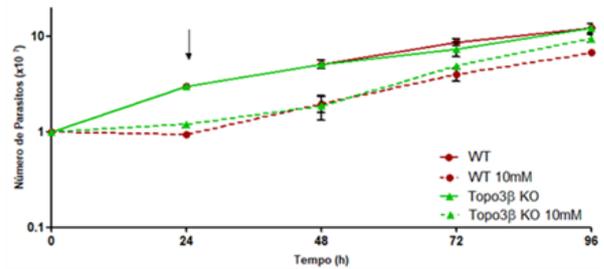
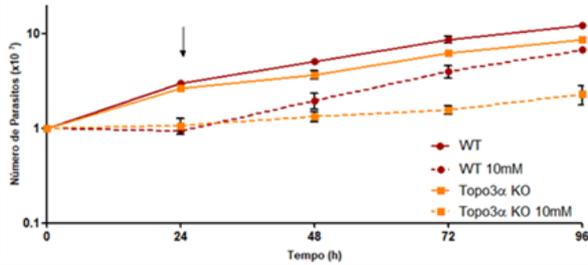
durante a fase S. Assim, a HU inibe a replicação do DNA e para o ciclo celular. Geralmente, o efeito causado pela HU é reversível após a sua remoção. Contudo, a utilização desta droga em altas concentrações ou por um período prolongado gera quebras no DNA devido à parada da DNA polimerase (Singh e Xu, 2016). O tratamento dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO com as doses de 10 mM, 20 mM ou 30 mM de HU por 24 horas parou o crescimento das três cepas estudadas, em comparação com as células não tratadas (Figura 44). Após a remoção da HU do meio de cultura, os parasitos WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de retomar o crescimento de maneira similar. Em contraste, as células Topo3 $\alpha$  KO permaneceram paradas por mais alguns dias e, então, voltaram a crescer. Assim, é possível sugerir que a topoisomerase 3 $\alpha$  é importante para resolver o estresse replicativo causado pela HU em *T. cruzi*.

Condizente com a parada de crescimento apresentada nas curvas, o tratamento com 20 mM de HU por 24 horas sincroniza os três parasitos na fase G1 do ciclo celular (Figura 45). A remoção da droga do meio de cultura permite que os parasitos WT e Topo3 $\beta$  KO retomem a progressão normal do ciclo celular. Por outro lado, no tempo de 48 horas, os parasitos Topo3 $\alpha$  KO apresentam uma maior quantidade de células na fase G2 e um pequeno acúmulo de células em sub-G1. Em concordância com a recuperação do crescimento, nos tempos posteriores, estes parasitos são capazes de retomar a progressão do ciclo celular, mas o pequeno acúmulo de células na fase sub-G1 é mantido. Um perfil semelhante foi observado após o tratamento com as doses de 10 mM e 30 mM de hidroxureia (Anexo 3). Estes resultados indicam o envolvimento da topoisomerase 3 $\alpha$  na resolução do estresse replicativo causado pela HU.

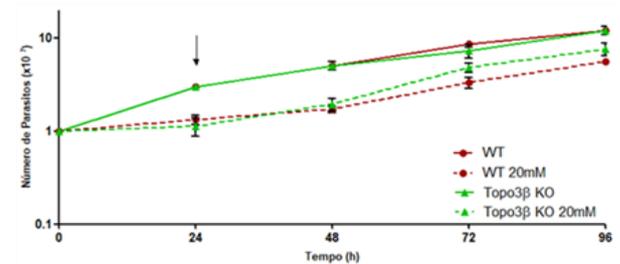
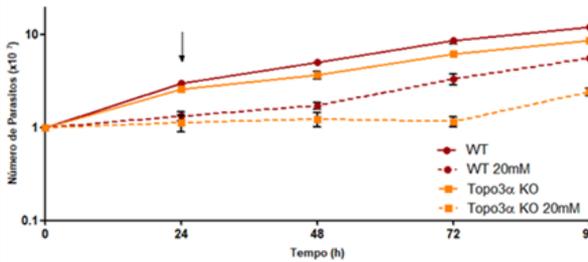
A



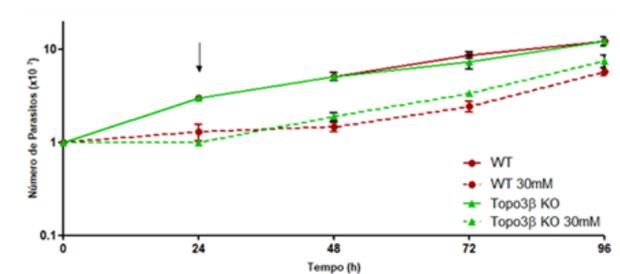
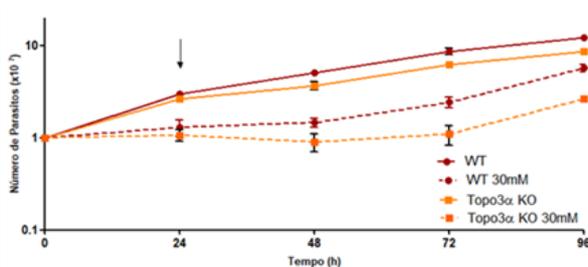
B



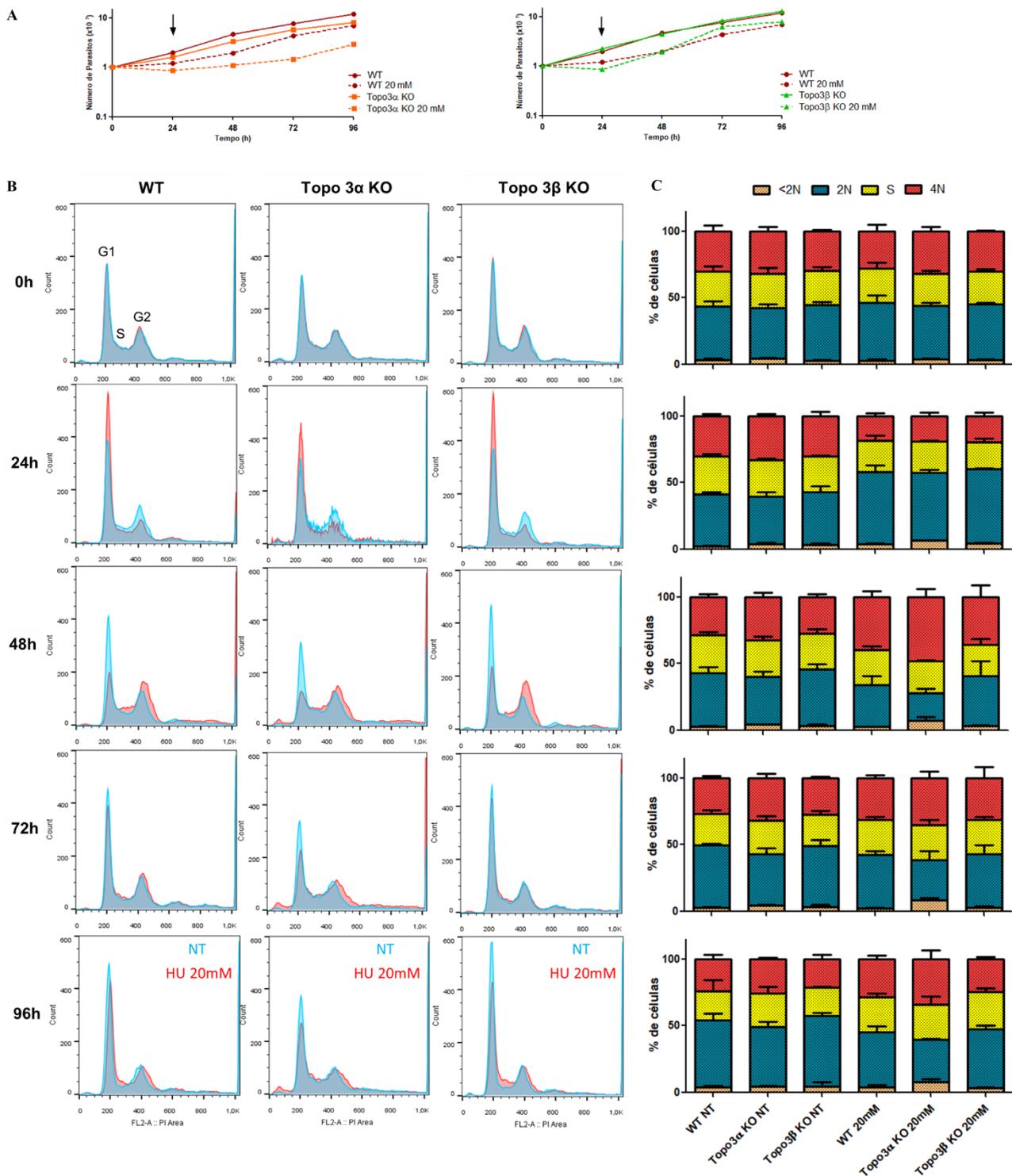
C



D



**Figura 44:** Curva de crescimento com hidroxiureia. Estrutura química da hidroxiureia (A). Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) após o tratamento com 10 mM (B), 20 mM (C) ou 30 mM (D) de HU. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $1,0 \times 10^7$  células.mL $^{-1}$  e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida do meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

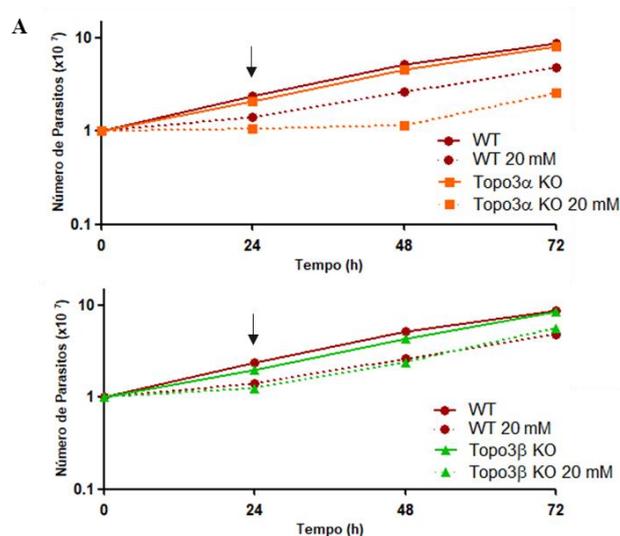


**Figura 45:** Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com HU. A) As culturas WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO foram tratadas com 20 mM de HU em meio LIT. Os gráficos representam o perfil de crescimento dos parasitos durante o experimento. A seta mostra o tempo no qual a droga foi removida. B) A cada 24 horas, as amostras foram recolhidas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por FACS. Histograma representativo da progressão do ciclo celular. Em todos os histogramas, as curvas azuis representam as células não tratadas e as vermelhas referem-se as células expostas à HU. C) Os gráficos representam a média da quantificação do número de células em cada fase em três experimentos independentes.

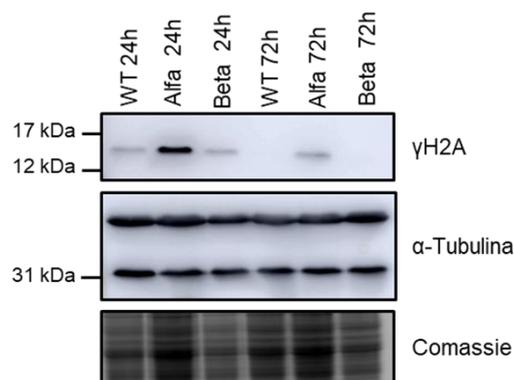
Como mencionado acima, a HU pode gerar lesões no DNA, dependendo da dose utilizada e do tempo de tratamento. Para analisar a participação das topoisomerasas no reparo deste tipo de dano de DNA, parasitos com crescimento exponencial foram tratados com 20 mM de HU por 24 horas, tempo no qual alíquotas foram recolhidas. Em seguida, os parasitos foram transferidos para um meio fresco e livre de HU. Para verificar a recuperação destas células após o tratamento, novas alíquotas foram recolhidas no ponto de 72 horas.

Os três parasitos estudados apresentam bandas para  $\gamma$ H2A logo após o tratamento com esta dose de HU, indicando a presença de danos no DNA. A remoção da droga do meio de cultura permitiu o reparo do DNA nas células WT e Topo3 $\beta$  KO, mas não nos parasitos Topo3 $\alpha$  KO, que ainda possuem a histona fosforilada no tempo de 72 horas (Figura 46B). Este dado sugere que a ausência da topoisomerase 3 $\alpha$  impediu o completo reparo do DNA após o tratamento com HU, o que retardou a retomada da progressão do ciclo celular e a proliferação do parasito.

A fim de averiguar se os danos induzidos pela HU são reparados pela via de recombinação homóloga, parasitos selvagens e heminocautes para Rad51 também foram submetidos ao tratamento com HU. Após 24 horas de tratamento houve uma parada de crescimento de ambos os parasitos testados, com as três doses utilizadas. A remoção da droga do meio de cultura permitiu a retomada de crescimento pelas células, sendo que o perfil de crescimento exibido pelas células Rad51 $^{+/-}$  é muito semelhante ao das células WT (Figura 47). Este dado sugere que TcRad51 não está envolvido na resposta ao estresse replicativo causado pela HU em *T. cruzi*. Assim, é possível inferir que a topoisomerase 3 $\alpha$  participa, por meio de outra via de reparo, dos mecanismos envolvidos na resolução do estresse replicativo induzido por este agente genotóxico.



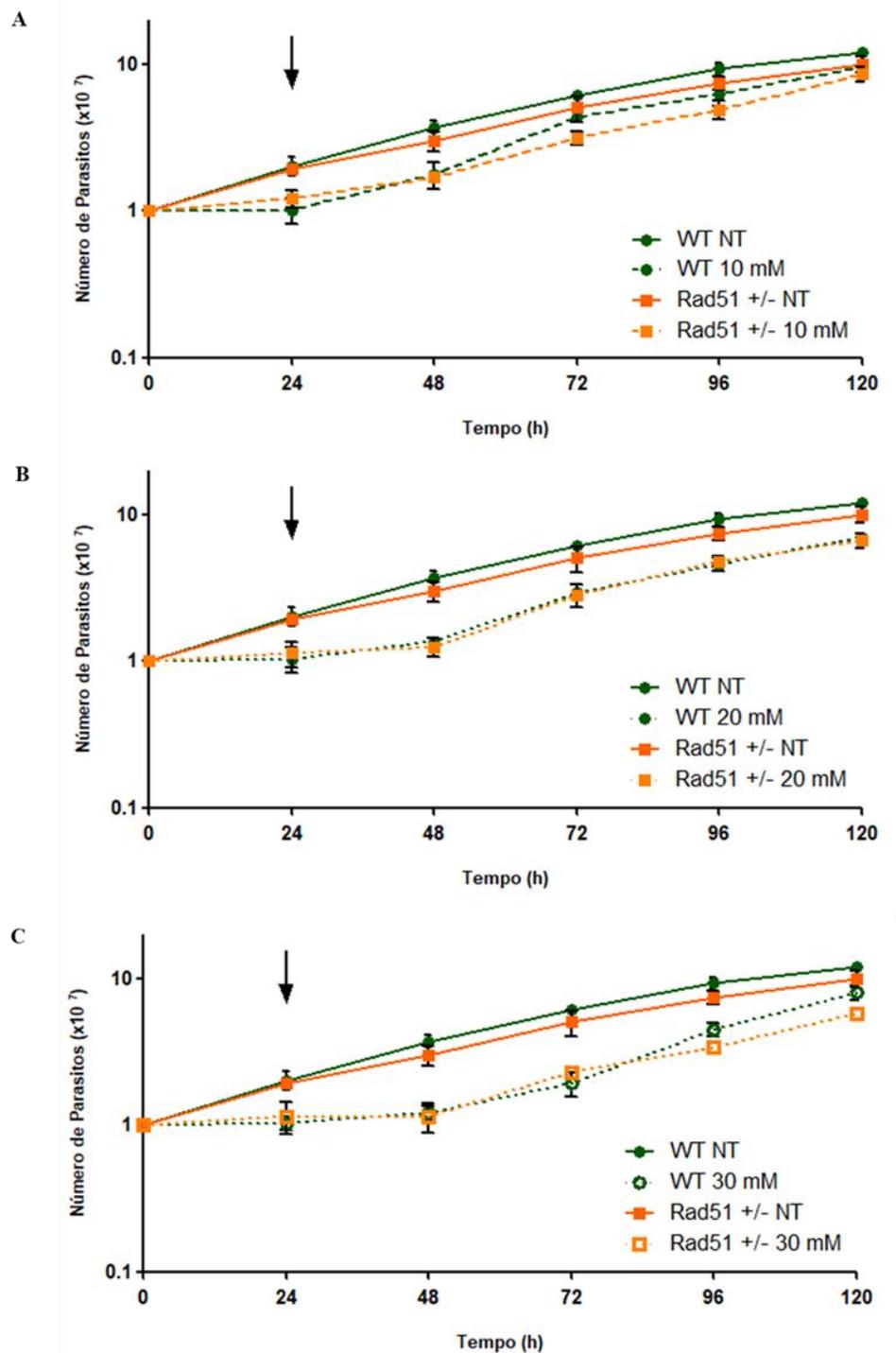
**B** Células Tratadas com 20 mM de HU



**Figura 46:** Nível de dano no DNA após o tratamento com HU. A) Gráficos do perfil de crescimento dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO durante o experimento. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida do meio de cultura. B) Membrana representativa do Western blot com anticorpo anti- $\gamma$ H2A com as células tratadas com HU. Os três parasitos apresentam bandas para  $\gamma$ H2A após o tratamento. As células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de reparar as suas lesões no tempo de 72 horas, o que não aconteceu com os parasitos Topo3 $\alpha$  KO. O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado como controle de carregamento. Foram realizados três experimentos independentes.

**4.12. Resposta ao estresse replicativo causado pela cisplatina**

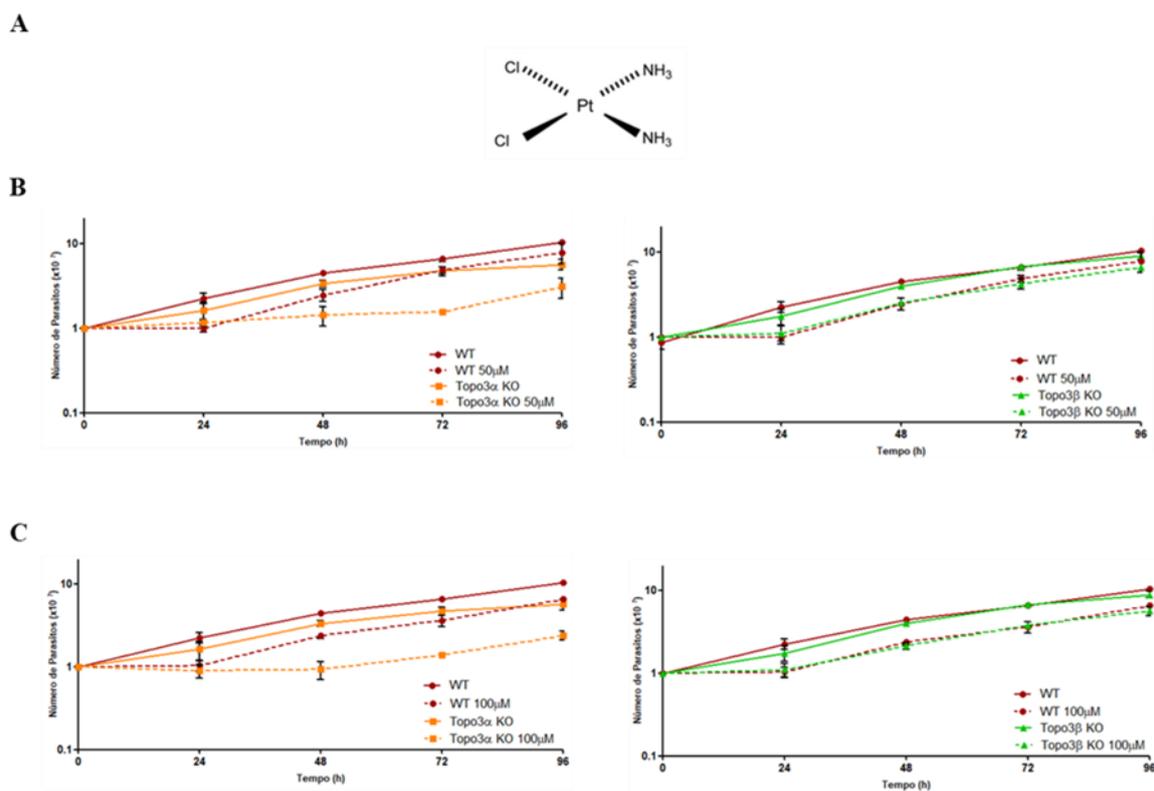
A cisplatina é um composto de coordenação de platina citotóxico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Dentro da célula, a cisplatina é hidrolisada tornando-se um potente eletrófilo capaz de interagir principalmente com o átomo N<sup>7</sup> dos resíduos de purina do DNA formando *crosslinks* intrafita e interfita. A formação destes



**Figura 47:** Curva de crescimento de Rad51<sup>+/-</sup> com HU. Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT) e heminocaute para TcRada51 (Rad51<sup>+/-</sup>) após o tratamento com 10 mM (A), 20 mM (B) ou 30 mM (C) de HU. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $1,0 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida do meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

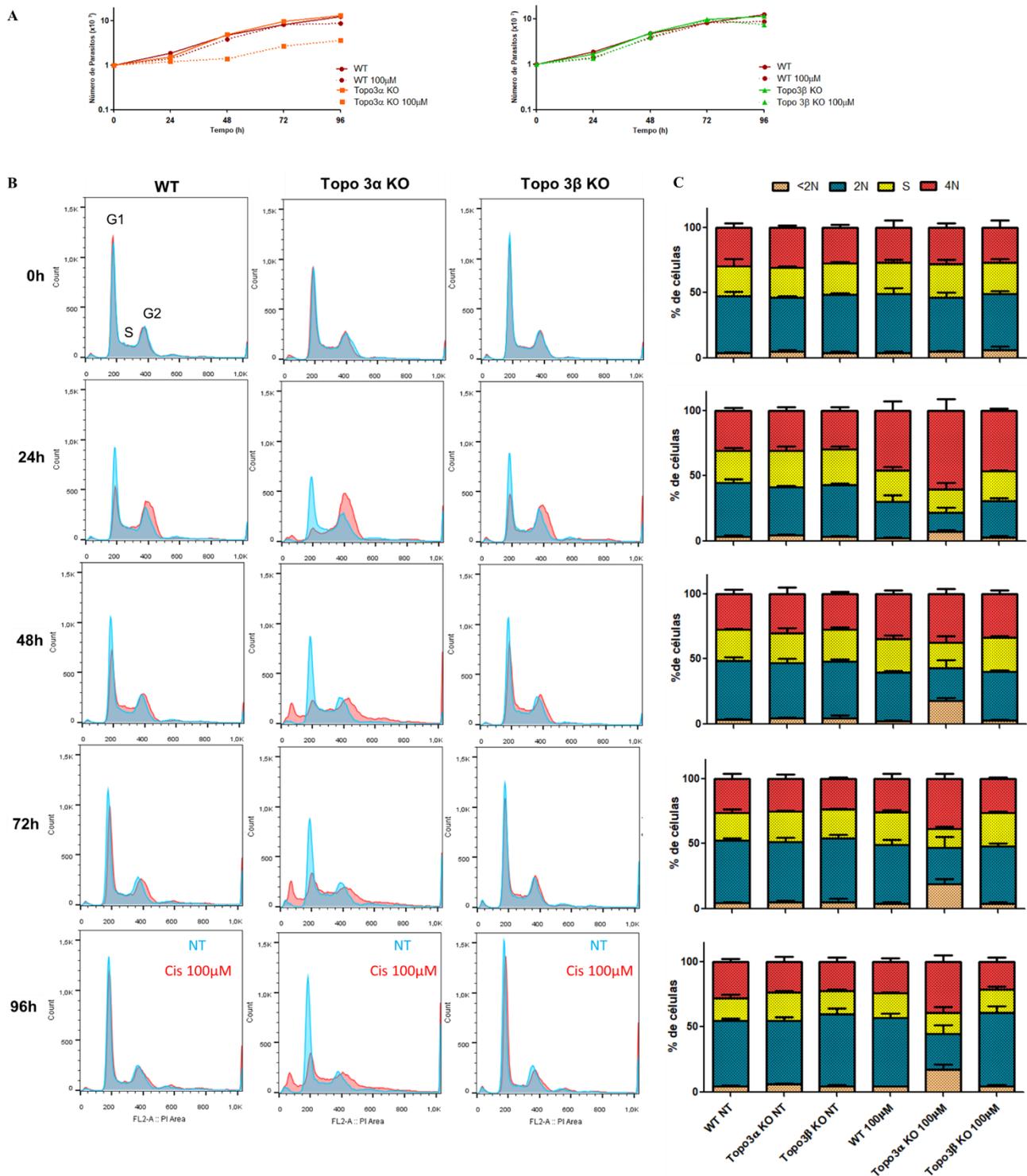
adutos covalentes gera distorções da dupla hélice do DNA, causando dano na molécula, bloqueio da replicação e morte celular por apoptose (Dasari e Tchounwou, 2014). O tratamento dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO com cisplatina, em ambas as doses testadas (50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M), causou uma parada no crescimento tanto do parasito selvagem quanto dos parasitos nocautes por 24 horas em comparação com os parasitos que não foram expostos à droga (Figura 48). Após esse tempo, as células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de retomar o crescimento, sendo que não é possível observar diferenças entre o perfil de crescimento destes parasitos após o tratamento. Por outro lado, as células deficientes em Topo3 $\alpha$  tiveram um atraso na retomada do crescimento em comparação com a célula selvagem. Este fenótipo, semelhante ao observado após o tratamento com HU, sugere que este gene é necessário para lidar com o estresse replicativo causado pela cisplatina em *T. cruzi*.

A avaliação da progressão do ciclo celular mostrou que, 24 horas após o tratamento com 100  $\mu$ M de cisplatina, as três células estudadas se acumulam na fase G2 do ciclo celular. Nos parasitos Topo3 $\alpha$  KO já é possível observar um pequeno acúmulo de células em sub-G1 (Figura 49). Nos tempos seguintes, em concordância com a recuperação do crescimento celular, os parasitos WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de retomar a progressão normal do ciclo celular. Em contraste, no tempo de 48 horas houve uma diminuição no número de células Topo3 $\alpha$  KO na fase G2 e um aumento em sub-G1, indicando a capacidade destes parasitos em retomar a progressão do ciclo celular. O acúmulo de células Topo3 $\alpha$  KO em sub-G1 é mantido nos tempos posteriores, o que não impede a recuperação do crescimento celular. Resultado similar foi observado após o tratamento com a dose menor de cisplatina (Anexo 4).



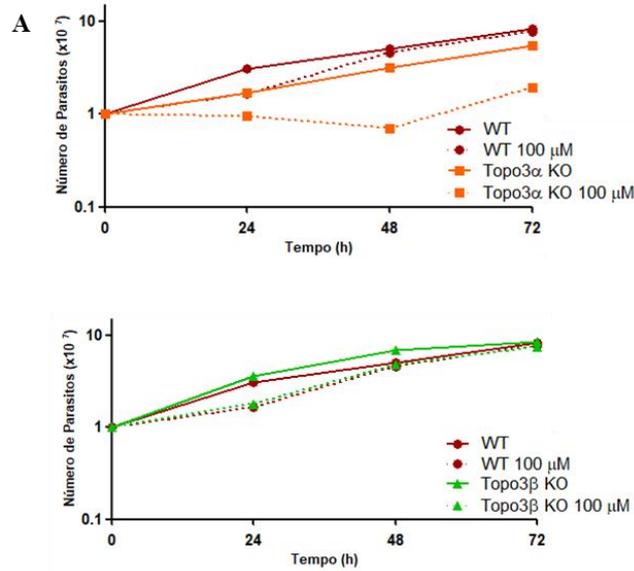
**Figura 48:** Curva de crescimento com cisplatina. Estrutura química da cisplatina (A). Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* selvagem (WT), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) após o tratamento com 50  $\mu$ M (B) ou 100  $\mu$ M (C) de Cis. Os parasitos foram cultivados em meio LIT e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

A fim de verificar a participação das topoisomerases no reparo do dano de DNA induzido pela cisplatina, parasitos em fase exponencial de crescimento foram novamente tratados com 100  $\mu$ M desta droga e o nível de fosforilação da histona H2A foi medido por Western blot. Assim, alíquotas de células foram recolhidas 24 horas e 72 horas após o tratamento. Os três tipos celulares testados apresentam bandas para  $\gamma$ H2A 24 horas após o tratamento com cisplatina, indicando a presença de danos no DNA causados por esta droga. No tempo de 72 horas, as células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de reparar as suas lesões, enquanto os parasitos Topo3 $\alpha$  KO permaneceram com níveis elevados da histona fosforilada (Figura 50B). Assim, de forma semelhante ao observado após o tratamento com a HU, os parasitos deficientes em topoisomerase 3 $\alpha$  não foram capazes

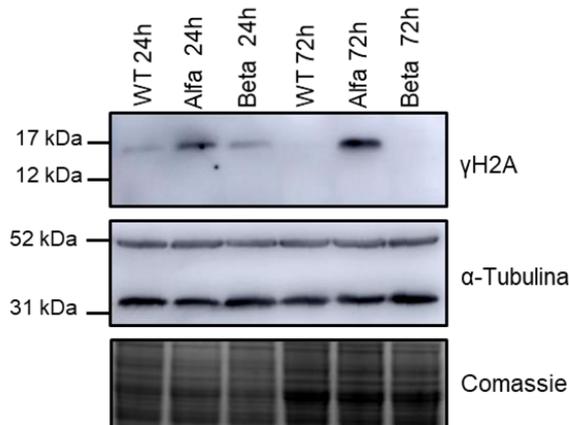


**Figura 49:** Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com cisplatina. A) As culturas WT, Topo3α KO e Topo3β KO foram tratadas com 100 µM de Cis. Os gráficos representam o perfil de crescimento dos parasitos durante o experimento. B) A cada 24 horas, as amostras foram recolhidas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por FACS. Histograma representativo da progressão do ciclo celular. Em todos os histogramas, as curvas azuis representam as células não tratadas e as vermelhas referem-se as células expostas à Cis. C) Os gráficos representam a média da quantificação do número de células em cada fase em três experimentos independentes.

de reparar totalmente as lesões geradas pela cisplatina, o que gerou um acúmulo de células na fase sub-G1 e um atraso na retomada do crescimento após este tratamento.



### B Células Tratadas com 100 μM de Cis



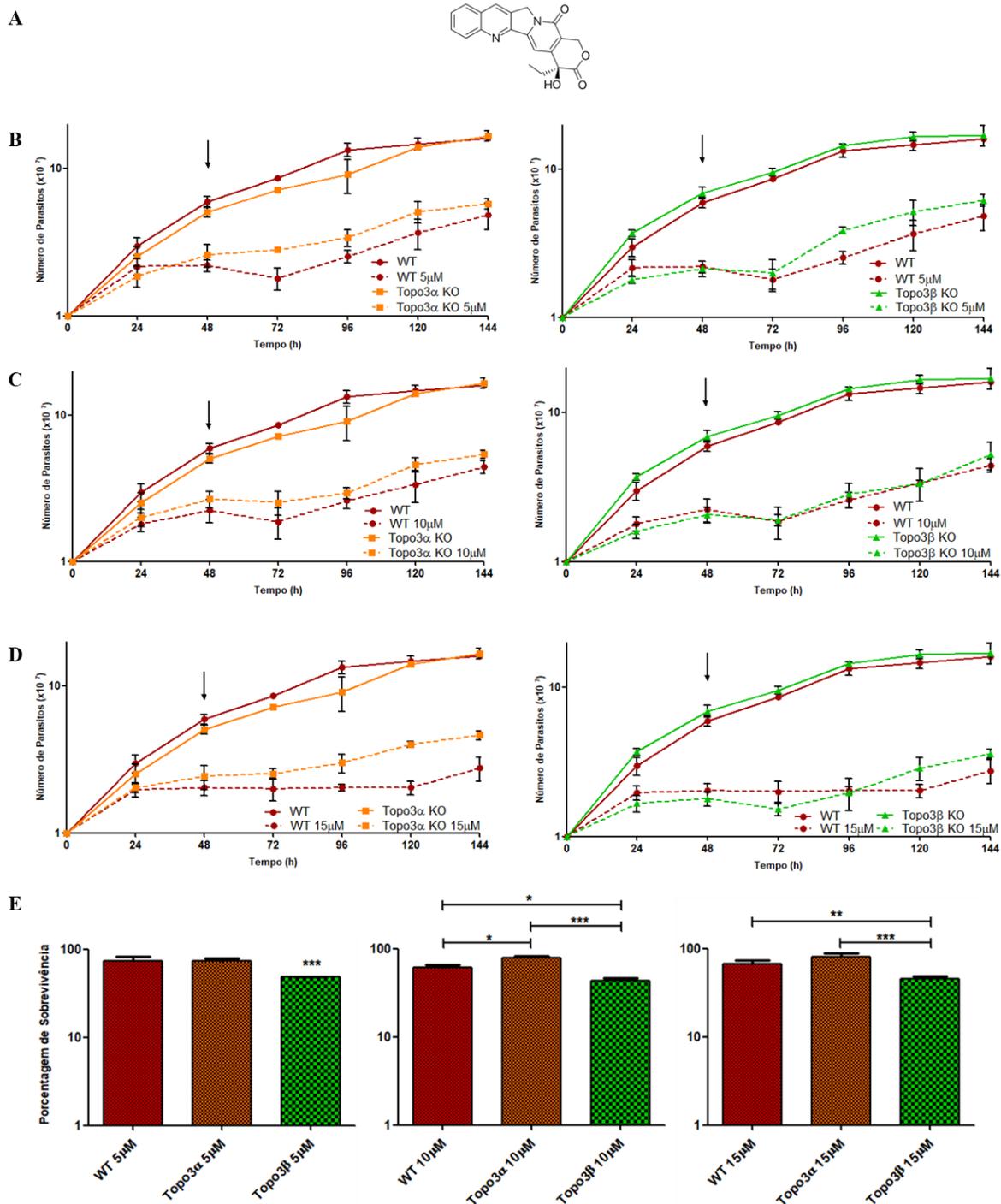
**Figura 50:** Nível de dano no DNA após o tratamento com cisplatina. A) Gráficos do perfil de crescimento dos parasitos WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO durante o experimento. B) Membrana representativa do Western blot com anticorpo anti- $\gamma$ H2A com as células tratadas com Cis. Os parasitos apresentam bandas para  $\gamma$ H2A 24 horas após o tratamento com cisplatina. As células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de reparar as suas lesões no tempo de 72 horas, o que não aconteceu com os parasitos Topo3 $\alpha$  KO. O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado como controle de carregamento. Foram realizados três experimentos independentes.

#### **4.13. Resposta ao estresse replicativo causado pela camptotecina**

A camptotecina (CPT) é um alcaloide pentacíclico com atividade anticâncer que inibe as topoisomerasas da subfamília IB. Este inibidor atua bloqueando a religação da fita de DNA, fazendo com que a enzima permaneça ligada ao ácido nucléico. A presença desse complexo ternário pode bloquear a forquilha de replicação e a maquinaria de transcrição, gerando dano de DNA e morte celular (Li *et al*, 2017). Na presença de CPT, para as três doses testadas (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M), houve uma redução no crescimento dos parasitos em comparação com os parasitos que não receberam o tratamento. Após o tempo de 48 horas, quando a droga é removida do meio de cultura, as células são capazes de retomar o crescimento. Contudo, não atingem a mesma concentração celular, no período de tempo estudado, dos parasitos que não receberam o tratamento (Figura 51). Em condições normais de cultivo, os parasitos Topo3 $\beta$  KO apresentam uma taxa de crescimento maior que os parasitos WT. Porém, na presença de CPT, os parasitos mutantes crescem um pouco menos que os selvagens. Para verificar se realmente há uma maior sensibilidade das células Topo3 $\beta$  KO a esta droga, a contagem do tempo de 24 horas foi usada na construção de uma curva de sobrevivência (Figura 51E). A porcentagem de sobrevivência é dada pela razão da densidade dos parasitos tratados com as diferentes doses de CPT e a densidade dos parasitos controle não tratados. É possível notar, como dito acima, que tanto os parasitos selvagens quanto os parasitos nocautes são sensíveis a CPT, sendo que as células Topo3 $\beta$  KO apresentam uma menor porcentagem de sobrevivência com 24 horas de exposição a esta droga.

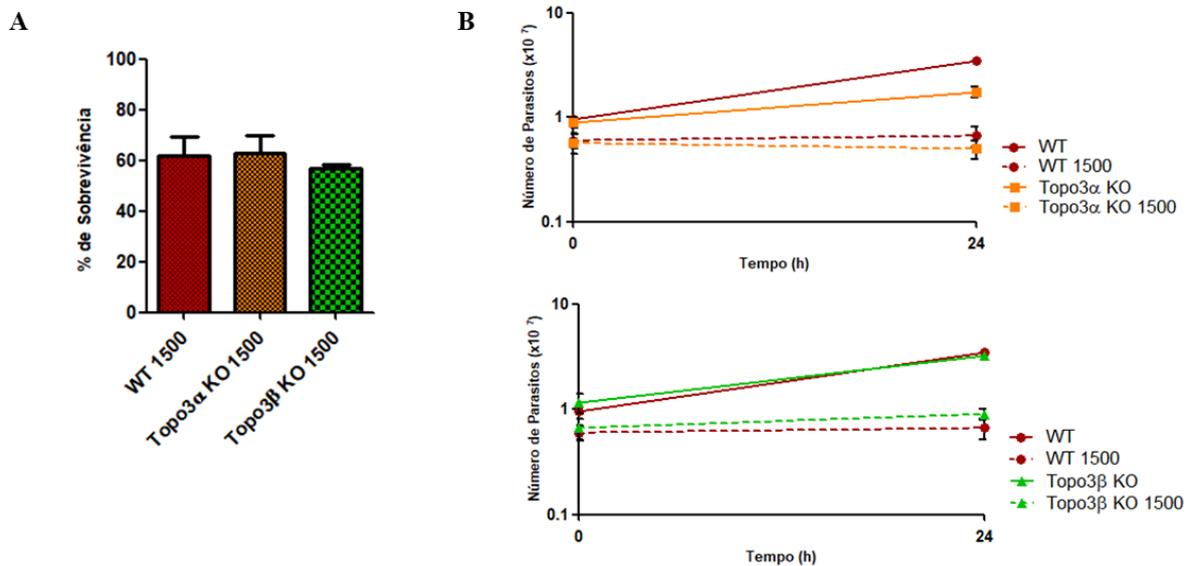
#### **4.14. Resposta ao estresse replicativo causado pela luz ultravioleta**

A luz UV tem um efeito mutagênico e carcinogênico nos organismos, já que a energia liberada pela radiação pode ser absorvida pelas bases do DNA. Isto desencadeia



**Figura 51:** Curva de crescimento com camptotecina. Estrutura química da forma lactona da camptotecina (A). Avaliação do perfil de crescimento das cepas de *T. cruzi* WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO após o tratamento com 5  $\mu$ M (B), 10  $\mu$ M (C) ou 15  $\mu$ M (D) de CPT. Os parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $1,0 \times 10^7$  células.mL $^{-1}$  e contados em câmara citométrica a cada 24 horas. A seta indica o ponto no qual a droga foi removida do meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata. Curva de sobrevivência no ponto de 24 horas (E) mostrando que os parasitos nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  são mais sensíveis ao tratamento.

fotorreações que geram adutos na molécula de DNA, sendo os mais comuns o CPD e o 6-4 PP. Se não reparados, estes fotoprodutos constituem uma barreira física para as maquinarias de replicação e transcrição. Assim, por impedir o metabolismo do DNA, as lesões induzidas pela luz UV podem causar instabilidade genômica e induzir a morte celular por apoptose (Batista *et al*, 2009; Chung e Murray, 2018). Para verificar se as topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  estão envolvidas na resolução dos danos de DNA causados pela luz UV, parasitos selvagens e nocautes foram irradiados com 1500 J.m<sup>-2</sup> de UVC. O cálculo da porcentagem de sobrevivência imediatamente após a irradiação, mostra que os três tipos de parasitos estudados são sensíveis a este tratamento (Figura 52A). Contudo, a ausência das topoisomerasas não influenciou a taxa de sobrevivência e de crescimento após a irradiação com luz UV (Figura 52).

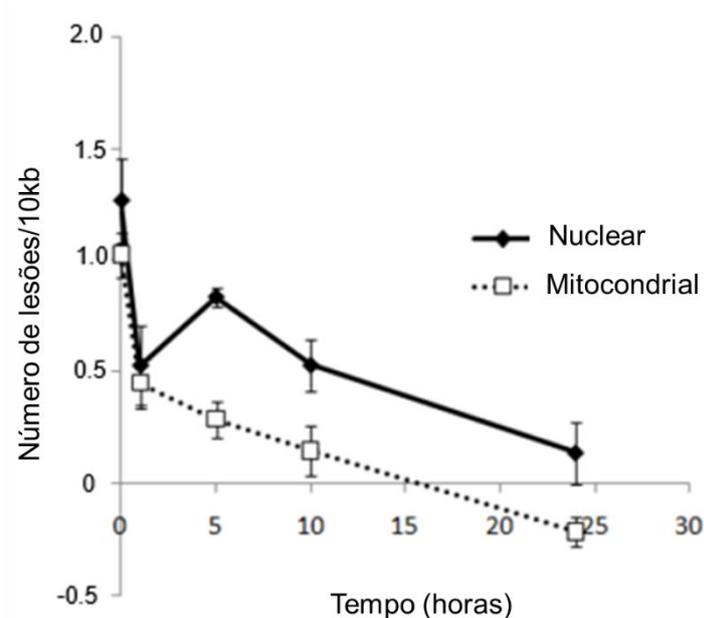


**Figura 52:** Curva de crescimento após irradiação com luz UV. A) Curva de sobrevivência logo após a irradiação com 1500 J.m<sup>-2</sup> de UVC em meio LIT. As cepas de *T. cruzi* WT, Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO são igualmente sensíveis ao tratamento. B) Avaliação do perfil de crescimento das culturas 24 horas após a irradiação. A ausência das topoisomerasas não altera a taxa de crescimento após a exposição a luz UV. O experimento foi realizado em triplicata.

## 5. DISCUSSÃO

A presença de lesões não reparadas no DNA ou quantidades limitadas de dNTPs podem atuar como um obstáculo para a progressão da forquilha de replicação, gerando estresse replicativo. Uma vez que a estabilidade genômica depende da duplicação acurada do DNA, as células desenvolveram estratégias para prevenir e corrigir as fontes de estresse replicativo (Kitao *et al*, 2017). A resposta ao dano de DNA (DDR) é uma via de sinalização presente em células eucarióticas e conservada ao longo da evolução. A presença de lesões no DNA promove a ativação sequencial de diversas proteínas, o que permite a regulação do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Awasthi *et al*, 2015).

O principal produto da alquilação causada pelo MMS nas células é a N7-metilguanina, que é depurinada formando sítios AP na molécula de DNA. Se não forem reparados, os sítios AP podem ser mutagênicos e citotóxicos. Além de formar sítios abásicos, outros adutos metilados, como a N3-metiladenina e a N1-metilguanina, são diretamente capazes de parar o movimento das DNA polimerases replicativas (Nikolova *et al*, 2010). Assim, para verificar o efeito do estresse replicativo em *T. cruzi*, parasitos selvagens foram tratados com 1,5 mM de MMS. A curva de crescimento mostrou que o tratamento prolongado com esta dose causou morte celular (Figura 39B). No entanto, a incubação por apenas 1 hora não é capaz de induzir a morte celular, mas sim de parar a proliferação dos parasitos por até 24 horas (Figura 39C). De fato, a quantificação do número de lesões no DNA nuclear, 1 hora após a exposição a 1,5 mM de MMS, mostrou uma grande diminuição nos danos detectados. Contudo, um novo pico de lesões reaparece 5 horas após o tratamento, sendo que o DNA nuclear é completamente reparado em 24 horas (Figura 53) (Rajão, 2011). Estes dados sugerem que o *T. cruzi* é sensível à parada de forquilha de replicação causada pelo MMS. Os parasitos param o crescimento após o



**Figura 53:** Quantificação do dano de DNA após tratamento com MMS. As lesões no DNA nuclear e mitocondrial de células selvagens tratadas com 1,5 mM de MMS por 1 hora em PBS foram medidas por meio de PCR quantitativa. Os dados representam a média de dois experimentos biológicos. Barras de erro representam erro padrão da média. Experimento realizado por Rajão, 2011.

tratamento para permitir o reparo das lesões e a retomada da replicação do DNA. Normalmente, as bases metiladas pelo MMS são reparadas pelo BER. Porém, nos tripanossomatídeos não foi identificada nenhuma DNA glicosilase específica capaz de remover N-metilpurinas (Charret *et al*, 2012). Um estudo recente, com *T. brucei*, mostrou que o primeiro pico de lesões nucleares causado pelo MMS é reparado pelo NER e o segundo pela HR (Viera-da-Rocha *et al*, 2019).

As DSBs podem surgir devido a exposição à agentes genotóxicos, após o colapso de forquilhas de replicação paradas, em resposta a telômeros desprotegidos, durante a recombinação meiótica e na recombinação V(D)J para a montagem dos genes codificadores dos receptores antigênicos em linfócitos. A geração de DSBs promove a ativação da cinase ATM, que é responsável por coordenar a resposta celular a este tipo de dano de DNA. Além de sua função canônica na DDR, diversos estudos têm

demonstrado a participação de ATM na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção da homeostase celular (Shiloh e Ziv, 2013).

Em humanos, mutações no gene ATM causam a doença autossômica recessiva ataxia telangiectasia (A-T), caracterizada pela degeneração cerebelar progressiva, telangiectasia, imunodeficiência, predisposição ao desenvolvimento de câncer, especialmente de origem linfoide, atrofia gonadal, sensibilidade à radiação ionizante e, ocasionalmente, deficiência de crescimento, envelhecimento precoce e diabetes resistente à insulina. Esta variabilidade de sintomas apresentada pelos portadores da A-T é causada pelas diversas funções desempenhadas pela cinase ATM. Não existe uma área específica deste longo gene responsável pela doença, sendo que já foram identificadas mutações sem sentido, mutações de sentido trocado, mutações em sítios de *splicing* e inserções/deleções em diferentes regiões do gene ATM, que geram, em sua maioria, a proteína truncada. Em alguns casos a atividade de ATM é totalmente ausente e em outros ainda há uma produção residual da proteína funcional. (Rothblum-Oviatt *et al*, 2016).

Apesar de apresentarem um crescimento retardado e infertilidade, camundongos nocautes para ATM são viáveis, o que indica que este gene não é essencial para a viabilidade celular. Experimentos com células destes animais mostraram que a ausência de ATM causa instabilidade cromossômica, acúmulo de DSBs e hipersensibilidade a radiação gama (Barlow *et al*, 1996; Elson *et al*, 1996; Xu *et al*, 1996).

O estresse genotóxico induzido pela luz UV, por agentes intercalantes de DNA, por inibidores de topoisomerasas, pela depleção de dNTPs e por agentes alquilantes de bases causa a parada ou diminuição da progressão das DNA polimerases. A geração de trechos de ssDNA, promove o recrutamento e a ativação da cinase ATR, que é a principal cinase envolvida na resposta ao estresse replicativo. Adicionalmente, a ATR é responsável por regular a ativação das origens de replicação durante uma fase S não

perturbada. Nesta situação, a ATR previne a excessiva ativação de origens, garantindo quantidades suficientes de precursores de DNA e fatores de replicação para a completa duplicação do genoma (Saldivar *et al*, 2017). Diferente do observado para ATM, a perda dos dois alelos de ATR causou letalidade embrionária precoce em camundongos e a morte de células somáticas humanas, mostrando que este gene é essencial para a viabilidade celular (Brown e Baltimore, 2000; de Klein *et al*, 2000; Cortez *et al*, 2001). Em camundongos, blastocistos ATR<sup>-/-</sup> cultivados *in vitro* apresentaram fragmentação cromossômica, sugerindo que a ATR é uma cinase importante para manter a integridade genômica em células com proliferação intensa (Brown e Baltimore, 2000).

Em concordância com o papel essencial desempenhado pela ATR, ainda não foi descrita nenhuma doença humana na qual esta cinase esteja totalmente ausente. A síndrome de Seckel é uma doença autossômica recessiva caracterizada por crescimento intrauterino retardado, microcefalia, nanismo, deficiência intelectual e anormalidades craniofaciais. Em alguns portadores desta doença rara foram encontradas mutações no gene ATR que geraram alelos hipomórficos. Tais mutações alteraram os sítios de *splicing* do gene ATR, resultando na produção de níveis residuais da proteína funcional (O'Driscoll *et al*, 2003; Ogi *et al*, 2012). Células derivadas destes pacientes apresentam uma resposta defectiva a agentes que causam estresse replicativo, confirmando defeitos na via de sinalização de ATR (O'Driscoll *et al*, 2003; Alderton *et al*, 2004; Ogi *et al*, 2012).

Genes para ambas as cinases estão presentes no genoma dos tripanossomatídeos (da Silva *et al*, 2018). De forma similar ao observado em outros eucariotos, o silenciamento por RNAi dos genes ATM e ATR de *T. brucei* mostrou que apenas ATR é essencial para a sobrevivência celular em condições de não estresse. Contudo, ambos os genes são necessários para lidar com os danos de DNA induzidos pelo agente alquilante

MMS (Stortz *et al*, 2017). O uso de inibidores específicos para ATM e ATR, antes do tratamento com peróxido de hidrogênio, reduziu de forma significativa a taxa de sobrevivência de *L. major*, sugerindo a participação destas cinases nos mecanismos de sinalização do dano de DNA neste parasito (da Silva *et al*, 2018).

De forma semelhante ao observado em *T. brucei* e *L. major*, os genes ATM e ATR de *T. cruzi* apresentam a maioria dos domínios conservados das cinases da família PIKK (Figura 9), o que sugere uma conservação da função destas cinases.

Para melhor compreender os mecanismos pelos quais o *T. cruzi* lida com o estresse replicativo, foram construídos cassetes de deleção alelo-específicos para os genes TcATM e TcATR. Assim, em um dos alelos, o gene alvo seria inteiramente substituído pelo cassete contendo o gene de resistência à higromicina ou neomicina. Após algumas tentativas, foram obtidas duas culturas, ATM Não Esmeraldo-*like* resistente à neomicina e ATR Esmeraldo-*like* resistente à higromicina, contendo os cassetes de deleção em seu DNA genômico (Figura 22). Entretanto, experimentos posteriores mostraram que o cassete não sofreu a recombinação homóloga no local esperado (Figuras 23 e 24) e, portanto, os parasitos selecionados não expressavam níveis menores de ATM e ATR (Figura 25).

Nos experimentos com mamíferos, descritos acima, a construção de animais ou células nocautes para os genes ATM ou ATR foi realizada por meio da inserção de cassetes no interior do gene alvo, o que resultou na interrupção do gene e perda da atividade de cinase.

Os genes TcATM e TcATR são muito maiores (12705 pb e 8694 pb, respectivamente) que os cassetes de deleção utilizados (2872 pb e 2912 pb, respectivamente). Assim, é possível que algum problema metodológico tenha causado o insucesso na deleção destes genes inteiros. A fim de verificar esta hipótese, foram

construídos cassetes que deletam apenas a região codificadora do domínio cinase de TcATM e TcATR. Após algumas tentativas, foram selecionadas quatro culturas, três para o gene TcATM e uma para o gene TcATR. Apenas uma destas culturas, ATM Não Esmeraldo-like resistente a higromicina, apresentou um menor número de cópias do gene alvo (Figura 35), um menor nível de transcritos (Figura 36) e a correta inserção do cassete de deleção (Figura 37). Dessa forma, a obtenção de parasitos heminocautes para o gene TcATM, indica que o uso do cassete para deleção do gene inteiro não é adequado quando o gene alvo é muito grande.

A cultura ATM +/- permitirá a caracterização funcional do gene ATM em *T. cruzi*. Já que não foi possível obter parasitos ATR +/-, uma alternativa para estudar a função deste gene em *T. cruzi* seria fazer o uso de inibidores específicos disponíveis comercialmente, como foi feito em *L. major*.

A separação das fitas complementares da dupla hélice de DNA durante a replicação, a transcrição, a recombinação e o reparo gera problemas topológicos para o DNA da célula, que podem causar instabilidade genômica se não resolvidos. As DNA topoisomerases são capazes de catalisar alterações na topologia do DNA, sendo, portanto, enzimas essenciais para os processos que requerem acesso a informação armazenada no DNA (Chen *et al*, 2013). As DNA topoisomerases do subtipo IA em eucariotos são chamadas de topoisomerase 3 $\alpha$  e topoisomerase 3 $\beta$ . Estas enzimas apresentam atividades enzimáticas similares, mas desempenham funções celulares distintas. A topoisomerase 3 $\alpha$  forma um complexo com helicases da família RecQ e os fatores RMI1/2 para atuar no reparo de DSBs por recombinação homóloga, dissolvendo as junções de Holliday (Capranico *et al*, 2017). Já a topoisomerase 3 $\beta$  forma um complexo com o fator TDRD3 e utiliza tanto o DNA quanto o RNA como substrato. Esta enzima atua suprimindo a

formação de *R-loops* durante a transcrição e se associa a mRNAs regulando a sua tradução (Pommier *et al*, 2016).

Para verificar se a topoisomerase 3 $\alpha$  atua na dissolução das junções de Holliday em *T. cruzi*, células selvagens e nocautes para as topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  foram expostas a 500 Gy de radiação gama (Figura 38). Após a irradiação, os três parasitos permaneceram parados por alguns dias. Então, as células WT e Topo3 $\beta$  KO retomaram o crescimento. Por outro lado, os parasitos deficientes na topoisomerase 3 $\alpha$  permaneceram parados durante todo o tempo analisado. Este resultado sugere que a topoisomerase 3 $\alpha$  de *T. cruzi* está envolvida no reparo de DSBs causadas pela radiação gama.

Como mencionado anteriormente, já foi descrita a atuação da topoisomerase 3 $\alpha$  nas mitocôndrias humanas e de *Drosophila melanogaster* (Tsai *et al*, 2016; Nicholls *et al*, 2018). Dados recentes do nosso grupo de pesquisa, utilizando parasitos Rad51+/-, têm mostrado o envolvimento desse gene no reparo de danos no DNA mitocondrial. Dessa maneira, é possível que o fenótipo observado nos parasitos Topo3 $\alpha$  KO após a irradiação seja causado pela presença de DSBs não reparadas tanto no núcleo quanto na mitocôndria do parasito. Para confirmar esta hipótese mais experimentos deverão ser realizados, como por exemplo, uma reação de PCR quantitativa para medir o número de lesões presentes no DNA nuclear e mitocondrial após a radiação gama.

A fim de verificar o envolvimento dos genes das topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  durante o estresse replicativo em *T. cruzi*, os parasitos nocautes para estes genes foram tratados com alguns agentes genotóxicos capazes de parar a progressão da forquilha de replicação.

O tratamento com 1,5 mM de MMS provocou uma parada no crescimento dos parasitos selvagens e nocautes para as topoisomerasas por 24 horas (Figura 40). Condizente com esta parada de crescimento, houve um aumento no nível de fosforilação de H2A nos três parasitos, 24 horas após o tratamento (Figura 42). Para promover o reparo

das lesões, as células se acumularam na fase S/G2 do ciclo celular, sendo que para os parasitos Topo3 $\alpha$  KO há uma maior quantidade de células na fase S (Figura 41). Nos tempos posteriores, as células WT e Topo3 $\beta$  KO foram capazes de reparar as lesões causadas pelo MMS e retomar o crescimento e a progressão do ciclo celular. Em contraste, as células Topo3 $\alpha$  KO continuaram com níveis consideráveis de  $\gamma$ H2A 48 horas após o tratamento com MMS (Figura 42). Similar ao fenótipo apresentado após exposição à radiação gama, os parasitos deficientes na topoisomerase 3 $\alpha$  permaneceram parados. Mesmo após um longo período de tempo, estas células não conseguiram crescer novamente e não morreram (Figura 40). Mesmo com lesões no DNA, estas células foram capazes de retomar a progressão do ciclo celular, já que 48 horas após o tratamento há um aumento na quantidade de células na fase G2. Isto pode indicar que estes parasitos perderam o controle do *checkpoint* de dano do DNA. A partir de 72 horas após o tratamento, a quantidade de parasitos Topo3 $\alpha$  KO na fase G2 diminui e há um acúmulo na fase sub-G1 (Figura 41). As lesões não reparadas no DNA destas células mutantes impediram, permanentemente, a retomada do crescimento após o tratamento com MMS, mas não foram capazes de ativar as vias de morte celular. Assim, é possível sugerir que a topoisomerase 3 $\alpha$  seja importante para os mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA. Em células humanas, durante a fase G2 do ciclo celular, a presença persistente de intermediários do reparo por recombinação homóloga aumenta a sinalização da cinase ATR, o que promove a saída do ciclo celular e o início da senescência, a partir da fase G2, via p21 (Feringa *et al*, 2018). Dessa forma, é plausível especular que a ausência da topoisomerase 3 $\alpha$  durante este tipo de estresse replicativo altera a sinalização de *checkpoint* e desencadeia um estado de senescência celular em *T. cruzi*. A fim de confirmar estas hipóteses mais experimentos precisam ser realizados, como por exemplo o cálculo do tempo gasto em cada fase do ciclo celular e a medida da síntese de DNA.

Para verificar se as lesões causadas pelo MMS são reparadas pela via de recombinação homóloga em *T. cruzi*, os parasitos Rad51<sup>+/-</sup> também foram tratados com 1,5 mM de MMS por 1 hora. Semelhante ao observado em *T. brucei* (Viera-da-Rocha *et al*, 2019), as células deficientes em Rad51 são mais sensíveis a esta droga (Figura 43). O tratamento foi capaz de aumentar os níveis de  $\gamma$ H2A nos parasitos heminocautes, sugerindo que TcRad51 é necessária para lidar com o estresse replicativo gerado por este agente alquilante (Passos-Silva *et al*, 2018).

O tratamento com HU (10 mM, 20 mM ou 30 mM) por 24 horas sincronizou as células na fase G1 do ciclo celular (Figura 45), como já padronizado para outras cepas de *T. cruzi* (Galanti *et al*, 1994). O estresse replicativo causado por 20 mM de HU induziu danos no DNA dos três parasitos testados (Figura 46). A remoção da HU do meio de cultura permitiu a retomada do crescimento dos parasitos WT e Topo3 $\beta$  KO (Figura 44), bem como a recuperação da progressão normal do ciclo celular (Figura 45). No tempo de 72 horas não foram observadas bandas para  $\gamma$ H2A nestas culturas, indicando que as lesões causadas pela HU foram completamente reparadas (Figura 46). Já os parasitos Topo3 $\alpha$  KO apresentam uma retomada do crescimento celular retardada, em comparação ao WT, uma vez que as células nocautes permanecem paradas no tempo de 48 horas (Figura 44). Condizente com este atraso no crescimento, há uma maior quantidade destas células na fase G2 do ciclo celular e um pequeno acúmulo em sub-G1 (Figura 45). No tempo de 72 horas, pode-se visualizar uma banda fraca para  $\gamma$ H2A, indicando a presença de lesões no DNA dos parasitos deficientes na topoisomerase 3 $\alpha$  (Figura 46). Apesar de ainda possuir danos no DNA, a partir de 72 horas, os parasitos Topo3 $\alpha$  KO foram capazes de recuperar o crescimento (Figura 44) e retomar a progressão do ciclo celular, sendo que um pequeno acúmulo de células em sub-G1 é mantido (Figura 45).

A síntese translesão é um mecanismo de tolerância ao dano de DNA que utiliza polimerases propensas ao erro para garantir a conclusão da replicação, a estabilidade do genoma e a sobrevivência celular (Hashimoto *et al*, 2017). A caracterização experimental de algumas DNA polimerases tem indicado a ocorrência da síntese translesão em *T. cruzi*. A DNA polimerase  $\beta$ -PAK, que está localizada no cinetoplasto deste parasito, é capaz de catalisar a síntese de DNA a partir de moldes contendo 8-oxoguanina ou mau pareamento entre as bases (Lopes *et al*, 2008). A DNA polimerase  $\eta$ , presente no núcleo do *T. cruzi*, também insere, de forma eficiente, um nucleotídeo em frente a 8-oxoguanina. Adicionalmente, TcPol $\eta$  foi capaz de complementar leveduras deficientes nesta polimerase, conferindo resistência à radiação UV (de Moura *et al*, 2009). Existem duas cópias da DNA polimerase  $\kappa$  em *T. cruzi*. O estudo da cópia presente na mitocôndria do parasito, mostrou que a TcPol $\kappa$  também é capaz de realizar a síntese através de lesões oxidativas, como a 8-oxoguanina, bem como de promover a extensão do *D-loop* (Rajão *et al*, 2009). Assim, é possível que as células Topo3 $\alpha$  KO, em resposta ao tratamento com HU, tenham ativado este mecanismo de tolerância ao dano de DNA, permitindo a retomada do crescimento e garantindo a sobrevivência celular. Todavia outros experimentos precisam ser realizados a fim de verificar a ação de DNA polimerases translesão após o tratamento com a HU.

Em um experimento realizado anteriormente foi visto que, após o tratamento com HU por 24 horas, os parasitos Topo3 $\alpha$  KO e Topo3 $\beta$  KO são capazes de progredir para a fase S do ciclo celular antes dos parasitos selvagens (Figura 8), o que pode indicar problemas nos mecanismos de *checkpoint* dos parasitos mutantes (Umaki, 2013). Contudo, como pode ser visto na Figura 45, somente as células deficientes em topoisomerase 3 $\alpha$  apresentaram um atraso na progressão do ciclo celular no tempo de 48 horas e um pequeno acúmulo em sub-G1, o que sugere o envolvimento desta enzima nos

mecanismos de *checkpoint* e reparo do dano de DNA em *T. cruzi*. A ausência da topoisomerase 3 $\alpha$  atrasa a recuperação do crescimento celular, diminui a eficiência do reparo de DNA e altera progressão do ciclo celular, indicando que esta é uma enzima necessária para resolver o estresse replicativo causado pela HU.

Em humanos, o reparo das DSBs geradas pelo tratamento prolongado com HU requer a proteína Rad51 (Petermann *et al*, 2010). Assim, para verificar se as lesões induzidas pela HU são reparadas pela recombinação homóloga, parasitos heminocutes para Rad51 também foram submetidos ao tratamento com esta droga por 24 horas. Para as três doses de HU testadas, os parasitos Rad51 $\pm$  apresentaram um perfil de crescimento muito similar ao dos parasitos selvagens (Figura 47). Além disso, o nível de H2A fosforilada nestas duas células, após o tratamento com 20 mM de HU, é muito semelhante, o que indica que as lesões induzidas pela HU não são reparadas por recombinação homóloga em *T. cruzi* (Passos-Silva *et al*, 2018). Porém, os parasitos Rad51 $\pm$  ainda possuem um alelo íntegro deste gene e, assim, os níveis da proteína Rad51 funcional estão apenas reduzidos. Desta forma, existe a possibilidade de que a quantidade de Rad51 produzida por estes parasitos seja suficiente para lidar com o estresse replicativo gerado pela HU.

O tratamento com 50  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M de cisplatina parou o crescimento das células testadas por 24 horas (Figura 48). Em concordância com a curva de crescimento, a avaliação da progressão do ciclo celular mostrou um acúmulo das células tratadas na fase G2 do ciclo celular 24 horas após o tratamento (Figura 49) similar ao observado em células de mamíferos (Sorenson *et al*, 1990; Wagner e Karnitz, 2009; Lützkendorf *et al*, 2017). A análise do número de lesões no DNA por Western blot com o anticorpo anti- $\gamma$ H2A, mostra que no tempo de 24 horas os três parasitos testados apresentam danos no DNA causados pela cisplatina (Figura 50). A parada no ciclo celular, permite que tanto

os parasitos WT quanto Topo3 $\beta$  KO reparem estas lesões e retomem o crescimento e a progressão do ciclo celular, nos tempos posteriores. Por outro lado, semelhante ao observado após o tratamento com a HU, as células deficientes na topoisomerase 3 $\alpha$  ainda apresentam uma banda para  $\gamma$ H2A no tempo de 72 horas e, mesmo assim, são capazes de retomar o crescimento celular. Novamente, é possível que mecanismos de tolerância ao dano ou mesmo descontrole nos *checkpoints* tenham permitido a retomada do crescimento destas células. A persistência de danos no DNA atrasa a recuperação de crescimento dos parasitos Topo3 $\alpha$  KO e promove um pequeno acúmulo destas células na fase sub-G1. Logo, estes resultados sugerem que este gene ajuda a resolver o estresse replicativo causado pela cisplatina em *T. cruzi*.

Tal como observado com a HU (Figura 47), TcRad51 não é essencial para lidar com agentes intercalantes. As curvas de sobrevivência de parasitos selvagens, superexpressores e heminocautes para TcRad51, 48 horas após o tratamento com diferentes doses de cisplatina, são muito similares (Passos-Silva *et al*, 2018).

É interessante notar que existe uma variação na sensibilidade dos parasitos Topo3 $\alpha$  KO aos agentes genotóxicos testados. A exposição à radiação gama e ao MMS impediu, de modo permanente, a retomada do crescimento destas células mutantes. Ambos os tratamentos geram uma grande quantidade de DSBs que necessitam de Rad51 para o reparo por recombinação homóloga. Por outro lado, os tratamentos com HU e cisplatina, para os quais TcRad51 não se mostrou essencial, apenas atrasaram a retomada de crescimento das células Topo3 $\alpha$  KO. Assim, é possível sugerir que nem todas as respostas ao estresse replicativo, das quais a topoisomerase 3 $\alpha$  participa, são dependentes da recombinação homóloga.

A replicação induzida por quebra (BIR, em inglês *break-induced replication*) é um tipo especializado de recombinação homóloga capaz de reparar eficientemente DSBs

nas quais apenas uma das extremidades pode encontrar homologia no genoma. Assim, esta via, que é conservada em vírus, bactérias e eucariotos, contribui para a recuperação de forquilhas de replicação colapsadas (Malkova e Ira, 2013).

Os mecanismos moleculares pelos quais a BIR ocorre ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que esta via é iniciada pela ressecção de uma das extremidades da quebra, gerando uma região de ssDNA, que é ligada primeiramente por RPA. Em seguida, com a ajuda de proteínas como a Rad52, é formado o nucleofilamento de Rad51 no ssDNA. Então, Rad51 promove a invasão de apenas uma extremidade quebrada na molécula de DNA homóloga, formando o *D-loop*. Isto desencadeia uma extensa síntese de DNA, que frequentemente prossegue até o fim do cromossomo molde. É sugerido que a maioria dos eventos da BIR são concluídos durante a fase G2/M, o que pode gerar uma parada do ciclo celular nesta fase. Apesar do importante papel de Rad51 na via canônica de BIR, já foi descrita uma via independente de Rad51 em leveduras e em células de mamíferos. Contudo, ainda não se sabe como a BIR é iniciada na ausência desta recombinase. A síntese de DNA durante a BIR não ocorre com a mesma fidelidade da replicação do DNA durante a fase S, o que resulta em níveis elevados de mutagenese e rearranjos cromossômicos (Kramara *et al*, 2018).

Alguns estudos sugerem a ocorrência da BIR em tripanossomatídeos. Em *Leishmania infantum*, a tentativa de deletar o gene subtelomérico essencial GSH1 resultou na sua duplicação em tandem. Os autores deste trabalho acreditam que a BIR seja o mecanismo responsável por este evento de duplicação gênica (Mukherjee *et al*, 2011). Experimentos realizados em *T. brucei* indicam que as DSBs, geradas durante a troca de glicoproteínas variantes de superfície (VSG), são reparadas pela BIR (Boothroyd *et al*, 2009).

Como dito anteriormente, o fenótipo apresentado pelos parasitos Topo3 $\alpha$  KO e Rad51 +/- em resposta ao tratamento com HU e com cisplatina sugere que a recombinação homóloga não está envolvida na resolução do estresse replicativo causado por estes agentes genotóxicos. Visto que a BIR pode ocorrer de forma independente de Rad51 e que as células Topo3 $\alpha$  KO estão acumuladas na fase G2, no tempo de 48 horas, após ambos os tratamentos (Figuras 45 e 49) é possível especular que esta via esteja envolvida na recuperação das forquilhas paradas devido a HU e a cisplatina. Como não está completamente elucidado quais são as enzimas envolvidas na síntese de DNA durante a BIR, existe a possibilidade de que a topoisomerase 3 $\alpha$  atue neste processo, a exemplo do que ocorre durante a replicação normal do DNA nuclear e mitocondrial. Isto explicaria o atraso na retomada do crescimento das células deficientes nesta enzima após ambos os tratamentos e, adicionalmente, o fato de que estas células foram capazes de crescer mesmo sem o completo reparo de suas lesões. Entretanto, mais experimentos precisam ser realizados a fim de confirmar esta hipótese.

Os resultados apresentados acima indicam o envolvimento da topoisomerase 3 $\alpha$ , provavelmente por vias diferentes, na resolução do estresse replicativo causado pelo MMS, HU e cisplatina em *T. cruzi*. Contudo, estes parasitos nocautes não foram mais sensíveis ao tratamento com luz UV (Figura 52) e camptotecina (Figura 51), dois agentes que também causam a parada da forquilha de replicação.

A exposição de parasitos selvagens e nocautes para as topoisomerasas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$  a 1500 J.m<sup>-2</sup> de UVC mostrou que os três parasitos são igualmente sensíveis às fotolesões induzidas pela luz UV (Figura 52). Um fenótipo similar foi observado com parasitos Rad51 +/-, que apresentaram uma taxa de sobrevivência semelhante aos parasitos WT após o tratamento com diferentes doses de luz UV (Passos-Silva *et al*, 2018).

O tratamento com 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ou 15  $\mu$ M de CPT por 48 horas reduziu o crescimento tanto dos parasitos selvagens quanto dos parasitos nocautes em comparação com as células que não receberam o tratamento, não sendo observada diferenças entre as células WT e Topo3 $\alpha$  KO. A remoção da droga do meio de cultura permitiu a retomada de crescimento de todos os parasitos (Figura 51). Comportamento similar foi observado durante o tratamento de epimastigotas selvagens da cepa *T. cruzi* Y com uma dose baixa de CPT (1  $\mu$ M), que parou o crescimento das células e bloqueou seu ciclo celular no fim da fase S/início da fase G2. A remoção desta concentração da droga permitiu que o parasito retomasse a progressão do ciclo celular e o crescimento (Zuma *et al*, 2014).

Os experimentos realizados neste trabalho indicam o envolvimento da topoisomerase 3 $\alpha$  no reparo de DSBs causadas pela radiação gama, em concordância com o papel canônico desta enzima na dissolução das junções de Holliday duplas durante a recombinação homóloga. Nem sempre a parada da forquilha de replicação é capaz de causar quebras duplas na fita de DNA, o que pode explicar a variação fenotípica das células Topo3 $\alpha$  KO em resposta aos agentes genotóxicos testados. Portanto, pode-se sugerir que esta enzima não é essencial para lidar com todos os tipos de estresse replicativo em *T. cruzi*, já que sua ausência não interferiu na sensibilidade à luz UV e à CPT. É notável que, após o tratamento com HU e cisplatina, os parasitos Topo3 $\alpha$  KO, apesar de apresentar uma porcentagem de células na fase sub-G1 e banda para  $\gamma$ H2A, são capazes de retomar o crescimento celular. Assim, a topoisomerase 3 $\alpha$  também pode atuar em outras vias que permitem a recuperação das forquilhas de replicação após o estresse replicativo causado pela HU e pela cisplatina. Contudo, mais experimentos serão necessários para melhor compreender a função da topoisomerase 3 $\alpha$  durante o estresse replicativo em *T. cruzi*.

O acúmulo de *R-loops* pode ameaçar a expressão gênica e a estabilidade genômica. Logo, as células dispõem de diferentes mecanismos para removê-los. A RNase H é uma enzima presente na maioria dos organismos envolvida na remoção dos iniciadores de RNA durante a replicação. Foi observado que esta enzima também pode clivar o RNA presente no *R-loop* em uma maneira independente de sequência. Algumas helicases podem desenrolar estas estruturas híbridas, suprimindo a sua formação. Estudos têm mostrado que a DNA helicase RecG e a RNA helicase Rho, presentes nas bactérias, e a DNA helicase Pif1 e a RNA helicase DHX9, presentes em células eucarióticas, são capazes de prevenir o acúmulo dos *R-loops*. Como o superenovelamento negativo do DNA é um fator que contribui para a formação dos híbridos, topoisomerases capazes de relaxar estas supertorções previnem o acúmulo dos *R-loops*. Além das topoisomerases IA, as topoisomerases do subtipo IB também são capazes de relaxar as supertorções negativas. Estudos em bactérias, leveduras e células humanas mostraram que a deleção da topoisomerase 1 resulta no acúmulo de *R-loops* e no bloqueio da replicação e transcrição (Aguilera e García-Muse, 2012).

Como uma das funções descritas para a topoisomerase 3 $\beta$  é a supressão da formação de *R-loops*, era de se esperar que a ausência desta enzima resultaria no acúmulo destes híbridos DNA-RNA, causando estresse replicativo. A incubação com CPT, uma droga que inibe as topoisomerases do subtipo IB, diminuiu a sobrevivência das células Topo3 $\beta$  KO em relação às células WT (Figura 51). Após a remoção da CPT, os parasitos nocautes foram capazes de recuperar o crescimento, sugerindo que esta maior sensibilidade foi causada pelo acúmulo de *R-loops* nestas células. Para os demais agentes genotóxicos testados, as células Topo3 $\beta$  KO responderam de forma semelhante às células WT. Desse modo, é possível sugerir que a ausência da topoisomerase 3 $\beta$  não modificou o fenótipo das células em comparação às células selvagens, pois outras proteínas também

podem remover os híbridos de DNA-RNA. Porém, mais experimentos precisam ser realizados a fim de elucidar o papel de TcTopo3 $\beta$  na supressão de *R-loops* neste parasito.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a DNA topoisomerase 3 $\alpha$  de *T. cruzi* atua no reparo de DSBs por recombinação homóloga e também na solução de alguns tipos de estresse replicativo. O estresse replicativo induzido pelo MMS é resolvido pela via de recombinação homóloga. Contudo, os mecanismos recrutados após o tratamento com a cisplatina e a HU ainda precisam ser elucidados. Por outro lado, a DNA topoisomerase 3 $\beta$  não está envolvida na resolução do estresse replicativo em *T. cruzi*. Mais estudos são necessários para verificar qual a função desta topoisomerase e o seu envolvimento na supressão de *R-loops*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, A; GARCÍA-MUSE, T. (2012). R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Molecular Cell Review*, v.46, n.2, p.115-124, abril de 2012.
- AHMAD, M.; XUE, Y.; LEE, S.K.; MARTINDALE, J.L.; SHEN, W.; LI, W.; ZOU, S.; CIARAMELLA, M.; DEBAT, H.; NADAL, M.; LENG, F.; ZHANG, H.; WANG, Q.; SIAW, G.E.; NIU, H.; POMMIER, Y.; GOROSPE, M.; HSIEH, T.; TSE-DINH, Y.; XU, D.; WANG, W. (2016a). RNA topoisomerase is prevalent in all domains of life and associates with polyribosomes in animals. *Nucleic Acids Research*, v.44, n.13, p. 6335–6349, maio de 2016.
- AHMAD, M.; SHEN, W.; LI, W.; XUE, Y.; ZOU, S.; XU, D.; WANG, W. (2016b). Topoisomerase 3 $\beta$  is the major topoisomerase for mRNAs and linked to neurodevelopment and mental dysfunction. *Nucleic Acids Research*, v.45, n.5, p. 2704-2713, dezembro de 2016.
- AHMAD, M.; XU, D.; WANG, W. (2017). Type IA topoisomerases can be “magicians” for both DNA and RNA in all domains of life. *RNA Biology*, v.14, n.7, p. 854–864, maio de 2017.
- ALDERTON, G.K.; JOENJE, H.; VARON, R.; BØRGLUM, A.D.; JEGGO, P.A.; O’DRISCOLL, M. (2004). Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. *Human Molecular Genetics*, v.13, n.24, p.3127–3138, outubro de 2004.
- ALTCLAS, J.; ARSELÁN, S.; BARCÁN, L.; DIEZ, M.; GADANO, A.; JACOB, N.; MAIOLO, E.; NAGEL, C.; RIARTE, A.; RODRIGUEZ, V.; SCHIAVELLI, R.; SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.; LATTES, R.; CASADEI, D (2010). Chagas’ disease and Solid Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings*, v.42, n.9, p.3354–3359, 2010.
- ALVES, C.L.; REPOLÊS, B.M.; DA SILVA, M.S.; MENDES, I.C.; MARIN, P.A.; AGUIAR, P.H.N.; SANTOS, S.S.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; ANDRADE, L.O.; GUARNERI, A.A.; TAHARA, E.B.; ELIAS, M.C.; MACHADO, C.R. (2018). The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Scientific Reports*, v.8, n.1, p. 1-12, setembro de 2018.
- AWASTHI, P.; FOIANI, M.; KUMAR, A. (2015). ATM and ATR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, v.128, n.23, p.4255-4262, dezembro de 2015.

- BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, v.421, p.499-506, janeiro de 2003.
- BALANÑA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; GARCÍA-ESTRADA, C.; REGUERA, R.M. (2014). Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.4, n. 3, p.326–337, agosto de 2014.
- BANERJEE, B.; SEN, N.; MAJUMDER, H.K. (2011). Identification of a functional type IA topoisomerase, *LdTopIIIβ*, from kinetoplastid parasite *Leishmania donovani*. *Hindawi Enzyme Research*, v.2011, p. 1-10, fevereiro de 2011.
- BARLOW, C.; HIROTSUNE, S.; PAYLOR, R.; LIYANAGE, M.; ECKHAUS, M.; COLLINS, F.; SHILOH, Y.; CRAWLEY, J.N.; RIED, T.; TAGLE, D.; WYNshaw-BORIS, A. (1996). *Atm*-Deficient Mice: A Paradigm of Ataxia Telangiectasia. *Cell*, v.86, p.159–171, julho de 1996.
- BASS, T.E.; LUZWICK, J.W.; KAVANAUGH, G.; CARROLL, C.; DUNGRAWALA, H.; GLICK, G.G.; FELDKAMP, M.D.; PUTNEY, R.; CHAZIN, W.J.; CORTEZ, D. (2016). ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nature Cell Biology*, v.18, n. 11, p. 1185-1196, novembro de 2016.
- BATISTA, L.F.Z.; KAINA, B.; MENEGHINI, R.; MENCK, C.F.M. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research*, v.681, p.197–208, setembro de 2008.
- BENNETT, R.J.; NOIROT-GROS, M.; WANG, J.C. (2000). Interaction between Yeast Sgs1 Helicase and DNA Topoisomerase III. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.35, p. 26898–26905, setembro de 2000.
- BIZARD, A.H.; HICKSON, I.D. (2014). The Dissolution of Double Holliday Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.6, n.7, p.1-15, 2014.
- BOCQUET, N.; BIZARD, A.H.; ABDULRAHMAN, W.; LARSEN, L.B.; FATY, L. CAVADINI, S.; BUNKER, R.D.; KOWALCZYKOWSKI, S.C.; CEJKA, P.; HICKSON, I.D.; THOMÄ, N.H. (2014). Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by Topoisomerase III $\alpha$  and RMI1. *Nature structural & molecular biology*, v.21, n.3, p.261-268, março de 2014.
- BOOTHROYD, C. E.; DREESEN, O.; LEONOVA, T.; LY, K. I.; FIGUEIREDO, L. M.; CROSS, G. A. M.; PAPAVALIIOU, N. (2009). A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, v.459, n.14, p.278-282, maio de 2009.

- BRENER, Z.; CHIARI, E. (1963). Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.5, p.220-224, outubro de 1963.
- BROWN, E.J.; BALTIMORE, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & Development*, v.14, p.397–402, janeiro de 2000.
- CAPRANICO, G.; MARINELLO, J.; CHILLEMI, G. (2017). Type I DNA topoisomerases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.60, n.6, p. 2169-2192, janeiro de 2017.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention  
Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>  
Acesso em: 25 de janeiro de 2019.
- CERQUEIRA, P.G.; PASSOS-SILVA, D.G.; VIEIRA-DA-ROCHA, J.P.; MENDES, I.C.; DE OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, C.F.; VILELA, L.F.; NAGEM, R.A.; CARDOSO, J.; NARDELLI, S.C.; KRIEGER, M.A.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; SCHENKMAN, S.; GOMES, D.A.; GUERRA-SÁ, R.; MACHADO, C.R. (2017). Effect of ionizing radiation exposure on *Trypanosoma cruzi* ubiquitin-proteasome system. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.212, p.55-67, março de 2017.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.
- CHAMPOUX, J.J (2001). DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, v.70, p. 369–413, 2001.
- CHARRET, K.S.; REQUENA, C.E.; CASTILLO-ACOSTA, V.M.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; VIDAL, A.E. (2012). *Trypanosoma brucei* AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. *DNA repair*, v.11, n.1, p.53-64, janeiro de 2012.
- CHATELAIN, E. (2014). Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *Journal of Biomolecular Screening*, v.20, n.1, p. 22-35, agosto de 2014.
- CHATTERJEE, N.; WALKER, G.C. (2017). Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.58, p.235-263, março de 2017.
- CHEN, S.H.; CHAN, N.; HSIEH, T. (2013). Functional Insights into DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, v.82 p.139–170, março de 2013.

- CHUNG, L.H.; MURRAY, H. (2018). An extended sequence specificity for UV-induced DNA damage. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, v.178, p.133–142, outubro de 2017.
- CICCIA, A.; ELLEDGE, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making it Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, v.40, n.2, p.179-204, outubro de 2010.
- CIMPRICH, K.A.; CORTEZ, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.9, p.616-627, agosto de 2008.
- CORTEZ, D.; GUNTUKU, S.; QIN, J.; ELLEDGE, S.J. (2001). ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science*, v.294, n. 5547, p.1713-1716, novembro de 2001.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v.115, p.5-13, abril de 2010.
- CUYA, S.M.; BJORNSTI, M.; VAN WAARDENBURG, R.C.A.M. (2017). DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v.80, p.1-14, maio de 2017.
- DA SILVA, M.S.; P.S.; DAMASCENO, J.D.; MARQUES, C.A.; MCCULLOCH, R.; RICARDO, L.T., ORSINI, ELIAS, M.C. (2017). Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There are no Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends in Parasitology*, v.33, n.11, p. 858-874, novembro de 2017.
- DA SILVA, R.B.; MACHADO, C.R.; RODRIGUES, A.R.A.; PEDROSA, A.L. (2018). Selective human inhibitors of ATR and ATM render *Leishmania major* promastigotes sensitive to oxidative damage. *PLOS One*, v.13, n.9, p.1-15, setembro de 2018.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. (2014). Cisplatin in câncer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v.740, p.364-378, julho de 2014.
- DE KLEIN, A.; MUIJTJENS, M.; VAN OS, R.; VERHOEVEN, Y.; SMIT, B.; CARR, A.M.; LEHMANN, A.R.; HOEIJMAKERS, J.H.J. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Current Biology*, v.10, p.479–482, fevereiro de 2000.
- DE MOURA, M.B.; SCHAMBER-REIS, B.L.F.; PASSOS-SILVA, D.G.; RAJÃO, M.A.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.J.; TEXEIRA, S.M.R.; MACHADO, C.R. (2009). Cloning and Characterization of DNA Polymerase  $\eta$  from *Trypanosoma cruzi*: Roles for Translesion Bypass of Oxidative Damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.50, p.375-386, fevereiro de 2009.

- DELACROIX, S.; WAGNER, J. M.; KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO K.; KARNITZ, L.M. (2007). The Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & Development*, v.21, p.1472–1477, abril de 2007.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.251-261, março de 2005.
- DURANTE, I.M.; CÁMARA, M.M.; BUSCAGLIA, C.A. (2015). A Novel *Trypanosoma cruzi* Protein Associated to the Flagellar Pocket of Replicative Stages and Involved in Parasite Growth. *Plos One*, p.1-28, junho de 2015.
- ELLISON, V; STILLMAN, B. (2003). Biochemical Characterization of DNA Damage Checkpoint Complexes: Clamp Loader and Clamp Complexes with Specificity for 5' Recessed DNA. *Plos Biology*, v.1, n.2, p.231-243, agosto de 2003.
- EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; WESTENBERGER, S.J.; TRAN, A.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; LENA, A; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; FRANCO, J.; JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; AKEN, S.V.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v.309, p. 409-415, junho de 2005.
- ELSON, A.; WANG, Y.; DAUGHERTY, C.J.; MORTON, C.C.; ZHOU, F.; CAMPOSTORRES, J.; LEDER, P. (1996). Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.13084-13089, novembro de 1996.
- FERINGA, F.M.; RAAIJMAKERS, J.A.; HADDERS, M.A.; VAARTING, C.; MACUREK, L.; HEITINK, L.; KRENNING, L.; MEDEMA, R.H. (2018). Persistent repair intermediates induce senescence. *Nature Communications*, v.9, n.3923, p.1-10, setembro de 2018.

- FRAGKOS, M.; GANIER, O.; COULOMBE, P.; MÉCHALI, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.16, p.360-374, junho de 2015.
- GALANTI, N.; DVORAK, J.A.; GRENET, J.; MCDANIEL, J.P. (1994). Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Experimental Cell Research*, v.214, p.225-230, setembro de 1994.
- GANGLOFF, S.; McDONALD, J.P.; BENDIXEN, C.; ARTHUR, L.; ROTHSTEIN, R. (1994). The Yeast Type I Topoisomerase Top3 Interacts with Sgsl, a DNA Helicase Homolog: a Potential Eukaryotic Reverse Gyrase. *Molecular and Cellular Biology*, v.14, n.12, p. 8391-8398, dezembro de 1994.
- GARCIA, J.B.F.; DA ROCHA, J.P.V.; COSTA-SILVA, H.M.; ALVES, C.L.; MACHADO, C.R.; CRUZ, A.K. (2016). *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* present distinct DNA damage responses. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.207, p.23-32, maio de 2016.
- GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.J.; ACOSTA, N.; ARIAS, A.R.; MILES, M.A. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, v.421, p.936-939, fevereiro de 2003.
- GENOIS, M.M.; PAQUET, E.R.; LAFFITTE, M.C.N.; MAITY, R.; RODRIGUE, A.; QUELLETTE, M.; MASSON, J.Y. (2014). DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.78, n.1, p.40-73, março de 2014.
- GLOVER, L.; HORN, D. (2012). Trypanosomal histone  $\gamma$ H2A and the DNA damage response. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.183, p.78– 83, janeiro de 2012.
- GOODWIN, A.; WANG, S.; TODA, T.; NORBURY, C.; HICKSON, I.D. (1999). Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.20, p. 4050-4058, agosto de 1999.
- GOTO-ITO, S.; YAMAGATA, A.; TAKAHASHI, T.S.; SATO, Y.; FUKAI, S. (2017). Structural basis of the interaction between Topoisomerase III  $\beta$  and the TDRD3 auxiliary factor. *Scientific Reports*, v.7, n. 42123, p. 1-10, fevereiro de 2017.
- GRISARD, E.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; DE ALMEIDA, L.G.P.; STOCO, P.H.; GERBER, A.L.; TALAVERA-LOPEZ, C.; LIMA, O.C.; ANDERSSON, B.; DE VASCONCELOS, A.T.R. (2014). *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announcements*, v.2, n.1, p.1-2, fevereiro de 2014.
- HAAHR, P.; HOFFMANN, S.; TOLLENAERE, M.A.X.; HO, T.; TOLEDO, L.I.; MANN, M.; BEKKER-JENSEN, S.; RÄSCHLE, M.; MAILAND, N. (2016).

- Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nature Cell Biology*, v.18, n.11, p.1196-1207, novembro de 2016.
- HARMON, F.G.; DIGATE, R.J.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. (1999). RecQ Helicase and Topoisomerase III Comprise a Novel DNA Strand Passage Function: A Conserved Mechanism for Control of DNA Recombination. *Molecular Cell*, v.3, p.611-620, maio de 1999.
- HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell Perspective*, v.28, p. 739-745, dezembro de 2007.
- HARRELL, C.R.; DJONOV, V.; FELLABAUM, C.; VOLAREVIC, V. (2018). Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin. *International Journal of Medical Sciences*, v.15, n.3, p.274-279, dezembro de 2017.
- HASHIMOTO, H.; HISHIKI, A.; HARA, K.; KIKUCHI, S. (2017). Structural basis for the molecular interactions in DNA damage tolerances. *Biophysics and Physicobiology*, v.14, p.199-205, novembro de 2017.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, v.411, p.366-374, maio de 2001.
- HUANG, L.; WANG, Z.; NARAYANAN, N.; YANG, Y. (2018). Arginine methylation of the C-terminus RGG motif promotes TOP3B topoisomerase activity and stress granule localization. *Nucleic Acids Research*, v.46, n.6, p.3061–3074, fevereiro de 2018.
- JIMÉNEZ, P.; JAIMES, J.; POVEDA, C.; RAMÍREZ, J.D. (2018). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, v.146, n.3, p.269-283, julho de 2018.
- KIM, H.S.; CROSS, G.A.M. (2010). TOPO3 $\alpha$  influences antigenic variation by monitoring expression-site-associated VSG switching in *Trypanosoma brucei*. *Plos Pathogens*, v.6, n.7, p.1-14, julho de 2010.
- KITAO, H.; IIMORI, M.; KATAOKA, Y.; WAKASA, T.; TOKUNAGA, E.; SAEKI, H.; OKI, E.; MAEHARA, Y. (2017). DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Science*, v.109, p.264-271, novembro de 2017.
- KRAMARA, J.; OSIA, B.; MALKOVA, A. (2018). Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How. *Cell Press Trends in Genetics*, v.34, n.7, p.518-531, julho de 2018.
- LEWINSOHN, R. (2003). Prophet in His Own Country: Carlos Chagas and the Nobel Prize. *Perspectives in Biology and Medicine*, v.46, n.4, p.532-549, 2003.

- LI, F.; JIANG, T.; LI, Q.; LING, X. (2017). Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? *American Journal of Cancer Research*, v.7, n.12, p.2350-2394, novembro de 2017.
- LOPES, D. O.; SCHAMBER-REIS, B. L. F.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; RAJÃO, M. A.; DAROCHA, W. D.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; NARDELLI, S. C.; SCHENKMAN, S.; HOFFMANN, J.; CAZAUX, C.; PENA, S. D. J.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C. R. (2008). Biochemical studies with DNA polymerase  $\beta$  and DNA polymerase  $\beta$ -PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. *DNA repair*, v.7, p.1882-1892, setembro de 2008.
- LOPEZ-CONTRERAS, A.J.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. (2012). Signalling DNA Damage. In: Protein Phosphorylation in Human Health. *InTech - Open Science Open Minds*, p.233-262, 2012.
- LÜTZKENDORF, J.; WIEDUWILD, E.; NERGER, K.; LAMBRECHT, N.; SCHMOLL, J.; MÜLLER-TIDOW, C.; MÜLLER, L.P. (2017). Resistance for Genotoxic Damage in Mesenchymal Stromal Cells Is Increased by Hypoxia but Not Generally Dependent on p53-Regulated Cell Cycle Arrest. *Plos One*, v.12, n.1, p.1-14, janeiro de 2017.
- MAJKA, J.; BURGERS, P.M.J. (2003). Yeast Rad17-Mec3-Ddc1: A sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *PNAS*, v.100, n.5, p.2249-2254, março de 2003.
- MALIK, L.H.; SINGH, G.D.; AMSTERDAM, E.A. (2015). Chagas Heart Disease: An Update. *The American Journal of Medicine*, v.128, n.11, p.1-3, novembro de 2015.
- MALKOVA, A; IRA, G. (2013). Break-induced replication: functions and molecular mechanism. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.23, p.271–279, junho de 2013.
- MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A.C.V.; VELUDO, H.H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V.L.B.; TEIXEIRA, M.M.G. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, v.136, n.6, p. 641–655, maio de 2009.
- MARÉCHAL, A.; ZOU, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.5, n.9, p.1-18, setembro de 2013.

- MASLOV, D.A.; OPPERDOES, F.R.; KOSTYGOV, A.Y.; HASHIMI, H.; LUKE, J.; YURCHENKO, V. (2018). Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology*, v.146, p.1-27, abril de 2018.
- MAZOUZI, A.; VELIMEZI, G.; LOIZOUN, J.I. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*, v.329, n.1, p.85–93, setembro de 2014.
- MORDES, D.A.; NAM, E.A.; CORTEZ, D. (2008). Dpb11 activates the Mec1–Ddc2 complex. *PNAS*, v.105, n.48, p.18730–18734, dezembro de 2008.
- MUKHERJEE, A.; LANGSTON, L. D.; OUELLETTE, M. (2011). Intrachromosomal tandem duplication and repeat expansion during attempts to inactivate the subtelomeric essential gene GSH1 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Research*, v.39, n.17, p.7499–7511, junho de 2011.
- MUÑOZ, S.; MÉNDEZ, J. (2016). DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease. *Chromosoma*, v.126, n.1, p.1-15, janeiro de 2016.
- NICHOLLS, T.J.; NADALUTTI, C.A.; MOTORI, E.; TAYLOR, R.W.; GRIFFITH, J.D.; GUSTAFSSON, C.M. (2018). Topoisomerase 3 $\alpha$  is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. *Molecular Cell*, v.69, p.9-23, janeiro de 2018.
- NIKOLOVA, T.; ENSMINGER, M.; LÖBRICH, M.; KAINA, B. (2010). Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair*, v.9, p.1050-1063, julho de 2010.
- O'DRISCOLL, M.; RUIZ-PEREZ, V.L.; WOODS, C.G.; JEGGO, P.A.; GOODSHIP, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia–telangiectasia and Rad3–related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*, v.33, p.497-501, abril de 2003.
- OGI, T.; WALKER, S.; STIFF, T.; HOBSON, E.; LIMSIRICHAIKUL, S.; CARPENTER, G.; PRESCOTT, K.; SURI, M.; BYRD, P.J.; MATSUSE, M.; MITSUTAKE, N.; NAKAZAWA, Y.; VASUDEVAN, P.; BARROW, M.; STEWART, G.S.; TAYLOR, A.M.R.; O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P.A. (2012). Identification of the First ATRIP–Deficient Patient and Novel Mutations in ATR Define a Clinical Spectrum for ATR–ATRIP Seckel Syndrome. *PLOS Genetics*, v.8, n.11, p. e1002945, julho de 2012.
- PASSOS-SILVA, D.G.; SANTOS, S.S.; NARDELLI, S.C.; MENDES, I.C.; FREIRE, A.C.G.; REPOLÊS, B.M.; RESENDE, B.C.; COSTA-SILVA, H.M.; SILVA, V.S.; OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, C.F.B.; VILELA, L.F.F.; NAGEM, R.A.P.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; TAHARA, E.B.; SALES

- JUNIOR, P.A.; MOREIRA, D.S.; TEIXEIRA, S.M.R.; MCCULLOCH, R.; VIRGILIO, S.; TOSI, L.R.O.; SCHENKMAN, S.; ANDRADE, L.A.; MURTA, S.M.F.; MACHADO, C.R. (2018). 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, novembro de 2018.
- PAULL, T.T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annual Review of Biochemistry*, v.84, p.711-738, janeiro de 2015.
- PAVANI, R.S.; DA SILVA, M.S.; FERNANDES, C.A.; MORINI, F.S.; ARAUJO, C.B.; FONTES, M.R.; SANT'ANNA, O.A.; MACHADO, C.R.; CANO, M.I.; FRAGOSO, S.P.; ELIAS, M.C. (2016). Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.10, n.12, p.1-22, dezembro de 2016.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, v.391, n.10115, p.82-94, janeiro de 2018.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; PEREZ, A.M.; NORMAN, F.F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. (2015). Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Disease*, v.15, n.11, p.1347-1356, novembro de 2015.
- PETERMANN, E.; ORTA, M.L.; ISSAEVA, N.; SCHULTZ, N.; HELLEDAY, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell*, v. 37, p.492–502, fevereiro de 2010.
- POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.L.; MARCHAND, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Cell Press Chemistry and Biology*, v.17, n.5, p.421-433, maio de 2010.
- POMMIER, Y.; SUN, Y.; HUANG, S.N.; NITISS, J.L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.17, n.11, p.703–721, novembro de 2016.
- RAJÃO, M. A.; PASSOS-SILVA, D. G.; DAROCHA, W. D.; FRANCO, G. R.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; TEIXEIRA, S. M.; MACHADO, C. R. (2009). 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, novembro de 2008.
- RAJÃO, M. A. (2011). Síntese translesão e Reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: caracterização funcional da DNA polimerase kappa e análise da remoção de lesões no DNA nuclear e mitocondrial. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, abril de 2011.

- RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v.26, p.275–291, 2012.
- RAUEN, M.; BURTELOW, M.A.; DUFAULT, V.M.; KARNITZ, L.M. (2000). The Human Checkpoint Protein hRad17 Interacts with the PCNA-like Proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.38, p.29767–29771, setembro de 2000.
- REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J.M.; PASSOS-SILVA, D.G.; FURTADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L.; PEREIRA, M. T.; DAROCHA, W. D.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; HOFFMANN, J.S.; CAZAUX, C.; PENA, S.D.J.; TEIXEIRA, S.M.R.; MACHADO, C.R. (2006). Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.149, p. 191–200, maio de 2006.
- ROGAKOU, E.P.; PILCH, D.R.; ORR, A.H.; IVANOVA, V.S.; BONNER, W.M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.10, p. 5858–5868, março de 1998.
- ROTHBLUM-OVIATT, C.; WRIGHT, J.; LEFTON-GREIF, M.A.; MCGRATH-MORROW, S.A.; CRAWFORD, T.O.; LEDERMAN, H.M. (2016). Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v.11, n.159, p.1-21, novembro de 2016.
- SAGE, E.; SHIKAZONO, N. (2017). Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, v.107, p.125–135, dezembro de 2016.
- SALDIVAR, J.C.; CORTEZ, D.; CIMPRICH, K.A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.18, n.10, p.622-636, agosto de 2017.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.J.; PADILLA, A.; WANG, W.; ORR, D.; TARLETON, R.L. (2018). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*, v.7, p.1-20, março de 2018.
- SCOCCA, J.R.; SHAPIRO, T.A. (2008). A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Molecular Microbiology*, v.67, n.4, p.820–829, fevereiro de 2008.
- SEKI, M.; NAKAGAWA, T.; SEKI, T.; KATO, G.; TADA, S.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIMURA, A.; KOBAYASHI, T.; AOKI, A.; OTSUKI, M.; HABERMANN, F.A.; TANABE, H.; ISHII, Y.; ENOMOTO, T. (2006). Bloom Helicase and DNA

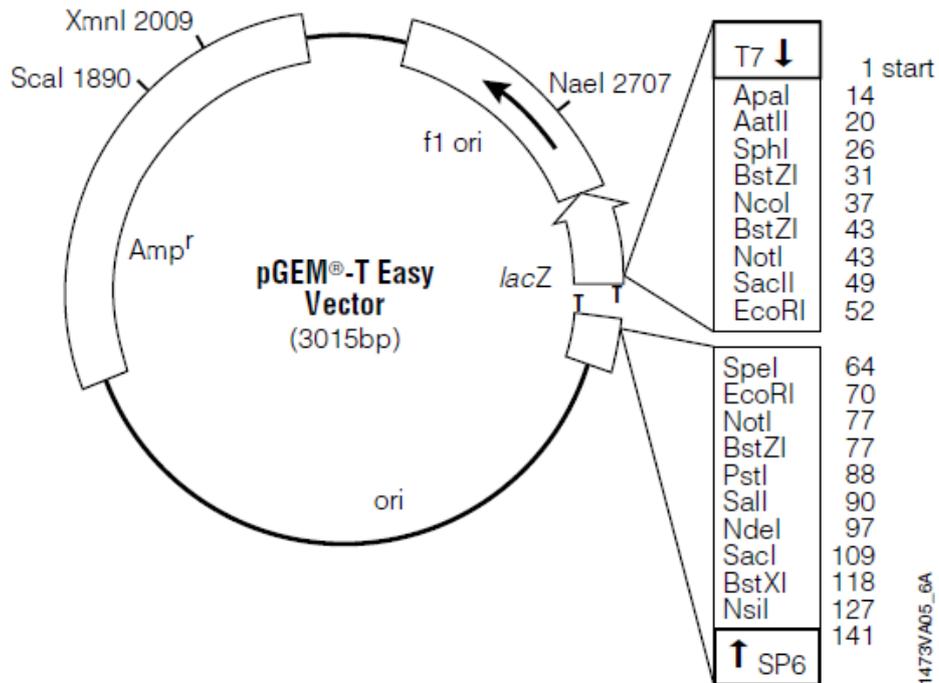
- Topoisomerase III $\alpha$  Are Involved in the Dissolution of Sister Chromatids. *Molecular and Cellular Biology*, v26, n.16, p. 6299–6307, agosto de 2006.
- SHILOH, Y.; ZIV, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.14, p.197-210, abril de 2013.
- SIAW, G.E.; LIU, I.; LIN, P.; BEEN, M.D.; HSIEH, T. (2016). DNA and RNA topoisomerase activities of Top3  $\beta$  are promoted by mediator protein Tudor. *PNAS*, v.113, n.38, p. E5544-E5551, agosto de 2016.
- SINGH, A.; XU, Y. (2016). The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes*, v.7, n.99, p.1-15, novembro de 2016.
- SORENSEN, C.M.; BARRY M.A.; EASTMAN, A. (1990). Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*, v.82, n.9, p.749-755, maio de 1990.
- SPAMPINATO, C.P. (2016). Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.74, n.9, p.1693-1709, dezembro de 2016.
- STOLL, G.; PIETILÄINEN, O.P.H.; LINDER, B.; SUVISAARI, J.; BROSI, C.; HENNAH, W.; LEPPÄ, V.; TORNIAINEN, M.; RIPATTI, S.; ALA-MELLO, S.; PLÖTTNER, O.; REHNSTRÖM, K.; TUULIO-HENRIKSSON, A.; VARILO, T.; TALLILA, J.; KRISTIANSSON, K.; ISOHANNI, M.; KAPRIO, J.; ERIKSSON, J.G.; RAITAKARI, O.T.; LEHTIMÄKI, T.; JARVELIN, M.; SALOMAA, V.; HURLES, M.; STEFANSSON, H.; PELTONEN, L.; SULLIVAN, P.F.; PAUNIO, T.; LÖNNQVIST, J.; DALY, M.J.; FISCHER, U.; FREIMER, N.B.; PALOTIE, A. (2013). Deletion of TOP3 $\beta$ , a component of FMRP-containing mRNPs, contributes to neurodevelopmental disorders. *Nature Neurosciences*, v.16, n.9, p.1228-1237, setembro de 2013.
- STORTZ, J.A.; SERAFIM, T.D.; ALSFORD, S.; WILKES, J.; FERNANDEZ-CORTES, F.; HAMILTON, G.; BRIGGS, E.; LEMGRUBER, L.; HORN, D.; MOTTRAM, J.C.; MCCULLOCH, R. Genome-wide and protein kinase-focused RNAi screens reveal conserved and novel damage response pathways in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens*, v.13, n.7, p. e1006477, junho de 2017.
- STUCKI, M.; JACKSON, S.P. (2006).  $\gamma$ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair*, v.5, n.5, p.534-543, janeiro de 2006.
- TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. (2012). 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.1-13, agosto de 2012.

- TSAI, H.; LIN, R.; HSIEH, T. (2016). *Drosophila* mitochondrial topoisomerase III alpha affects the aging process via maintenance of mitochondrial function and genome integrity. *Journal of Biomedical Science*, v.23, n.38, p.1-11, abril de 2016.
- UMAKI, A.C.S. (2013). Caracterização das topoisomerasas III $\alpha$  e III $\beta$  de *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná, Curitiba, setembro de 2013.
- VANRELL, M.C.; LOSINNO, A.D.; CUETO, J.A.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.V.; CARRILLO, C.; ROMANO, P.S. (2017). The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.11, n.11, p.1-23, outubro de 2017.
- VIEIRA-DA-ROCHA, J.P.; PASSOS-SILVA, D.G.; MENDES, I.C.; ROCHA, E.A.; GOMES, D.A.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R. (2019). The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. *DNA Repair*, v.73, p.78-90, novembro de 2018.
- WAGNER, J.M.; KARNITZ, L.M. (2009). Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival. *Molecular Pharmacology*, v.76, n.1, p.208-214, julho de 2009.
- WANG, Y.; LYU, Y.L.; WANG, J.C. (2002). Dual localization of human DNA topoisomerase III $\alpha$  to mitochondria and nucleus. *PNAS*, v.99, n.19, p.12114-12119, setembro de 2002.
- WANG, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.3, p.430-440, junho de 2002.
- WHO – World Health Organization  
Disponível em: [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))  
Acesso em: 25 de janeiro de 2019.
- WYATT, M.D.; PITTMAN, D.L. (2006). Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. *Chemical Research in Toxicology*, v.19, n.12, p.1580–1594, outubro de 2006.
- XU, Y.; ASHLEY, T.; BRAINERD, E.E.; BRONSON, R.T.; MEYN, M.S.; BALTIMORE, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes & Development*, v.10, p.2411-2422, agosto de 1996.
- XU, D.; SHEN, W.; GUO, R.; XUE, Y.; PENG, W.; SIMA, J.; YANG, J.; SHAROV, A.; SRIKANTAN, S.; YANG, J.; FOX III, D.; QIAN, Y.; MARTINDALE, J.L.; PIAO, Y.; MACHAMER, J.; JOSHI, S.R.; MOHANTY, S.; SHAW, A.C.; LLOYD, T.E.; BROWN, G.W.; KO, M.S.H.; GOROSPE, M.; ZOU, S.; WANG, W. (2013). Top3 $\beta$  is an RNA topoisomerase that works with fragile X syndrome

- protein to promote synapse formation. *Nature Neuroscience*, v.16, n.9, p.1238-1247, setembro de 2013.
- YANG, J.; BACHRATI, C.Z.; OU, J.; HICKSON, I.D.; BROWN, G.W. (2010). Human Topoisomerase III $\alpha$  is a Single-stranded DNA Decatenase That is Stimulated by BLM and RMI1. *The Journal of Biological Chemistry*, v.285, n.28, p.21426–21436, julho de 2010.
- YANG, Y.; MCBRIDE, K.M.; HENSLEY, S.; LU, Y.; CHEDIN, F.; BEDFORD, M.T. (2014). Arginine Methylation Facilitates the Recruitment of TOP3B to Chromatin to Prevent R Loop Accumulation. *Molecular Cell*, v.53, n.3, p.484–497, fevereiro de 2014.
- ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, v.16, n.1, p.1-8, janeiro de 2014.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.7, p.1051-1054, novembro de 2009.
- ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v.12, n.2, p.240-253, março de 2012.
- ZINGALES, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, v.184, p.38-52, agosto de 2018.
- ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, v.300, p.1542-1548, junho de 2003.
- ZOU, L.; LIU, D.; ELLEDGE, S.J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *PNAS*, v.100, n.24, p.13827–13832, novembro de 2003.
- ZUMA, A.A.; MENDES, I.C.; REIGNAULT, L.C.; ELIAS, M.C.; DE SOUZA, W.; MACHADO, C.R.; MOTTA, M.C.M. (2014). How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.193, n.2, p. 93–100, fevereiro de 2014.

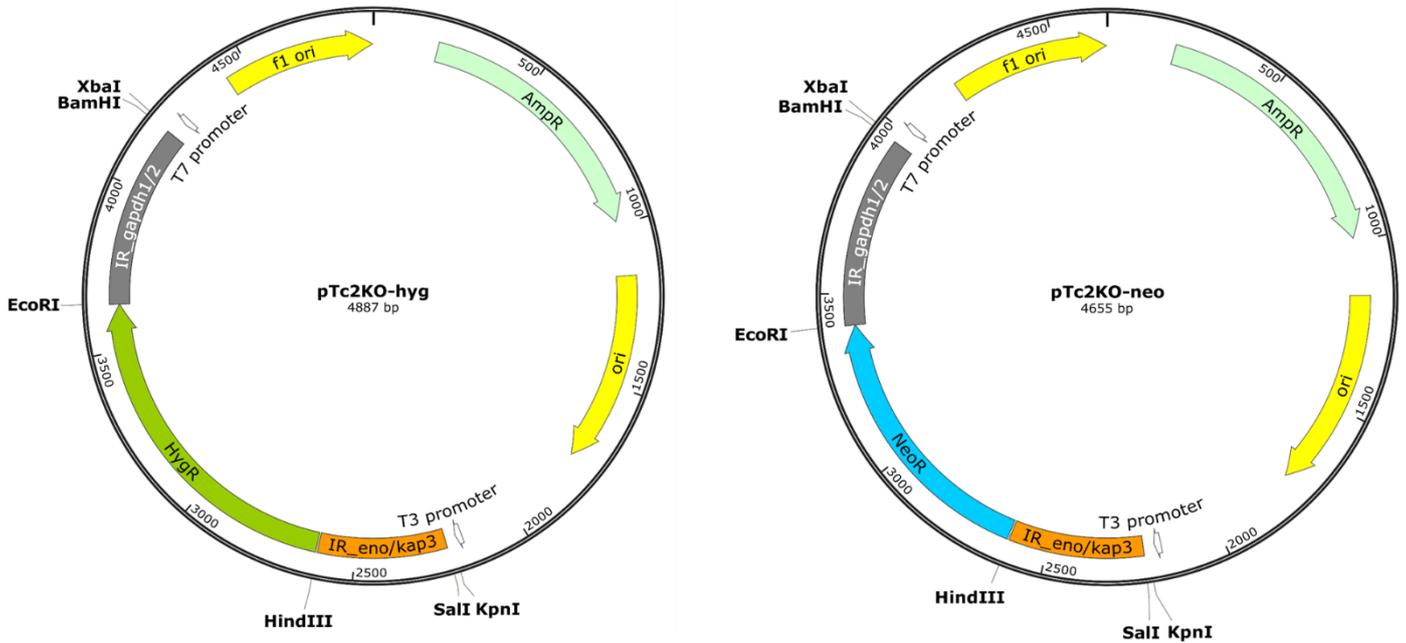
## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1: Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega)



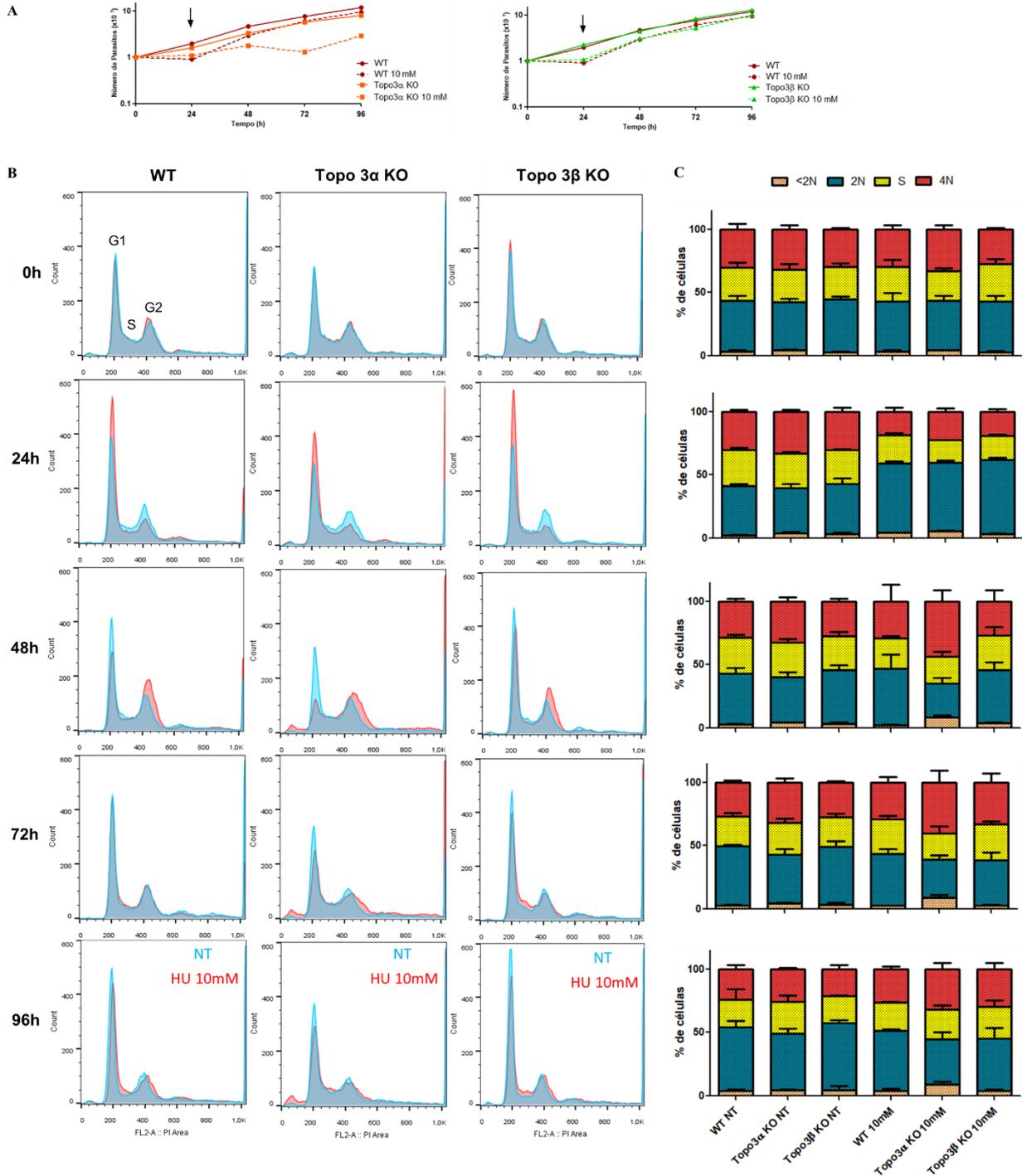
Desenho esquemático do vetor pGEM-T Easy mostrando as características do vetor como a presença da origem de replicação (ori), o gene de resistência à ampicilina (Amp<sup>R</sup>), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem que se localiza na região codificadora da enzima galactosidase.

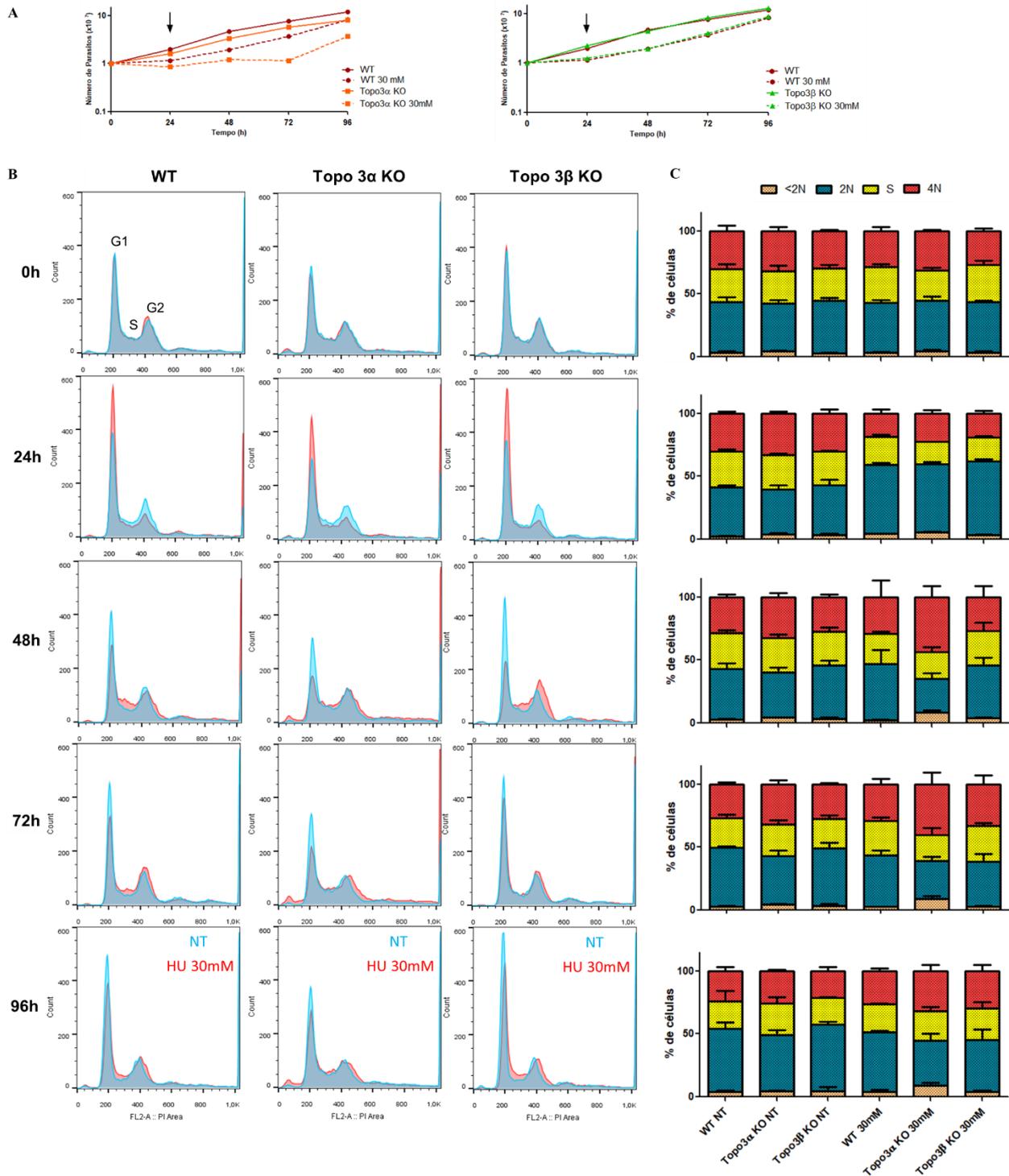
## 8.2. ANEXO 2: Mapas dos vetores pTc2KO-Higro e pTc2KO-Neo



Desenho esquemático dos vetores pTc2KO-Higro (à esquerda) e pTc2KO-Neo (à direita) construído no laboratório do Dr. Stenio Perdigão Fragoso (Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná). O mapa mostra as características do vetor como a presença da origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência à ampicilina (Amp<sup>R</sup>), os promotores T3 e T7, os genes de resistências à higromicina e à neomicina (Hygro<sup>R</sup> e Neo<sup>R</sup>) flanqueado por regiões intergênicas não reguladas de *T. cruzi* e os sítios de restrição enzimática.

### 8.3. ANEXO 3: Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com 10 mM ou 30 mM de HU



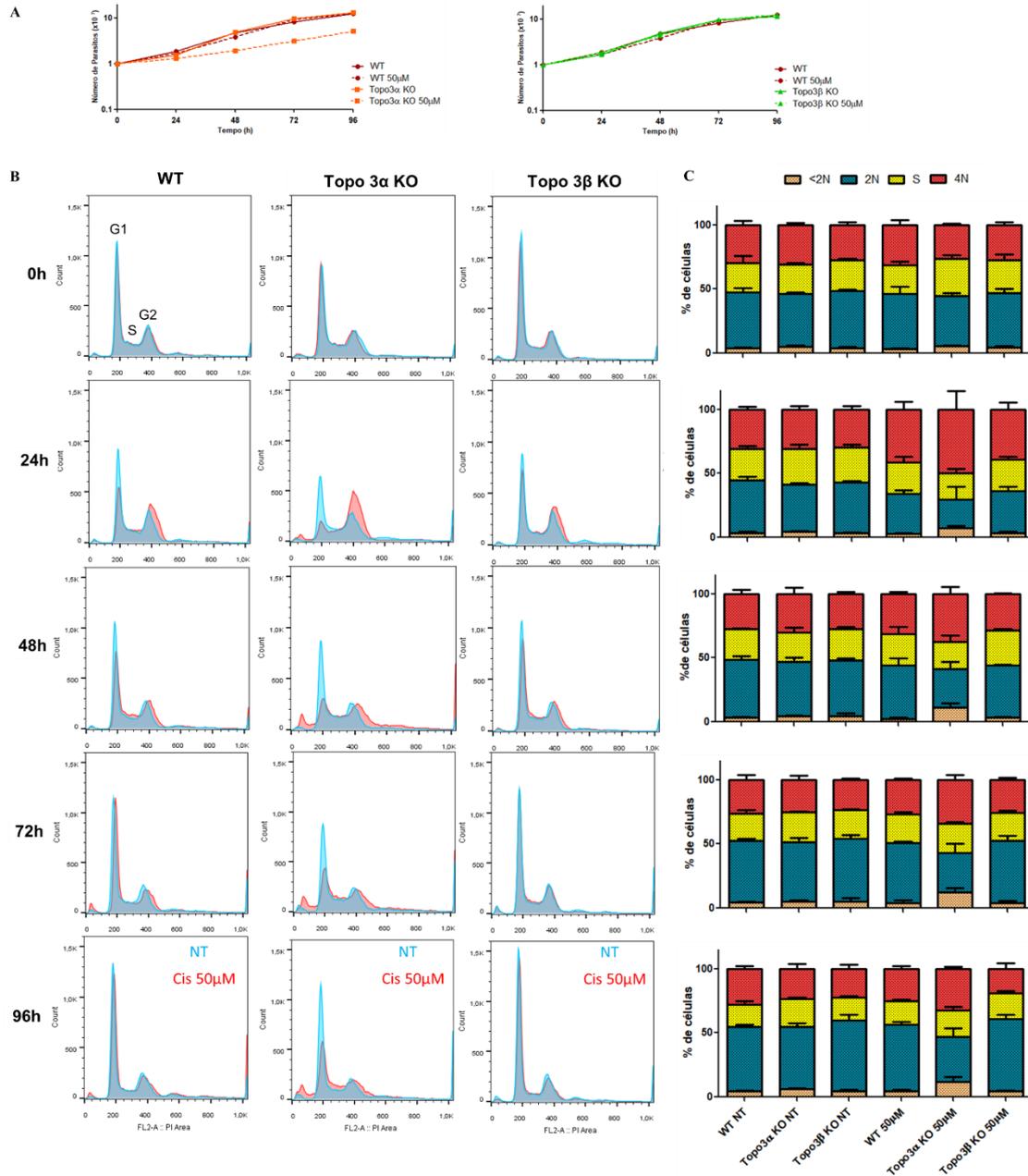


A) Perfil de crescimento das culturas selvagens (WT), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) tratadas com 10 mM ou 30 mM de HU durante este experimento. B) A cada 24 horas, amostras foram recolhidas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por FACS. A progressão do ciclo celular

é apresentada no histograma representativo. Em todos os histogramas, as curvas azuis representam as células não tratadas e as vermelhas referem-se as células expostas à droga.

C) Os gráficos com a média da quantificação do número de células em cada fase em três experimentos independentes.

## 8.4. ANEXO 4: Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com 50 $\mu\text{M}$ de cisplatina



A) Perfil de crescimento das culturas selvagens (WT), nocaute para topoisomerase 3 $\alpha$  (Topo3 $\alpha$  KO) e nocaute para topoisomerase 3 $\beta$  (Topo3 $\beta$  KO) tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de Cis durante este experimento. B) A cada 24 horas, amostras foram recolhidas, marcadas com

iodeto de propídeo e analisadas por FACS. A progressão do ciclo celular é apresentada no histograma representativo. Em todos os histogramas, as curvas azuis representam as células não tratadas e as vermelhas referem-se as células expostas à droga. C) Os gráficos com a média da quantificação do número de células em cada fase em três experimentos independentes.

## 8.5. ANEXO 5: Manuscrito do artigo da tese

### **DNA topoisomerase 3 $\alpha$ is involved in homologous recombination and replicative stress response in *Trypanosoma cruzi***

Héllida Marina Costa-Silva<sup>1</sup>, Adriana Castilhos Souza Umaki<sup>2</sup>, Andrea Mara Macedo<sup>1</sup>, Glória Regina Franco<sup>1</sup>, Erich Birelli Tahara<sup>1</sup>, Sérgio Danilo Junho Pena<sup>1</sup>, Carlos Renato Machado<sup>1</sup> and Stenio Perdigão Fragoso<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup> Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba, 81350-010, PR, Brazil

Corresponding authors:

Carlos Renato Machado. E-mail: crmachad1967@gmail.com

Stenio Perdigão Fragoso. E-mail: sfragoso@fiocruz.br

#### **Summary**

DNA topoisomerases are essential enzymes for all domains of life that are able to control DNA topology. Several studies have suggested the importance of topoisomerase 3 $\alpha$  to maintain genomic stability, since this enzyme is implicated at the end of DNA replication, sister chromatid separation and dissolution of recombination intermediates such as double Holliday junctions. The trypanosomatids genome encodes to topoisomerase 3 $\alpha$  gene, but its functions are unclear in *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes Chagas disease. Here was generated a topoisomerase 3 $\alpha$  knockout parasite (TcTopo3 $\alpha$  KO), which allowed to evaluate the role of this gene in response to several DNA damage agents. The TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were not able to recovery the growth after gamma radiation, although it was still alive, which suggests that TcTopo3 $\alpha$  is involved in homologous recombination repair. Moreover, in relation to wild type parasites, the TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were more sensitive to treatment with cisplatin, hydroxyurea (HU) and methyl methane sulfonate (MMS), which indicates that TcTopo3 $\alpha$  acts during the replication stress caused by these drugs. The phenotype observed after MMS treatment was similar

to that observed with gamma radiation, while the treatment with cisplatin and HU slowed down cell growth but did not prevent the growth resumption. Western blot analysis using  $\gamma$ H2A antibody showed that only TcTopo3 $\alpha$  KO cells were not able to repair the DNA damage induced by these genotoxic agents. TcTopo3 $\alpha$  is not involved in all kinds of replicative stress response since the knockout cells were not sensitive to camptothecin and ultraviolet light treatments. Thus, topoisomerase 3 $\alpha$  is important for homologous recombination repair and in the replicative stress in *T. cruzi*, although all the pathways in which this enzyme participates during the replicative stress remains elusive.

**Keywords:** DNA topoisomerase 3 $\alpha$ , *Trypanosoma cruzi*, DNA damage, homologous recombination, replicative stress, DNA repair

## Introduction

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, also known as American trypanosomiasis. This disease, endemic in Latin America, has been spreading to other continents due to migratory flow. Around 6 million people worldwide are infected by this parasite (WHO, 2018). *T. cruzi* belongs to the order Kinetoplastida, which includes the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*. These organisms possess a single mitochondrion that contains the kinetoplast, a structure formed by a network of circular DNA (DOCAMPO et al., 2005).

DNA topoisomerases are enzymes found in eukaryotes, prokaryotes, archaea and some viruses capable of controlling DNA supercoiling (CAPRANICO et al., 2017). These enzymes are essential to solve topological problems generated during DNA metabolism and gene expression (CUYA et al., 2017). The topoisomerases perform their functions via a transesterification reaction in which the phosphate group of the DNA backbone undergoes a nucleophilic attack of the hydroxyl group of a tyrosine residue of the enzyme. This cleaves the DNA phosphodiester bond and covalently binds one of the ends formed to the topoisomerase, allowing the passage of the other strand or the other DNA double helix. Then, the cleaved strand is rejoined by another transesterification reaction, which is the reverse of the first one (WANG, 2002). The reaction catalyzed by the topoisomerases does not change the DNA sequence and is not dependent on sequence recognition, so these enzymes can act on any region of the DNA with torsional problems (POMMIER et al., 2010; POMMIER et al., 2016).

The topoisomerases perform the same general chemical reaction, however there is some structural differences among them that lead to differences in the mechanisms of catalysis, generating a certain specificity of substrates and biological functions (CAPRANICO et al., 2017). Thus, DNA topoisomerases are classified as type I and type II. Type I enzymes are capable of cleaving DNA single strands, while type II topoisomerases form dimers to cleave DNA double strands, in an ATP-dependent manner. Each topoisomerase type can be subdivided into two subfamilies: IA, IB, IIA and IIB (WANG, 2002). Each subfamily plays specific roles within the cell, allowing precise coordination of the topological state of DNA throughout the cell cycle (POMMIER et al., 2016).

The topoisomerases type IA can relax the negative supercoiling that occur during DNA replication elongation and DNA transcription. Furthermore, due to their ability to catalyze single strand decatenation, they can act at the termination of DNA replication, chromosome segregation and dissolution of recombination repair intermediates. This indicates the role of these enzymes in maintaining genomic stability (POMMIER et al., 2016). Two genes encoding topoisomerases of the subfamily IA were identified in the bacteria. Prokaryotic proteins are named topoisomerase 1 and topoisomerase 3. Eukaryotes have only topoisomerase 3, and in the higher eukaryotes there are two isoforms of this enzyme, called topoisomerase 3 $\alpha$  and topoisomerase 3 $\beta$  (CAPRANICO et al., 2017).

Some eukaryotic cells express a nuclear and a mitochondrial isoform of DNA topoisomerase 3 $\alpha$ . Both enzymes are encoded in the nucleus by the same gene and the mitochondrial version is produced by an alternative translation initiation site, prior to the codon that initiates the nuclear enzyme translation (WANG, 2002). Studies in *Drosophila melanogaster* suggest that mitochondrial topoisomerase 3 $\alpha$  is responsible for the maintenance of DNA integrity in this organelle (TSAI et al., 2016). Recently, it has been reported that topoisomerase 3 $\alpha$  present in human mitochondria is essential for the replication and segregation of the mitochondrial DNA (NICHOLLS et al., 2018).

At the end of homologous recombination repair is necessary the dissipation of the double Holliday junctions, which allows the separation between the two chromosomes. In humans, DNA topoisomerase 3 $\alpha$  forms a complex with BLM, a RecQ DNA helicase, and with RMI1/2 factors, which can dissolve the double Holliday junctions, generating noncrossover products (YANG et al., 2010). It is known that the physical interaction

among these proteins is required to promote the dissolution of these structures. The BLM helicase is responsible for the convergent branch migration of the junctions. The catalytic action of the helicase provides a substrate of single strand DNA, the hemicatenanes, which can be processed by topoisomerase 3 $\alpha$ . The RMI1/2 binding modulates the topoisomerase decatenation activity, making the dissolution of the Holliday junctions more efficient (BIZARD AND HICKSON, 2014; BOCQUET et al., 2014). The physical and functional interaction between topoisomerases type IA and RecQ helicases has already been observed in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and other vertebrate cells (BENNETT et al., 2000; GANGLOFF et al., 1994; GOODWIN et al., 1999; HARMON et al., 1999; SEKI et al., 2006). Thus, DNA topoisomerase 3 $\alpha$  contributes to genomic stability by preventing chromosome rearrangement and allowing the completion of homologous recombination (CAPRANICO et al., 2017).

Analysis of the available sequence in the database has shown that trypanosomatids have a complete set of the various types of DNA topoisomerases in their genome. In these parasites, the enzymes of the subfamily IA are termed topoisomerase IA, topoisomerase 3 $\alpha$  and topoisomerase 3 $\beta$ . The topoisomerases of this subfamily are phylogenetically well conserved and are compartmentalized in the nucleus and mitochondria of trypanosomatids (BALAÑA-FOUCE et al., 2014). Studies in *T. brucei* showed that topoisomerase 3 $\alpha$  is important for the antigenic variation mediated by homologous recombination (KIM AND CROSS, 2010). Although the relevant role played by topoisomerase 3 $\alpha$  in eukaryotic cells, there is no information about this enzyme in *T. cruzi*. Here we analyze the effect of topoisomerase 3 $\alpha$  gene depletion. We showed that this enzyme is necessary to repair DNA double strand breaks (DSBs) generated after gamma radiation. Furthermore, the topoisomerase 3 $\alpha$  absence influenced the fork replication recovery after cisplatin, hydroxyurea and methyl methane sulfonate (MMS) treatments.

## **Material and methods**

### *Cell cultures and growth conditions*

Epimastigotes forms of *T. cruzi* Dm28c strain were cultivated in liver infusion tryptose (LIT) medium pH 7.4 supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Gibco) and 1% streptomycin/penicillin (Invitrogen), at 28 °C. For the culturing of knockout parasites

were added 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of hygromycin B (Invitrogen) and neomycin (G418 sulfate - Gibco) antibiotics in the culture medium.

#### *Construction of topoisomerase 3 $\alpha$ knockout parasites*

To generate knockout parasites the regions comprising the nucleotides 67 up 401 (5'CDS3 $\alpha$  – 334 bp of length) and 2391 up 2747 (3'CDS3 $\alpha$  – 356 bp of length) of coding sequence of TcTopo3 $\alpha$  gene (GenBank: AY850132 - 2766 bp of length) were amplified from *T. cruzi* Dm28c genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). To amplify the region 5'CDS3 $\alpha$  was used the primers 5'- GTC CGG TAC CAA CGG TAC CTG CAG GAT GGG C - 3' (forward) and 5'- GAT GGT CGA CCT CCT GTT GAC CCC CTG A – 3' (reverse). The region 3'CDS3 $\alpha$  was amplified with the primers 5' – TAT GGG ATC CTT TTG GTG GTA TGC CGA GTG TC -3' (forward) and 5' – GGA ATC TAG AAA AGA ACA CTT TCG AGC AGC ACA T - 3' (reverse). The 5'CDS3 $\alpha$  fragment was digested with *KpnI* and *SalI* restriction enzymes (New England Biolabs) while 3'CDS3 $\alpha$  fragment was digested with *BamHI* and *XbaI* restriction enzymes (New England Biolabs). Both fragments were cloned into pTc2KO-neo or pTc2KO-hygro vectors, which carry neomycin or hygromycin B resistance gene (PAVANI et al., 2016). This resulted in the construction of complete deletion cassettes, called pNEO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  and pHYGRO $\Delta$ Topo3 $\alpha$ . The pNEO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  cassette was amplified by PCR and it was transfected into wild type (WT) *T. cruzi* epimastigotes as previously described (SOUZA et al., 2010). The selection occurred in LIT medium with 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of G418 until the death of control parasites. To confirm the insertion of the cassette in the correct loci was performed a PCR with genomic DNA of transfected parasites. In these reactions were used the primers 5'- CGT TCT AGA TGA TTG AAC AAG ATG GAT TG - 3' (forward) and 5'- CAG TCC CTA CGA AGA TGA TCC GTC GCC GAG C -3' (reverse). The forward primer is located inside the neomycin resistance gene whereas the reverse primer is located 434 bp downstream of the TcTopo3 $\alpha$  gene. After that, these parasites were transfected with pHYGRO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  cassette as described above. The selection occurred in LIT medium with 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of G418 and hygromycin B until the death of control parasites. Once again, the correct insertion of the cassette was tested in the selected parasites by PCR. For that was used the primer 5' – GGG GGA AGC TTA TAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC – 3' (forward), which is located inside the hygromycin B resistance gene and the same reverse primer described above.

### *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Southern blot analysis*

To confirm the absence of topoisomerase 3 $\alpha$  gene in the mutant parasites, the chromosomes from WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells were separated by PFGE using the LKB Pulsaphor (Pharmacia). Exponential growth parasites were recovered from LIT medium and washed with PBS buffer twice. Then the cells were resuspended in PSG buffer and mixed with an equal volume of 1% low-melting point agarose. To prepare these agarose blocks containing intact chromosomes was used  $2 \times 10^7$  parasites for each block. The blocks were incubated with a lysis solution (0.5 M EDTA pH 9, 1% sarkosyl and 0.5 mg/mL proteinase K) at 50°C for 50 hours. After this time, the blocks were stored in that solution at 4°C. Before the electrophoresis, the blocks were incubated three times with 50 mM EDTA pH 8 for 1 hour. The blocks were subjected to PFGE on 1.2 % agarose gel in 0.5X TBE buffer at 10°C. Chromosomes from yeast *Hansenula wingei* (1.05 to 3.13 Mbp) were used as molecular weight marker (CHEF DNA Size Markers – Biorad). The PFGE was carried out in a constant voltage of 100V for 135 hours with five phases of pulses (N/S, E/W): 90 s for 30 hours, 200 s for 30 hours, 350 s for 25 hours, 500 s for 25 hours and 800 s for 25 hours. Following electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and photographed with L-Pix photodocumentation system (Loccus Biotecnologia). The Southern blot analysis was performed according to standard protocols (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001). To detect specific DNA sequences, DNA bands were transferred to nylon membranes and hybridized with probes for topoisomerase 3 $\alpha$  [5'- GGT GTA CCC GTA TGA ACG ATG GCA – 3' (forward) and 5' – AGT GCC GGG AGG CGG CGA TGT AAA AC – 3' (reverse)], hygromycin [5' – GGG GGA AGC TTA TAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC – 3' (forward) and 5'- GGG TGA ATT CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT GCT G – 3' (reverse)] and neomycin [5' – CGT TCT AGA TGA TTG AAC AAG ATG GAT TG – 3' (forward) and 5' – AGA GCC GCG GTC AGA AGA ACT CGT CAA – 3' (reverse)] genes. All probes were radioactively labeled with  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dCTP using the Nick Translation Labeling Kit (Invitrogen) following manufacturer's recommendations.

### *Epimastigotes growth curves*

To verify whether topoisomerase 3 $\alpha$  gene is important during DSB repair in *T. cruzi* the growth profile of WT parasites was compared to TcTopo3 $\alpha$  KO parasites after gamma

radiation exposure. The parasites were irradiated with a dose of 1541 Gy.h<sup>-1</sup> for 19 minutes and 28 seconds using a cobalt (<sup>60</sup>C) irradiator located at Laboratório de Irradiação Gama (CDTN/CNEN, UFMG). Additionally, to analyze the role played by TcTopo3 $\alpha$  gene during the replicative stress, growth curves were performed with some genotoxic agents able to halt replication forks. For camptothecin (CPT) treatment, the parasites were incubated with 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 15  $\mu$ M CPT in LIT medium at 28°C for 48 hours. After this time, the CPT was removed from the culture medium. The cells were washed with PBS buffer and resuspended in a fresh LIT medium at 28°C. For cisplatin (Cis) treatment, the parasites were incubated with 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M Cis in PBS buffer for one hour at 28°C. After that, the cells were washed to remove the drug. Then the parasites were resuspended in a fresh LIT medium at 28°C. For hydroxyurea (HU) treatment, the parasites were incubated with 10 mM, 20 mM or 30 mM HU in LIT medium at 28°C for 24 hours. After this time, the HU was removed from the culture medium. The cells were extensively washed with PBS buffer and resuspended in a fresh LIT medium at 28°C. For methyl methane sulfonate (MMS) treatment, the parasites were incubated with 1.5 mM MMS in PBS buffer for one hour at 28°C. After this time, the cells were washed to remove the drug. Then the parasites were incubated in a fresh LIT medium at 28°C. For ultraviolet (UV) light treatment, parasites in LIT medium were exposed to 1500 J.m<sup>-2</sup> UVC using the Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene) apparatus. All growth curves were initiated at the density of 1x10<sup>7</sup> cells.mL<sup>-1</sup> with cells in log phase growth. The cells were counted every day until the control cells reached stationary phase. The number of parasites was determined using a cytometry chamber and vital dye erythrosine, which allows differentiating living and dead cells. For all treatments tested, it was performed at least three independent experiments in triplicate.

#### *Analysis of cell cycle progression by flow cytometry*

In order to evaluate the cell cycle alterations due to replicative stress, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were analyzed by flow cytometry after treatment with Cis (50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M), HU (10 mM, 20 mM or 30 mM) or MMS (1.5 mM). Cells in log phase growth were treated with these drugs as described above and each 24 hours samples were collected to cell cycle progression assay. Thus, 1x10<sup>7</sup> cells.mL<sup>-1</sup> were harvested by centrifugation at 2.500 g for 10 minutes, washed with PBS buffer and fixed in EtOH 70% at -20°C for at least 16 hours. To DNA staining, the cells were washed and resuspended in PBS buffer

containing 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNase A (Invitrogen) and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  propidium iodide (BD Pharmingen). The samples were incubated in the dark at 37°C for 30 minutes. The data was collected at FACSCan or FACSCalibur flow cytometer (Benckton-Dickson) and the data acquired for 10,000 events was analyzed with the software FlowJo VX.

#### *Preparation of protein extracts and Western blot analysis*

To measure the level of DNA damage in WT and Topo3 $\alpha$  KO parasites after treatment with Cis (100  $\mu\text{M}$ ), HU (20 mM) or MMS (1.5 mM) was performed a Western blot assay. To prepare the protein extracts  $1\times 10^8$  cells from each culture were harvested by centrifugation at 2.500 g for 10 minutes and was washed twice with PBS buffer. The cells were lysed with 50  $\mu\text{L}$  of sample buffer 2X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulfate, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 200 mM dithiothreitol). Then the samples were sonicated in the Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific) apparatus at 30% maximum amplitude for 5 cycles of 20 seconds, with an interval of 20 seconds. After that, the samples were boiled for 10 minutes and were stored at -20°C. Protein concentration was determined using the Bradford method (BRADFORD, 1976). To separate the proteins according to their size was performed a SDS-PAGE. Both the 5% stacking gel and the 15% separation gel were prepared following standard protocols (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001). The protein extracts were thawed and were boiled for 5 minutes. The electrophoresis was carried out at 125 V for 2 hours with 15  $\mu\text{g}$  of each protein extract. Then, proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane using the Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 1 hour at 300 mA. The membranes were blocked by incubation in blocking solution, which consist of TBST buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5 and 0.1% Tween 20) with 5% non-fat dry milk for 2 hours under agitation. After that, the membranes were washed three times with TBST buffer for 5 minutes. Then, the membranes were incubated with the primary antibody anti- $\gamma\text{H2A}$  (1:3000) produced in rabbit and kindly provided by Dr. Richard McCulloch's group. Alternatively, the membranes were incubated with the primary antibody anti- $\alpha$ -tubulin (1:10000) produced in mouse (Sigma). For both antibodies, the incubation was carried out in blocking solution overnight under agitation. The membranes were washed three times with TBST for 5 minutes. Then, the membranes were incubated with secondary antibodies (1:5000) conjugated with peroxidase, anti-rabbit IgG (Sigma Immuno Chemicals) or anti- mouse IgG (Sigma) for 1 hour under

agitation. The membranes were washed three times with TBST for 5 minutes. The protein bands were revealed using Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) system and ImageQuant LAS 500 (GE) apparatus.

## Results

### *Generation of TcTopo3α KO cells*

To investigate TcTopo3α function in *T. cruzi*, this gene was deleted in epimastigotes by disrupting both alleles with neomycin and hygromycin selectable resistance markers (Figure 1A). To delete the first allele was used pNEOΔTopo3α cassette, which carries neomycin gene. In order to confirm the insertion of deletion cassette in correct locus was performed a PCR with the genomic DNA extracted from G418-resistant parasites and two different primer sets (Figure 1B). The first one, called PS1, hybridizes with neomycin and an external region of TcTopo3α gene. The second primer set, called PS2, is able to amplify the full deletion cassette. The PCR analysis showed that one allele of TcTopo3α gene was disrupted in selected parasites by neomycin gene. The amplification with PS2 showed that the full deletion cassette is present in genomic DNA of G418-resistant parasites. As expected, this primer set was also able to amplify the TcTopo3α gene in the intact allele. To delete the second allele these parasites were transfected with pHYGROΔTopo3α cassette, which carries hygromycin B gene. To examine whether this cassette was inserted in correct locus was performed another PCR using three different primer sets (Figure 1C). Similar to PS1, the primer set called PS3 hybridizes with hygromycin and an external region of the cassette. PCR analysis showed that neomycin and hygromycin resistance genes replaced both alleles of TcTopo3α. The third primer set tested, called PS4, anneals in a region inside of the target gene. PCR assay showed that TcTopo3α gene is only present in WT parasites.

In addition, TcTopo3α gene knockout was confirmed by Southern blot using the radioactive probes that hybridizes with neomycin, hygromycin or TcTopo3α genes (Figure 1D). After the separation of chromosomes by PFGE the TcTopo3α probe recognized two chromosomal bands only in WT parasites indicating that this gene was deleted in the mutant parasites. It has already been reported a variation in size between homologous chromosomes in *T. cruzi* (SOUZA et al., 2011). Therefore, it is possible that the two bands observed in WT cells is due to a difference of size between the homologous chromosomes. In agreement with that, the neomycin probe hybridized with the bigger

chromosome while the hygromycin probe recognized the smaller one in knockout cells. As expected, these probes did not hybridize with WT parasites.

Taken together these results suggest that hygromycin B and neomycin resistance genes correctly replaced both TcTopo3 $\alpha$  alleles, generating TcTopo3 $\alpha$  KO parasites.

#### *Topoisomerase 3 $\alpha$ is important to deal with DNA double strand breaks caused by gamma radiation*

To examine whether topoisomerase 3 $\alpha$  acts in the homologous recombination in *T. cruzi*, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells were treated with gamma radiation. After irradiation with 500 Gy, both parasites lineages had growth arrest for a few days, compared to parasites not exposed to gamma radiation (Figure 2). Then, the WT parasites were able to resume growth, whereas TcTopo3 $\alpha$  KO cells did not grow during experiment analysis time.

#### *The absence of topoisomerase 3 $\alpha$ impairs the growth resumption after MMS treatment*

Due to the involvement of topoisomerase 3 $\alpha$  in the DSB repair in *T. cruzi* it was thought that this enzyme also could act during replicative stress. In this sense, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were treated with MMS. The growth curve showed that both cells stopped the growth 24 hours after MMS treatment (Figure 3A). In the later times, WT parasites were able to recovery the growth, unlike of the mutant parasites. Even after a long period, TcTopo3 $\alpha$  KO cells did not grow and did not die. Flow cytometry analysis showed that MMS changed the progression of the *T. cruzi* cell cycle when compared to untreated cells (Figure 3B). WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells accumulated in the S/G2 phase 24 hours after MMS treatment. Later, WT parasites resumed normal cell cycle progression. On the other hand, TcTopo3 $\alpha$  KO parasites increased the amount of cells in the G2 phase in the time of 48 hours, which suggests a capacity of resumption of the cell cycle. However, these cells were not able to resume normal cell cycle progression and accumulated in the sub-G1 phase.

#### *TcTopo3 $\alpha$ KO cells are more sensitive to cisplatin and hydroxyurea treatments*

Then WT and TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were treated with cisplatin and HU to further understand the role of topoisomerase 3 $\alpha$  during replicative stress in *T. cruzi*. 24 hours after cisplatin treatment, both parasites ceased the growth in relation to untreated

cells (Figure 4). After that time, WT cells were able to resume normal growth while TcTopo3 $\alpha$  KO cells delayed growth resumption. In agreement with the growth curves, the flow cytometry assay showed that cells arrested in the G2 phase of the cell cycle 24 hours after cisplatin treatment (Figure 5). Although WT parasites resumed normal cell cycle progression, a small part of TcTopo3 $\alpha$  KO cells accumulated in the sub-G1 phase. In a similar way, HU treatment for 24 hours halted the growth of both cell lineages studied in relation to untreated cells (Figure 6). After HU removal from the culture medium, WT parasites were able to recovery growth. In contrast, TcTopo3 $\alpha$  KO cells remained stall for a few days and then grew again. In conformity with growth curves, the flow cytometry analysis showed that HU treatment for 24 hours synchronized the parasites in the G1/S phase of the cell cycle (Figure 7). Later, WT cells were able to resume normal cell cycle progression while TcTopo3 $\alpha$  KO cells slightly accumulated in the sub-G1 phase.

#### *Topoisomerase 3 $\alpha$ is required to DNA damage repair*

In order to assess the role of topoisomerase 3 $\alpha$  in the DNA damage repair during the replicative stress induced by Cis, HU and MMS was measured the level of  $\gamma$ H2A, an initial modification during DNA damage response, by Western blot after each treatment. As loading control was used anti- $\alpha$ -tubulin antibody. For both parasites tested, the level of H2A phosphorylation increased 24 hours after Cis treatment, indicating the presence of cisplatin induced DNA damage (Figure 8A). The lesions in WT parasites were repaired until 72 hours after Cis treatment. However, TcTopo3 $\alpha$  KO cells remained with high levels of phosphorylated histone. A similar profile was observed for HU treatment (Figure 8B). After treatment with HU for 24 hours, both WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells had  $\gamma$ H2A bands, which suggest HU induced DNA damage. The drug removal from culture medium allowed WT parasites repair their lesions until 72 hours. The same was not observed in TcTopo3 $\alpha$  KO parasites, which could not repair completely their DNA damage up to this time. 24 hours after MMS treatment, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO parasites increased the  $\gamma$ H2A levels (Figure 8C). At the time of 48 hours, TcTopo3 $\alpha$  KO cells had a more intense  $\gamma$ H2A band than WT cells, which suggest that the absence of topoisomerase 3 $\alpha$  impairs the DNA damage be fully repaired.

#### *Topoisomerase 3 $\alpha$ is not necessary to solve UV- and camptothecin- induced replicative stress*

To examine whether topoisomerase 3 $\alpha$  is an essential enzyme to solve replicative stress in *T. cruzi*, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells were also treated with CPT and UV light. In the presence of CPT (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 15  $\mu$ M), both parasites decreased the growth rate in relation to untreated ones. After drug removal, WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells were equally able to resume the growth, without achieve the same cell concentration of untreated parasites (Figure 9). Similarly, both parasites were sensitive to 1500 J.m<sup>-2</sup> UVC exposure. However, the absence of topoisomerase 3 $\alpha$  did not influence the cell survival after the treatment (Figure 10).

## Discussion

In most chronic patients of Chagas disease, there are no physical signs or clinical evidence of injury to any organ during their entire lives (MALIK et al., 2015). About 20 to 30 years after the initial infection, asymptomatic patients begin to have organs complications (PÉREZ-MOLINA et al., 2015). It is unclear what happens to the parasite during all these years of asymptomatic infection and what factors allow the reactivation of the disease. A recent study has shown that after infection some *T. cruzi* amastigotes spontaneously become dormant (SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018). Such cells are able to resume cell proliferation and reestablish infection, even after treatment with trypanocidal drug. The mechanisms involved in controlling dormancy are not yet known, but it is possible to speculate that DNA metabolism is important for this process, as well as for the success of chronic infection.

DNA topoisomerase 3 $\alpha$  forms a complex with RecQ helicases and RMI1/2 factors to dissolve Holliday junctions during homologous recombination repair (CAPRANICO et al., 2017). Aiming to study the function of this gene in *T. cruzi* it was generated topoisomerase 3 $\alpha$  knockout parasite. In contrast to WT cells, TcTopo3 $\alpha$  KO parasites did not recovery the growth after exposition to 500 Gy of gamma radiation (Figure 2), which suggest that this enzyme is involved in the DSB repair in *T. cruzi* as previously reported in other organisms. Since stalled replication forks can collapse and generate DSBs, it was investigated the role of topoisomerase 3 $\alpha$  during replicative stress in *T. cruzi*.

Treatment with 1.5 mM MMS stopped the growth of WT and TcTopo3 $\alpha$  KO parasites for 24 hours (Figure 3A). Consistent with this growth arrest, there was an increase in the level of H2A phosphorylation in both parasites 24 hours after treatment (Figure 8C). To promote lesions repair, the cells arrested the cell cycle in the S/G2 phase

(Figure 3B). In later times, WT parasites were able to repair the DNA damage caused by MMS and resume cellular growth and cell cycle progression. In contrast, TcTopo3 $\alpha$  KO cells still had considerable levels of  $\gamma$ H2A 48 hours after MMS treatment (Figure 8C). In addition, these parasites remained stopped, even after a long period, these cells did not grow again and did not die (Figure 3A). Even so, these cells were able to resume the cell cycle progression, since that 48 hours after treatment there was an increase of cells in the G2 phase. However, over time the TcTopo3 $\alpha$  KO parasites accumulated in the sub-G1 phase (Figure 3B). The accumulation of unrepaired lesions in the DNA of these mutant parasites permanently prevented growth recovery after MMS treatment but was not able to activate cell death pathways.

MMS methylated bases are usually repaired by BER. However, in trypanosomatids no specific DNA glycosylase capable of removing N-methyl purines was identified (CHARRET et al., 2012). Recently it was showed that MMS induced lesions are repaired by NER and homologous recombination in *T. brucei* (VIEIRA-DA-ROCHA et al., 2019). Rad51 is a recombinase responsible for homologous sequences search and strand invasion during the homologous recombination (SPAMPINATO, 2016). In *T. cruzi*, Rad51 single knockout parasites were sensitive to treatment with 1.5 mM MMS. Moreover, this treatment was able to increase  $\gamma$ H2A levels in TcRad51 $^{+/-}$  parasites, suggesting that TcRad51 is necessary to cope with the replicative stress generated by this alkylating agent (PASSOS SILVA et al., 2018). Therefore, it is possible to suggest that the absence of TcTopo3 $\alpha$  impairs the completion of homologous recombination during replicative stress caused by MMS. In human cells it was observed that the persistent presence of homologous recombination repair intermediates in the G2 phase increases the signaling of ATR kinase and promotes the activation of cellular senescence via p21 (FERINGA et al., 2018). Thus, it is possible to speculate that the absence of topoisomerase 3 $\alpha$  during this type of replicative stress triggers a state of cellular senescence in *T. cruzi*. However, more experiments need to be performed to confirm this hypothesis.

Cisplatin treatment (50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M) stopped the growth of WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells for 24 hours (Figure 4). In agreement with the growth curve, the evaluation of the cell cycle progression showed an accumulation of treated cells in the G2 phase of the cell cycle 24 hours after the treatment (Figure 5) as observed in mammalian cells (LÜTZKENDORF et al., 2017; SORENSON, et al., 1990; WAGNER, AND KARNITZ,

2009). Measurement of DNA lesions by Western blot using anti- $\gamma$ H2A antibody showed that at time of 24 hours both parasites tested had cisplatin induced DNA damage (Figure 8A). WT parasites repaired their lesions during cell cycle arrest, which allowed them to resume cell cycle progression and growth in the later times. On the other hand, 72 hours after cisplatin treatment, topoisomerase 3 $\alpha$  deficient cells still had lesions in the DNA. This persistent DNA damage delayed the resumption of growth of these parasites and promoted a small accumulation of these cells in the sub-G1 phase. In contrast, in *T. cruzi*, there is no difference between TcRad51 $^{+/-}$  and WT parasites survival 48 hours after cisplatin treatment (PASSOS SILVA et al., 2018). Hence can be suggest that topoisomerase 3 $\alpha$  is required to solve the replicative stress caused by cisplatin in *T. cruzi* by other pathway than homologous recombination.

HU treatment (10 mM, 20 mM or 30 mM) for 24 hours synchronized the cells in the G1/S phase of the cell cycle (Figure 7), as standardized for other strains of *T. cruzi* (GALANTI et al., 1994). Additionally, the replicative stress caused by 20 mM HU induced DNA damage in both parasites tested (Figure 8B). HU removal from the culture medium allowed growth recovery of WT parasites (Figure 6), as well as recovery of normal cell cycle progression (Figure 7). At 72 hours, no bands for  $\gamma$ H2A in these cultures were observed, indicating that all lesions caused by HU were repaired. TcTopo3 $\alpha$  KO cells were able to repair part of their lesions but still had a weak band in 72 hours (Figure 8B). These parasites were able to continue the progression of the cell cycle, with a slight accumulation of cells in the sub-G1 phase, and delayed the cellular growth recovery, compared to WT, after HU removal (Figures 6 and 7). In humans, repair of DSBs generated by prolonged treatment with HU requires the Rad51 protein (PETERMANN et al., 2010). However, in *T. cruzi*, there is no difference between TcRad51 $^{+/-}$  and WT parasites growth profile after HU treatment. In addition, the level of phosphorylated H2A after treatment with 20 mM HU in these two cells lineages is very similar, suggesting that in *T. cruzi* HU induced lesions are not repaired by homologous recombination (PASSOS SILVA et al., 2018). Once again, it is possible to suggest that topoisomerase 3 $\alpha$  is necessary to deal with HU induced replicative stress, albeit it seems that homologous recombination is not involved in this process.

Break-induced replication (BIR) is a conserved pathway capable of efficiently repair one-ended DSBs. Due to this ability, BIR is involved in the collapsed fork replication rescue (MALKOVA AND IRA, 2013). The canonic BIR requires Rad51 to

homology search and strand invasion. After the formation of displacement loop (D-loop), the DNA synthesis is initiated and it proceeds, via a migrating bubble, until the end of template chromosome. This DNA synthesis does not occur with the same fidelity of DNA replication during S phase, which results in high levels of mutagenesis and chromosomal rearrangements. It was already described a Rad51-independent pathway in yeast and mammalian cells. However, the molecular mechanisms of this alternative BIR are unclear (KRAMARA et al., 2018). Since BIR can happen independently of Rad51, it is possible to speculate that this pathway is involved in the recovery of stalled forks caused by HU and cisplatin in *T. cruzi*. As it is not fully elucidated what enzymes are involved in DNA synthesis during BIR, there is a possibility that topoisomerase 3 $\alpha$  acts in this process, as occurs during normal replication of nuclear and mitochondrial DNA. This would explain the delay in resumption of growth of topoisomerase 3 $\alpha$  deficient cells after both treatments and the fact that these cells were able to grow even without the complete repair of their lesions. However, further experiments need to be performed to confirm this hypothesis.

The above results indicate the involvement of topoisomerase 3 $\alpha$ , probably by different pathways, in the resolution of the replicative stress caused by MMS, HU and cisplatin in *T. cruzi*. However, these knockout parasites were not more sensitive than WT cells to treatment with camptothecin (Figure 9) and UV light (Figure 10), two agents which also halt the replication fork progression.

Taken together the results obtained here indicates that TcTopo3 $\alpha$  is required during homologous recombination repair, as previously describe in other organisms. Moreover, topoisomerase 3 $\alpha$  also acts during some kinds of replicative stress caused by DNA damage in *T. cruzi*. It is possible to note that not all responses to replicative stress are dependent on homologous recombination, which may explain the variation in sensitivity of Topo3 $\alpha$  KO parasites to the genotoxic agents tested. Thus, it can be suggested that this enzyme is not essential to deal with all types of replicative stress in *T. cruzi*, since its absence did not interfere in the sensitivity to UV light and CPT. Replicative stress induced by MMS can be solved via homologous recombination pathway. However, it is possible that topoisomerase 3 $\alpha$  also acts in other pathways to allow the recovery of the replication forks after the replicative stress caused by HU and cisplatin, so the mechanisms recruited after these treatments need to be elucidated. Thus, understand the role of topoisomerase 3 $\alpha$  in *T. cruzi* may contribute to a better comprehension of the

biology of this trypanosomatid and the mechanisms by which the infection installs successfully.

### **Funding**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Dr. Richard McCulloch for kindly provide the anti- $\gamma$ H2A antibody.

### **References**

- BALANÑA-FOUCE, R. et al. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 326–337, 2014.
- BENNETT, R. J.; NOIROT-GROS, M. F.; WANG, J. C. Interaction between yeast Sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 26898–26905, 2000.
- BIZARD ANNA H. AND HICKSON IAN D. The dissolution of double Holliday junctions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 7, p. a016477, 2014.
- BOCQUET, N. et al. Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by Topoisomerase III $\alpha$  and RMI1. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 261–268, 2014.
- BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dyebinding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CAPRANICO, G.; MARINELLO, J.; CHILLEMI, G. Type I DNA Topoisomerases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 2169–2192, 2017.
- CHARRET, K. S. et al. Trypanosoma brucei AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. **DNA Repair**, v. 11, n. 1, p. 53–64, 2012.
- CUYA, S. M.; ANN, M.; ROBERT, B. DNA topoisomerase - targeting chemotherapeutics : what ' s new ? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2017.
- DOCAMPO, R. et al. ACIDOCALCISOMES — CONSERVED FROM BACTERIA TO MAN. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251–261, 2005.

FERINGA, F. M. et al. Persistent repair intermediates induce senescence. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

GALANTI, N.; DVORAK, J.A.; GRENET, J.; MCDANIEL, J. P. Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. **Experimental Cell Research**, v. 214, p. 225–230, 1994.

GANGLOFF, S. et al. The Yeast Type I Topoisomerase Top3 Interacts with Sgsl , a DNA Helicase Homolog: a Potential Eukaryotic Reverse Gyrase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 12, p. 8391–8398, 1994.

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.

GOODWIN, A. et al. Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in Schizosaccharomyces pombe. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 20, p. 4050–4058, 1999.

HARMON, F. G.; DIGATE, R. J.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. RecQ Helicase and Topoisomerase III Comprise a Novel DNA Strand Passage Function: A Conserved Mechanism for Control of DNA Recombination. **Molecular Cell**, v. 3, p. 611–620, 1999.

KIM, H.; CROSS, G. A. M. TOPO3 a Influences Antigenic Variation by Monitoring Expression-Site-Associated VSG Switching in Trypanosoma brucei. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, 2010.

KRAMARA, J.; OSIA, B.; MALKOVA, A. Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 7, p. 518–531, 2018.

LÜTZKENDORF, J. et al. Resistance for genotoxic damage in mesenchymal stromal cells is increased by hypoxia but not generally dependent on p53-regulated cell cycle arrest. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease : An Update. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 11, p. 4–6, 2015.

MALKOVA, A.; IRA, G. Break-induced replication: Functions and molecular mechanism. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 3, p. 271–279, 2013.

NICHOLLS, T. J. et al. Topoisomerase 3 a Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA Article Topoisomerase 3 a Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. **Molecular Cell**, p. 9–23, 2018.

PAVANI, R. S. et al. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of Trypanosoma cruzi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005181, 2016.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 15, p. 1347–1356, 2015.

PETERMANN, E. et al. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. **Molecular Cell**, v. 37, n. 4, p. 492–502, 2010.

POMMIER, Y. et al. Review DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer

- and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 5, p. 421–433, 2010.
- POMMIER, Y. et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 703–721, 2016.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. 1–20, 2018.
- SEKI, M. et al. Bloom Helicase and DNA Topoisomerase III  $\alpha$  Are Involved in the Dissolution of Sister Chromatids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 16, p. 6299–6307, 2006.
- SORENSEN, C.M.; BARRY M.A.; EASTMAN, A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 9, p. 749–755, 1990.
- SOUZA, F. S. P. De et al. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 90–98, 2010.
- SOUZA, R. T. et al. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- SPAMPINATO, C. P. Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1673–1709, 2016.
- TSAI, H.; LIN, R.; HSIEH, T. *Drosophila* mitochondrial topoisomerase III  $\alpha$  affects the aging process via maintenance of mitochondrial function and genome integrity. **Journal of Biomedical Science**, p. 1–11, 2016.
- VIEIRA-DA-ROCHA, J. P. et al. The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. **DNA Repair**, v. 73, n. November 2018, p. 78–90, 2018.
- WAGNER, J.M.; KARNITZ, L. M. Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 208–214, 2009.
- WANG, J. C. Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. June, p. 430–441, 2002.
- WHO. Disponível em: <[www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 25 jan. 2019.
- YANG, J. et al. Human Topoisomerase III $\alpha$  Is a Single-stranded DNA Decatenase That Is Stimulated by BLM and RMI1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21426–21436, 2010.

## Figure Legends

**Figure 1: Generation of TcTopo3 $\alpha$  KO parasites.** A) Schematic representation of the deletion cassettes pNEO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  or pHYGRO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  (top panel), TcTopo3 $\alpha$  locus in WT parasites (middle panel) and the locus generated in knockout parasites after transfection (bottom panel). Arrows indicate the primer sets used in the PCR to confirm the correct insertion of deletion cassettes. B) Ethidium bromide stained gel showing PCR products generated with primer sets PS1 (1) and PS2 (2) using genomic DNA of TcTopo3 $\alpha$  KO epimastigotes. It indicates that pNEO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  cassette was inserted correctly in the TcTopo3 $\alpha$  locus of one allele. C) Ethidium bromide stained gel showing PCR products generated with primer sets PS1 (lane 1), PS3 (lane 2) and PS4 (lanes 3 and 4) using genomic DNA of WT or TcTopo3 $\alpha$  KO epimastigotes. It indicates that pNEO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  and pHYGRO $\Delta$ Topo3 $\alpha$  cassettes were inserted correctly in the TcTopo3 $\alpha$  locus of both alleles generating knockout parasites. D) Southern blot analysis of WT and Topo3 $\alpha$  KO parasites. The chromosomes of WT and knockout epimastigotes were separated by PFGE (panels on left), transferred to nylon membranes and hybridized with radioactive probes for TcTopo3 $\alpha$ , neomycin or hygromycin genes (panels on right). Chromosomes from yeast *Hansenula wingei* (1.05 to 3.13 Mbp) were used as molecular weight marker (Biorad). It shows that TcTopo3 $\alpha$  probe recognized bands only in WT parasites while neomycin and hygromycin probes hybridized with bands only in TcTopo3 $\alpha$  KO parasites. It indicates that both TcTopo3 $\alpha$  alleles were replaced by deletion cassettes in selected parasites.

**Figure 2: Growth curve after gamma radiation.** Evaluation of the growth profile of WT and Topo3 $\alpha$  KO *T. cruzi* parasites after exposure to 500 Gy of gamma radiation. The parasites were cultured in LIT medium at initial concentration of  $1.0 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> and counted in a cytometry chamber every 24 hours. The experiment was performed in triplicate.

**Figure 3: The role of topoisomerase 3 $\alpha$  in the response to MMS treatment.** (A) Growth curve after the treatment with 1.5 mM MMS for 1 hour in PBS buffer. After the treatment, the cells were cultivated in fresh medium. The cells were counted every day using a cytometry chamber and vital dye erythrosine. It shows that Topo3 $\alpha$  KO cells exposed to MMS are not able to resume growth. (B) Histogram of cell cycle progression after MMS treatment. The cells were analyzed by flow cytometry after being labeled with propidium iodide. In all the histograms, the blue curves represent the untreated cells and

the red ones refer to the cells exposed to the drug. It shows that, for both parasites tested, MMS promoted accumulation of cells in the S phase in the time of 24 hours. WT parasites were able to resume normal cell cycle progression in later times. However, the same was not observed in Topo3 $\alpha$  KO cells, which accumulated in the sub-G1 phase.

**Figure 4: Growth curve after cisplatin treatment.** Growth curve after the treatment with 50  $\mu$ M (A) or 100  $\mu$ M (B) Cis for 1 hour in PBS buffer. After the treatment, the cells were cultivated in fresh medium. The cells were counted every day using a cytometry chamber and vital dye erythrosine. It shows that TcTopo3 $\alpha$  KO cells exposed to both doses of Cis delayed to resume growth in relation to WT cells.

**Figure 5: Cell cycle progression after cisplatin treatment.** Representative histogram of cell cycle progression analysis after the treatment with 50  $\mu$ M (A) or 100  $\mu$ M (B) Cis. The cells were analyzed by flow cytometry after being labeled with propidium iodide. In all the histograms, the blue curves represent the untreated cells and the red ones refer to the cells exposed to the drug. It shows that, for both parasites tested, both doses of Cis promoted accumulation of cells in the G2 phase in the time of 24 hours. Later, WT parasites were able to resume normal cell cycle progression while there was a slight accumulation of TcTopo3 $\alpha$  KO cells in the sub-G1 phase.

**Figure 6: Growth curve after HU treatment.** Growth curve after the treatment with 10 mM (A), 20 mM (B) or 30 mM (C) HU. The HU was kept in the LIT medium for 24 hours. After that, the cells were washed and cultivated in a fresh medium. The cells were counted every day using a cytometry chamber and vital dye erythrosine. It shows that TcTopo3 $\alpha$  KO cells exposed to different doses of HU delayed to resume growth in relation to WT cells. The arrow indicates the time when HU was removed from the medium.

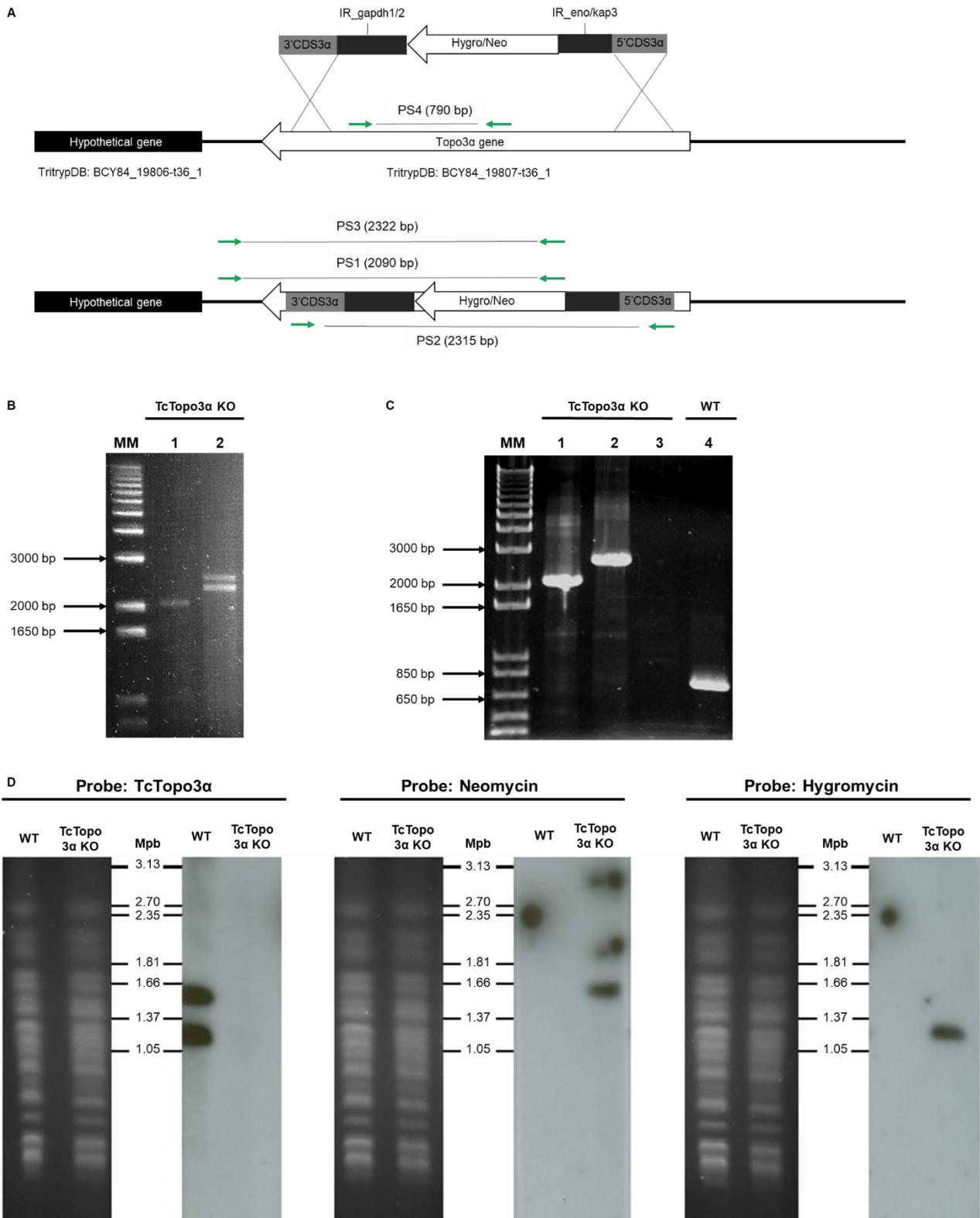
**Figure 7: Cell cycle progression after HU treatment.** Representative histogram of cell cycle progression analysis after the treatment with 10 mM (A), 20 mM (B) or 30 mM (C) HU. The cells were analyzed by flow cytometry after being labeled with propidium iodide. In all the histograms, the blue curves represent the untreated cells and the red ones refer to the cells exposed to the drug. It shows that, for both parasites tested, different doses of HU synchronized the cells in the G1/S phase in the time of 24 hours. Later, WT parasites were able to resume normal cell cycle progression while there was a slight accumulation of TcTopo3 $\alpha$  KO cells in the sub-G1 phase.

**Figure 8: Western blot to measure the levels on DNA damage after the treatments.**

The extracts were prepared at the indicated time points and were analyzed by western blot with anti- $\gamma$ H2A antibody, a DSB marker. The anti- $\alpha$ -tubulin antibody was used as a loading control. A) Cisplatin induced DNA damage. Parasites increased  $\gamma$ H2A levels 24 hours after cisplatin treatment. The WT cells were able to repair their lesions at the time of 72 hours, which did not happen with TcTopo3 $\alpha$  KO parasites. In the absence of cisplatin, only TcTopo3 $\alpha$  KO cells exhibited weak bands for phosphorylated histone. B) HU induced DNA damage. Treatment with HU for 24 hours increased levels of  $\gamma$ H2A in both parasites. The WT cells were able to repair their lesions at the time of 72 hours, which did not happen with Topo3 $\alpha$  KO parasites. In the absence of HU, only TcTopo3 $\alpha$  KO cells exhibited bands for the phosphorylated histone at the three times tested. C) MMS induced DNA damage. Both parasites increased the  $\gamma$ H2A levels 24 hours after MMS treatment. In the time of 48 hours, WT cells were able to repair DSBs while TcTopo3 $\alpha$  KO parasites were not. Even without treatment, the absence of topoisomerase 3 $\alpha$  increased the  $\gamma$ H2A levels.

**Figure 9: Growth curve after CPT treatment.** Growth curve after the treatment with 5  $\mu$ M (A), 10  $\mu$ M (B) or 15  $\mu$ M (C) CPT. The HU was kept in the LIT medium for 48 hours. After that, the cells were washed and cultivated in a fresh medium. The cells were counted every day using a cytometry chamber and vital dye erythrosine. It shows that WT and TcTopo3 $\alpha$  KO cells exposed to different doses of CPT grew similarly. The arrow indicate the time when CPT was removed from the medium.

**Figure 10: Survival curve after UVC exposure.** (A) Survival curve immediately after irradiation 1500 J.m<sup>-2</sup> UVC in LIT medium. WT and Tc Topo3 $\alpha$  KO parasites were equally sensitive to the treatment. (B) Evaluation of parasites growth profile 24 hours after UVC irradiation. The absence of topoisomerase 3 $\alpha$  did not alter the growth rate after exposure to UV light.



**Figure 1**

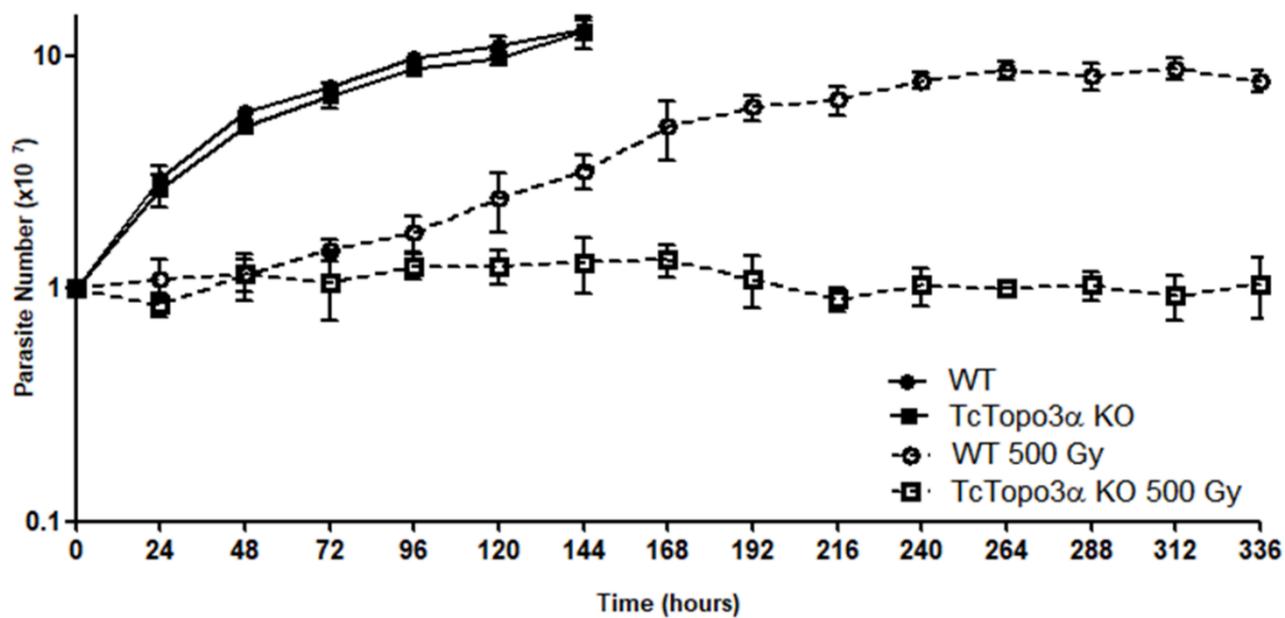
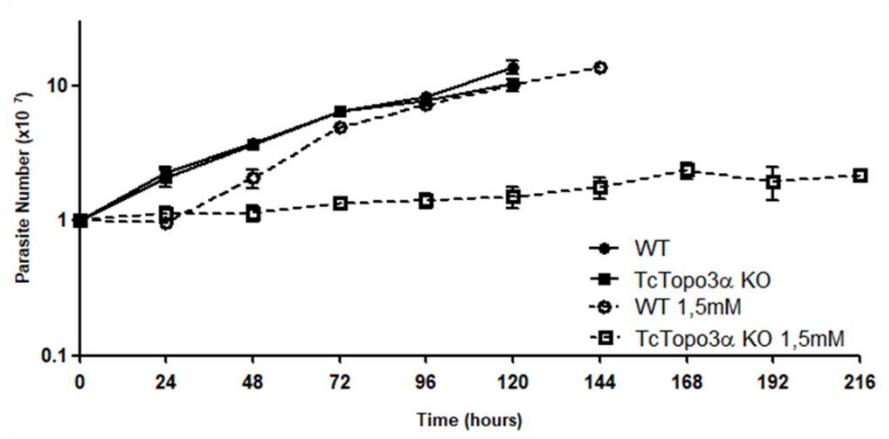


Figure 2

A



B

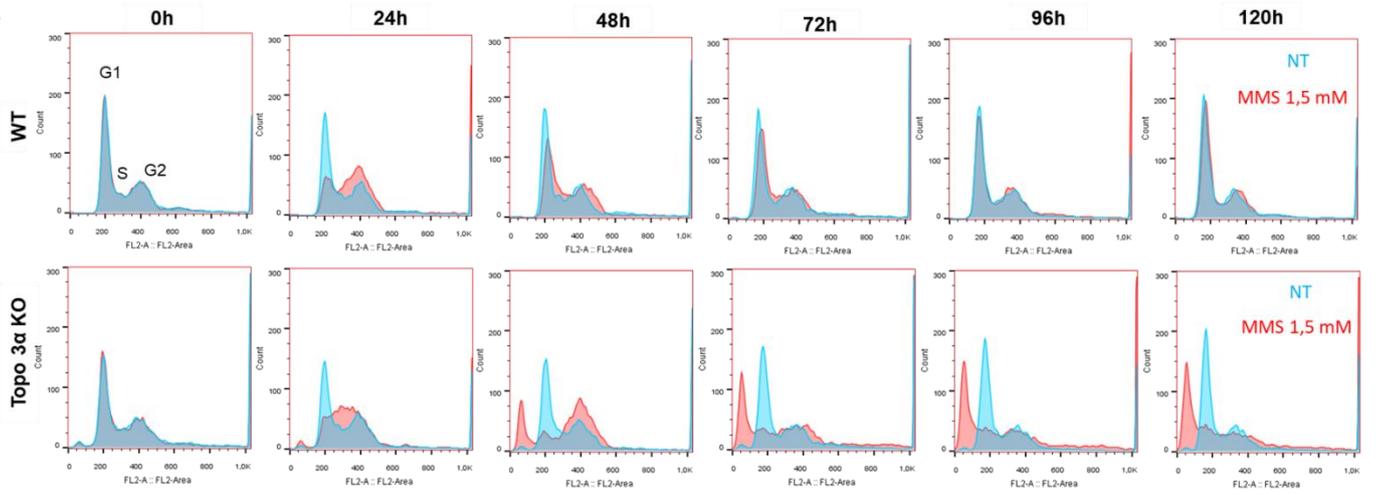
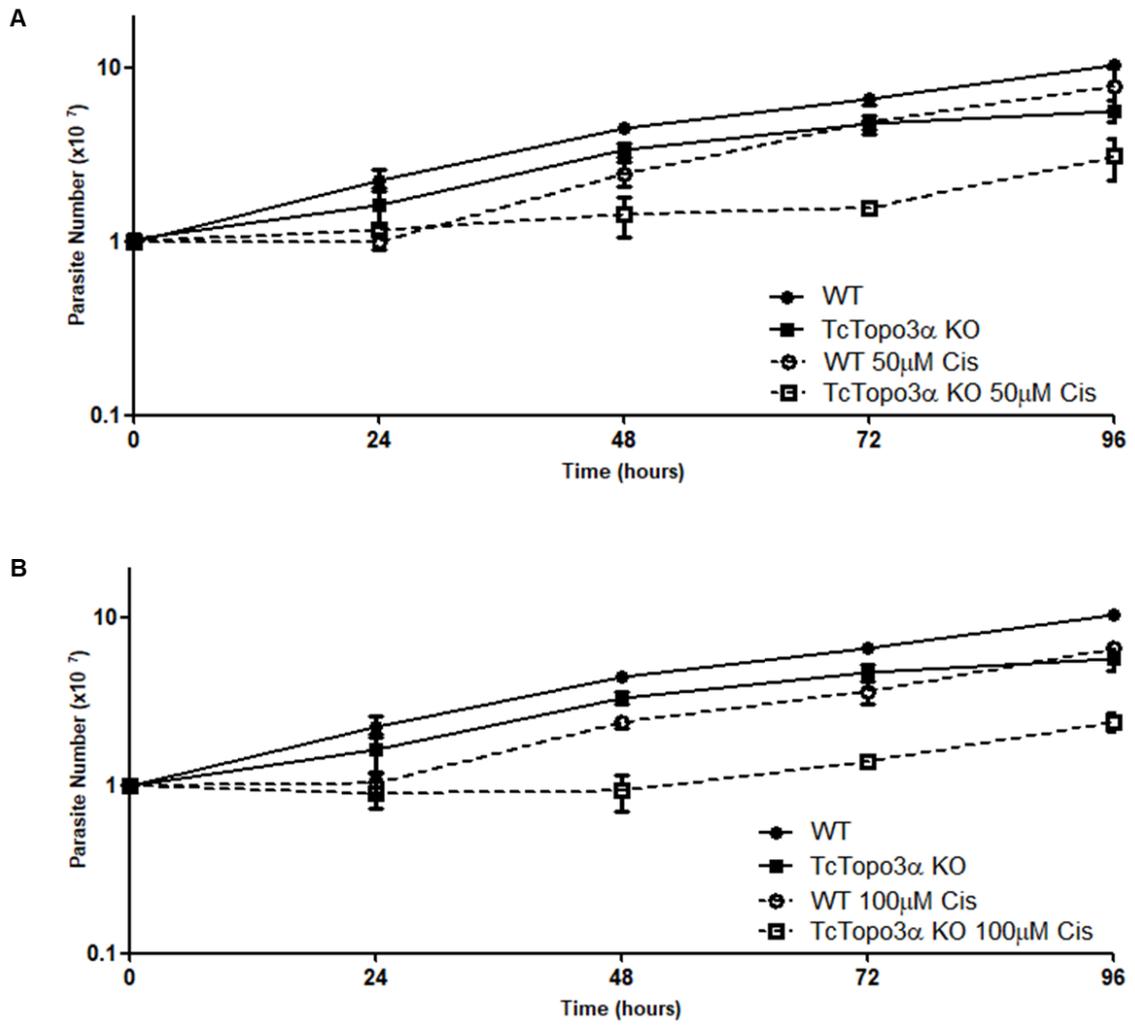
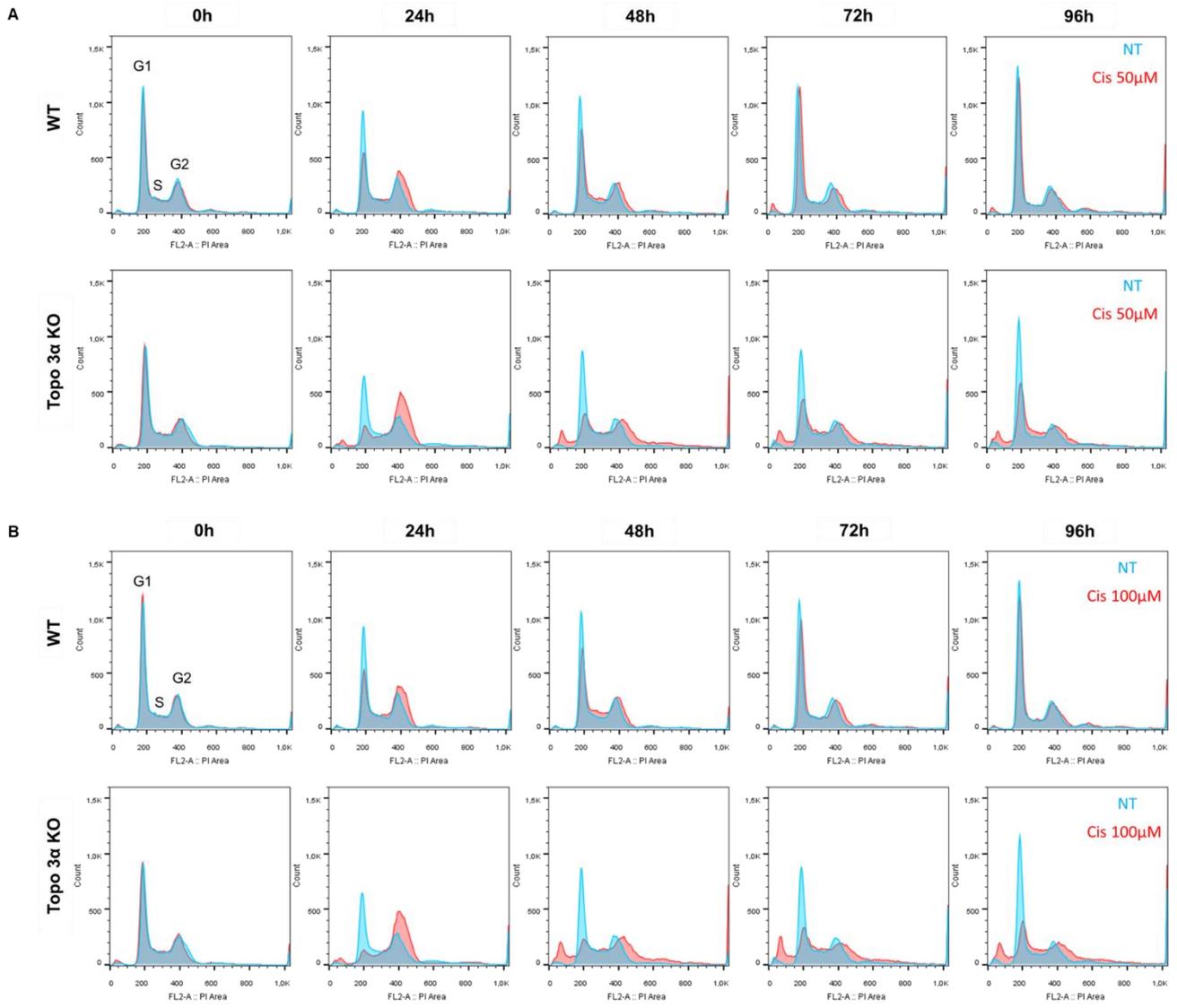


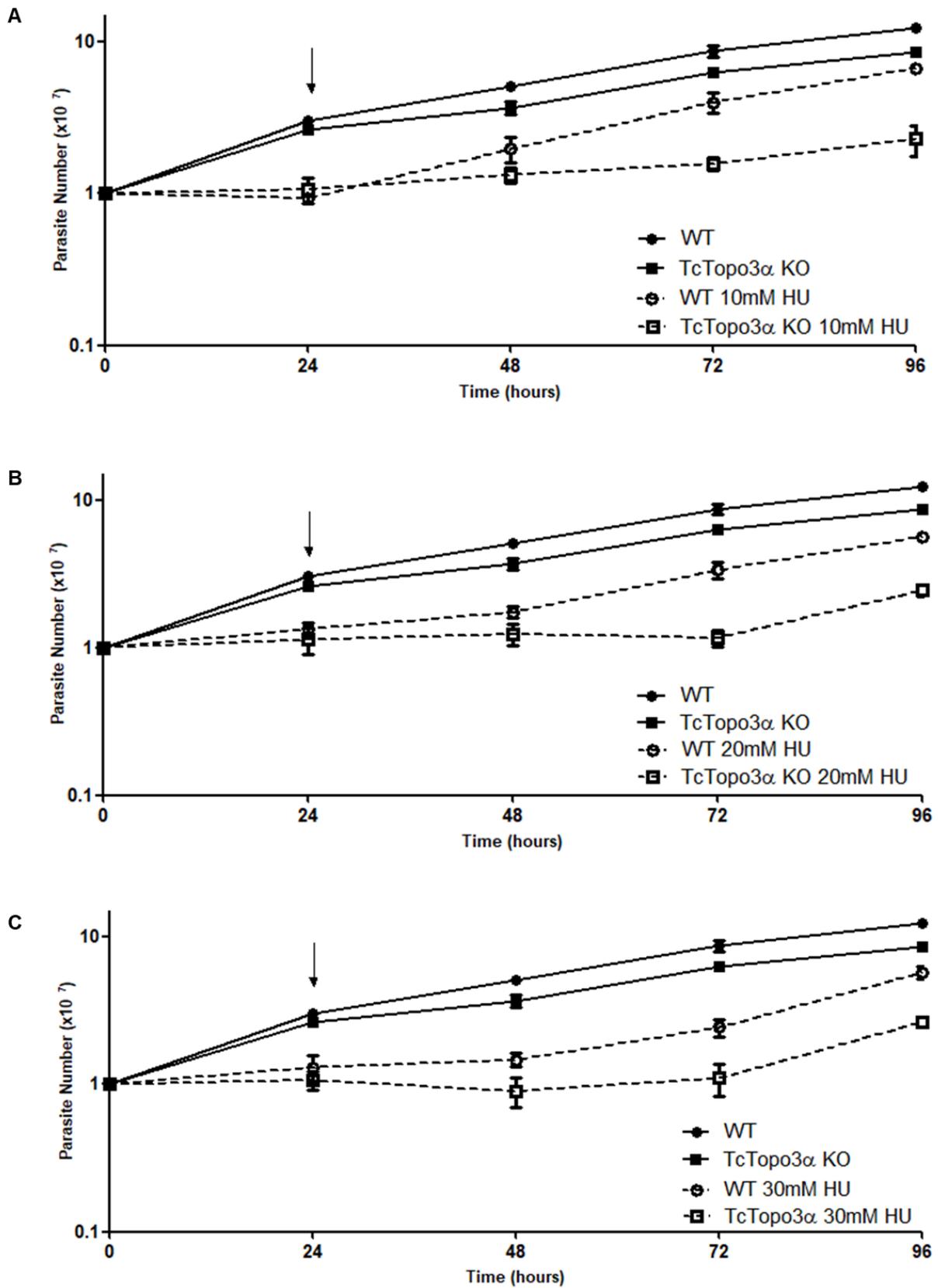
Figure 3



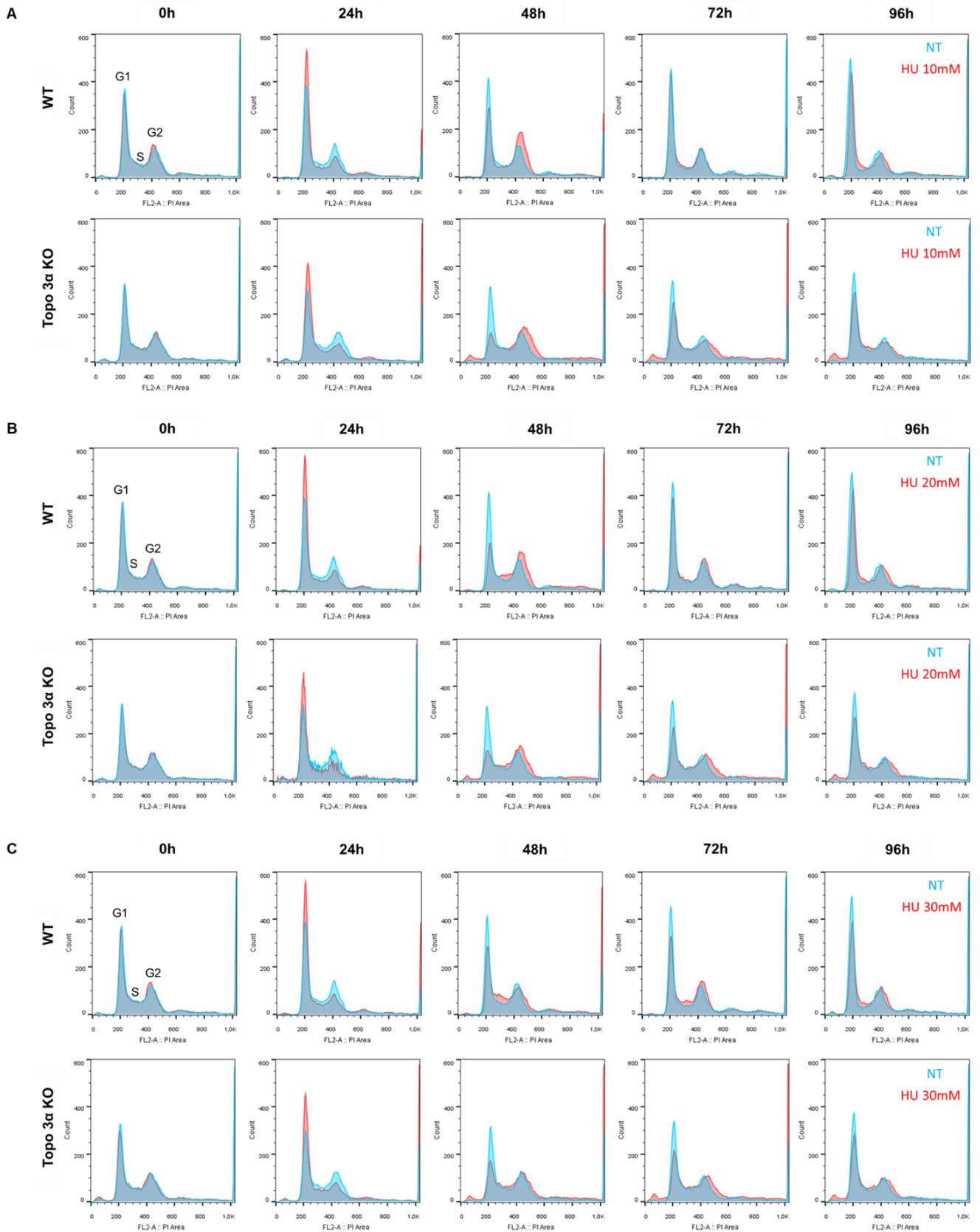
**Figure 4**



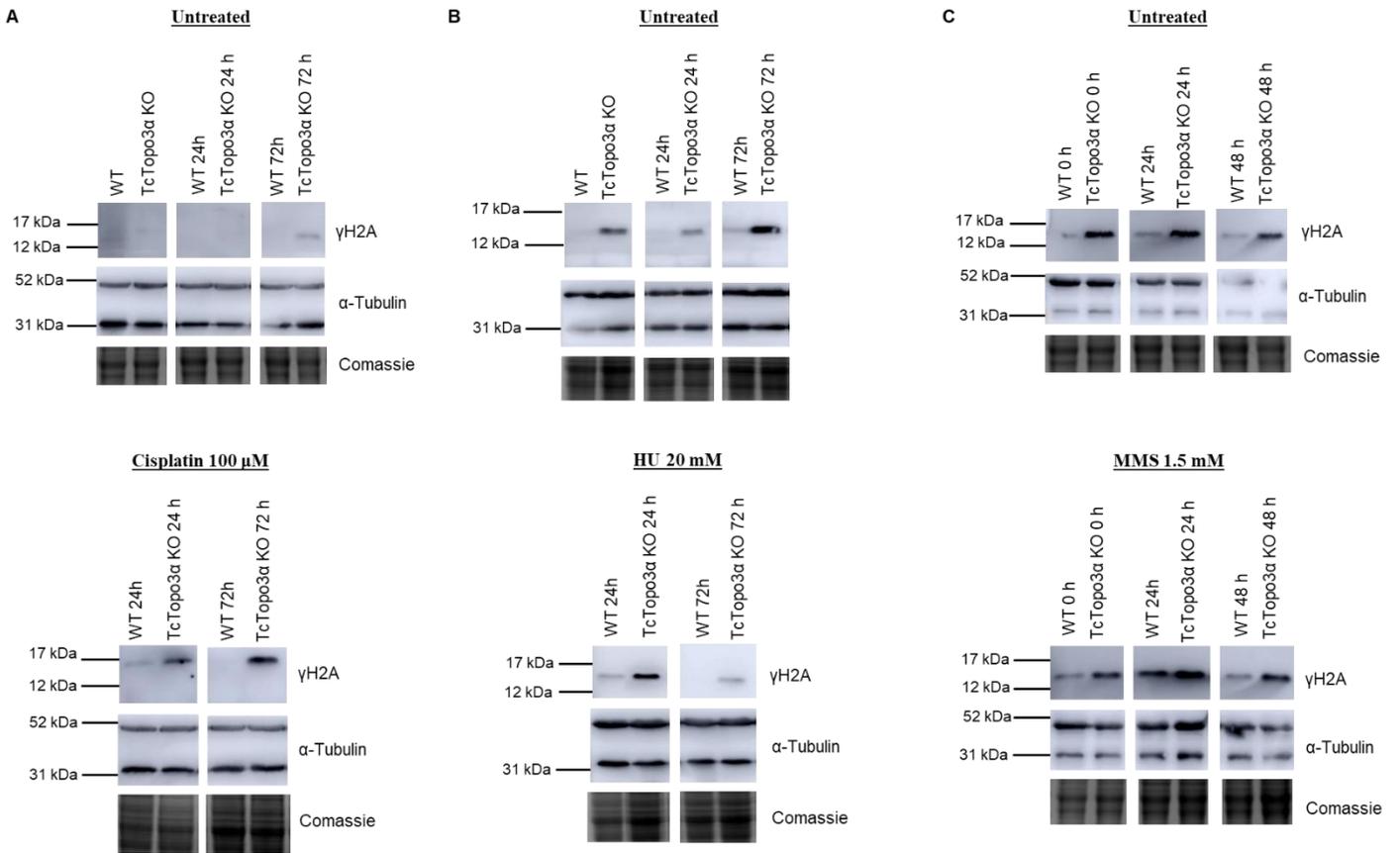
**Figure 5**



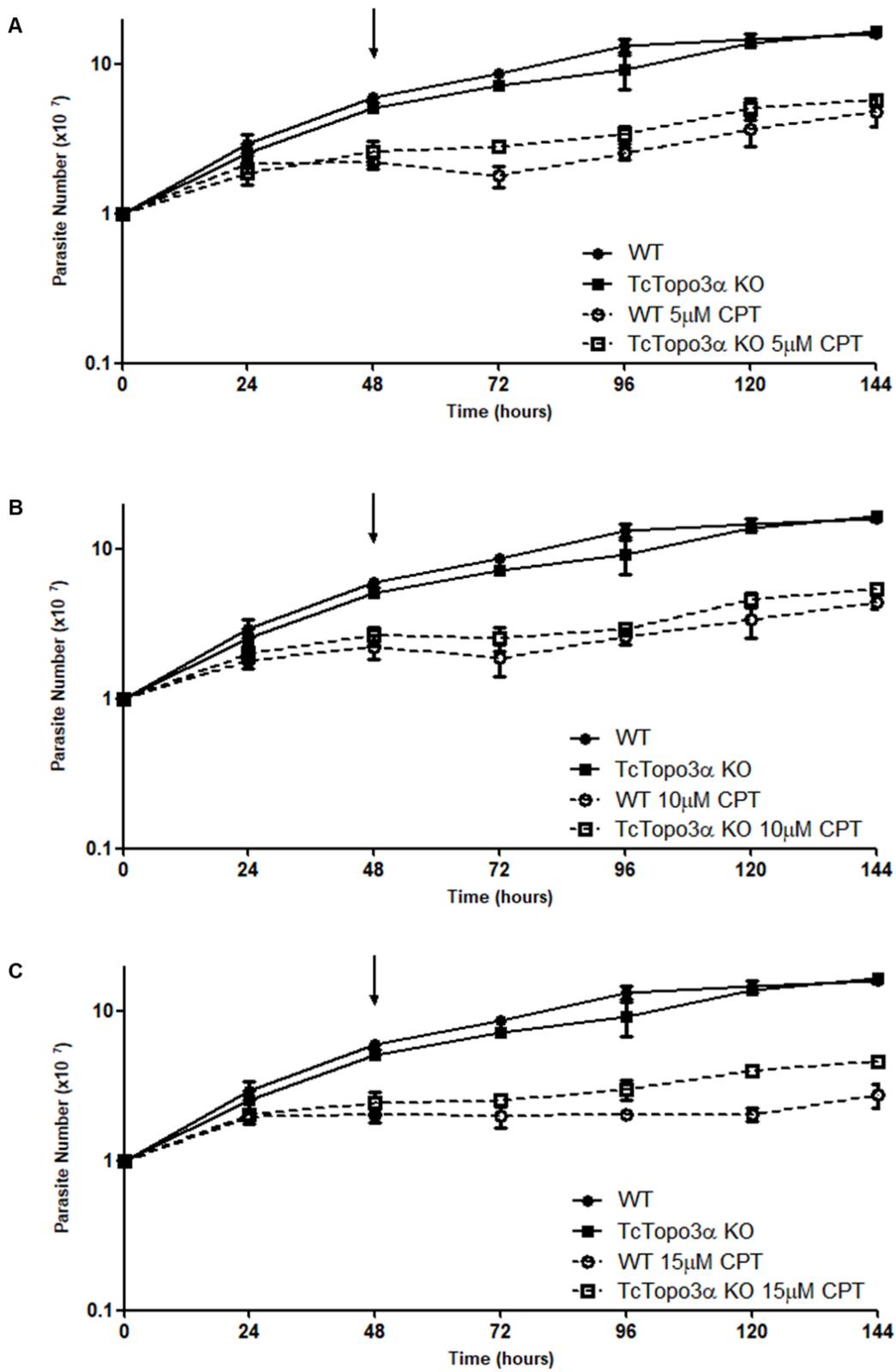
**Figure 6**



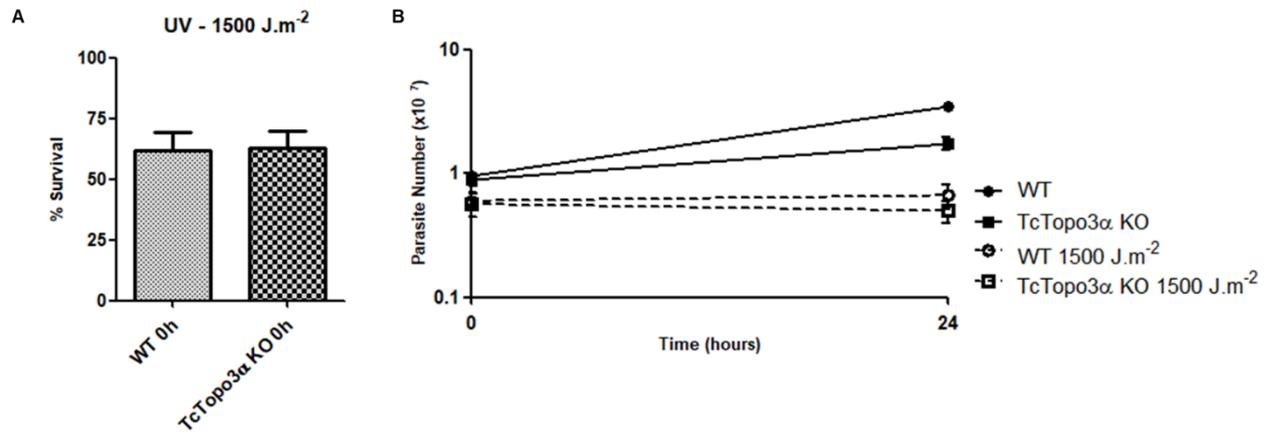
**Figure 7**



**Figure 8**



**Figure 9**



**Figure 10**